

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

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

ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ  
«БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВО БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ»

# **БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

*Сборник статей Международной научно-практической конференции,  
посвященной 50-летию Института биохимии биологически активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси*

5–6 октября 2021 г.  
г. Гродно, Республика Беларусь

Минск  
ИВЦ «Минфина»  
2021

Сборник статей Международной научно-практической конференции «Биологически активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности» посвящен 50-летию Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси. В сборнике представлены результаты экспериментальных и клинических исследований ученых Беларуси, стран СНГ и дальнего зарубежья 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 № 4 от 20 сентября 2021 г.).*

*Издано при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований*

*Редакционная коллегия:*

*Семененя И. Н.*, доктор медицинских наук, профессор (главный редактор)  
*Лелевич В. В.*, доктор медицинских наук, профессор (заместитель главного редактора)  
*Мойсеёнок А. Г.*, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси (заместитель главного редактора)

*Заводник И. Б.*, доктор биологических наук, профессор  
*Зиматкин С. М.*, доктор биологических наук, профессор  
*Канунникова Н. П.*, доктор биологических наук, профессор  
*Нефёдов Л. И.*, доктор медицинских наук, профессор  
*Островский А. А.*, доктор медицинских наук, профессор  
*Сутько И. П.*, кандидат биологических наук  
*Черникович 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 .....	10
-------------------	----

### *Раздел I*

#### **К ИСТОРИОГРАФИИ ИНСТИТУТА БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ**

**Семененя И. Н.**

50 ЛЕТ ИНСТИТУТУ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ .....	13
---	----

**Мойсеёнок А.Г.**

ИЗ АКАДЕМИЧЕСКОГО ОТДЕЛА В АКАДЕМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ .....	63
---	----

**Лелевич В.В.**

НАУЧНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ АЛКОГОЛИЗМА В ИНСТИТУТЕ БИОХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ .....	69
--	----

**Черникевич И. П.**

СТАНОВЛЕНИЕ И РАЗВИТИЕ ЭНЗИМОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ИНСТИТУТЕ БИОХИМИИ .....	74
--	----

### *Раздел II*

#### **НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ**

**Адамцевич Н.Ю., Шацких Ю.В., Болтовский В.С., Титок В.В.**

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ .....	80
--	----

**Акулич Н.В., Сяхович В.Э., Сорока А.В., Зинчук В.В.**

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ТЕРАПИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА .....	84
---	----

**Аль Фаххам С.М.А., Канунникова Н.П.**

ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ВОСПАЛЕНИЯ В КРОВИ ПРИ СОЧЕТАНИИ ОСТРЫХ КОРОНАРНЫХ СИНДРОМОВ И САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА У ПАЦИЕНТОВ В ИРАКЕ .....	90
---	----

**Астроўскі А.А., Бакуновіч А.А., Ярашэнка Ю.У.**

ЛАБАРАТОРНЫЯ МАДЭЛІ ЗАГОЙВАННЯ ПАЎНАСЛОЙНЫХ СКУРНЫХ РАН ДЛЯ ВЫЯЎЛЕННЯ АСНОЎНЫХ УЛАСЦІВАСЦЯЎ СУЧАСНЫХ ПЕРАВЯЗАЧНЫХ МАТЕРЫЯЛАЎ .....	94
--	----

**Астроўскі А.А., Туманаў А.В., Палубок В.Ч., Марчык А.І., Барадзіна Т.А., Шляхтун А.Г.**

АСАБЛІВАСЦІ ГІСТАЛАГІЧНАГА ВЫВУЧЭННЯ ЛЁГКІХ ЛАБАРАТОРНЫХ ЖЫВЁЛ ВА ЎМОВАХ ПРЫЯРЫТЭТУ БЯХІМІЧНЫХ ДАСЛЕДВАННЯЎ .....	103
--	-----

<b>Балаева-Тихомирова О.М., Долматова В.В., Семенов И.О., Чиркин А.А.</b> ОЦЕНКА ГОМОЛОГИИ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗА ЧЕЛОВЕКА И ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ.....	121
<b>Бахтюков А.А., Деркач К.В., Сорокоумов В.Н., Степочкина А.М., Шпаков А.О.</b> ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И ЕГО НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АГОНИСТА НА СТЕРОИДОГЕНЕЗ В СЕМЕННИКАХ ЗДОРОВЫХ, ДИАБЕТИЧЕСКИХ И СТАРЕЮЩИХ КРЫС .....	127
<b>Блажко А.С., Переверзев В.А., Сикорский А.В., Евсеев А.В., Разводовский Ю.Е., Корзун Д.Л., Никитина О.С., Переверзева Е.В.</b> ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЁННОСТИ УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ У МОЛОДЫХ ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ПОЛА.....	133
<b>Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Малыгина А.В.</b> ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ НЕЙРОНОВ ТЕМЕННОЙ КОРЫ И ГИППОКАМПА КРЫС С СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ВВЕДЕНИИ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ.....	140
<b>Бутвиловский А.В., Терехова Т.Н., Колб А.В., Бутвиловский В.Э.</b> АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КАРИОЗНОГО ДЕНТИНА ВРЕМЕННЫХ ЗУБОВ ПОД ПОКРЫТИЕМ «CLINPRO XT VARNISH».....	143
<b>Бушма М.И., Басалай О.Н., Борисенок О.А., Зиматкин С.М., Шейбак В.М., Михальчук Е.Ч.</b> БИОРЕГУЛЯТОРНЫЕ И НЕФРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА МЕЛАТОНИНА, ТАУРИНА И АРГИНИНА.....	147
<b>Величко М. Г., Кравчик Е. Г.</b> БИОХИМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК В УКРЕПЛЕНИИ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА.....	157
<b>Виноградов В.В.</b> ГОРМОНЫ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ.....	163
<b>Гречко В.М., Чещевик В.Т., Дзейкало А., Сыкула А., Блажиньска П., Лодыга-Хрущинецкая Е.</b> РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОСНОВАНИЯМИ ШИФФА ГЕСПЕРЕТИНА.....	170
<b>Грицук А.И., Коваль А.Н., Никитина И.А., Логвинович О.С., Громыко М.В., Скрыпникова Л.П., Мышковец Н.С., Мазаник М.Е.</b> ПРЕПОДАВАНИЕ ОСНОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ НУТРИЦИОЛОГИИ В КУРСЕ БИОХИМИИ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА.....	176
<b>Гуринович В.А., Хвесько И.С., Мойсеёнок А.Г.</b> ОЦЕНКА БИОДОСТУПНОСТИ ВИТАМИНА D ПРИ БОЛЮСНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА И КОМПЛЕКСА ВИТАМИНОВ .....	179
<b>Девина Е.А., Принькова Т.Ю.</b> ЭФФЕКТЫ ЭПИГАЛЛОКАТЕХИНГАЛЛАТА И РЕСВЕРАТРОЛА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ И АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ, КОНТАКТИРОВАВШИХ С СИГАРЕТНЫМ ДЫМОМ.....	184
<b>Живицкая С.С., Абашкин В.М., Мажораль Ж.-П., Щербин Д.Г.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ТУШЕНИЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОСФОРНОГО ДЕНДРИМЕРА CPDG4 .....	190
<b>Заводник И.Б., Чещевик В.Т., Лапшина А.Е., Чещевик Н.Г., Коваленя Т.А.</b> МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ДИАБЕТЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ .....	196

<b>Зиматкин С.М.</b> НЕЙРОМОРФОЛОГИЯ И НЕЙРОХИМИЯ АЛКОГОЛИЗМА .....	200
<b>Зиматкина Т.И.</b> ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАМИНА КАК РЕГУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ТИАМИНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ.....	207
<b>Зиматкина Т.И.</b> РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ РЯДА ПРОИЗВОДНЫХ ТИАМИНА .....	213
<b>Канделинская О.Л., Грищенко Е.Р., Левкович А.В., Огурцова С.Э., Таганович А.Д., Девина Е.А.</b> ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА ИЗ СЕМЯН РАСТЕНИЙ <i>OENOTHERA BIENNIS L.</i> , ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В БЕЛАРУСИ, НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН У КРЫС.....	220
<b>Коваль А.Н.</b> ПРИМЕР ПРОГРАММЫ НА ЯЗЫКЕ PYTHON ДЛЯ РАСЧЕТА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ВЫХОДА БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ.....	226
<b>Коваль А.Н.</b> ЭЛЕМЕНТЫ ПРОГРАММИРОВАНИЯ ПРИ РЕШЕНИИ РАСЧЕТНЫХ ЗАДАЧ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ.....	230
<b>Ковальчук-Болбатун Т.В., Смотрич С.М., Гуляй И.Э., Копыцкий А.В.</b> РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В РАЗВИТИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ КОЖИ У КРЫС В РАННЕМ ПЕРИОДЕ БЕРЕМЕННОСТИ .....	233
<b>Коденцова В.М., Рисник Д.В.</b> ОБОСНОВАННОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ПРЕИМУЩЕСТВА МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ.....	236
<b>Кокوشкина О.О., Запорожченко О.В.</b> ВЛИЯНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ НАД-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ТКАНЯХ КРЫС.....	240
<b>Колмакова Т.С., Беликова Е.А.</b> СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МОНОАМИНОВ В КРОВИ СТУДЕНТОК ПРИ АДАПТАЦИИ К ОБУЧЕНИЮ В ВУЗЕ.....	246
<b>Костеневич Н. Н., Черникевич И. П.</b> КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТИАМИНКИНАЗ ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ И ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ.....	251
<b>Королёв П.М.</b> ЗАПАТЕНТОВАННЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АМНЕЗИИ .....	259
<b>Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Таганович А.Д.</b> ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И РЕТИНОИДОВ НА УРОВЕНЬ СУРФАКТАНТНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ В ЛЕГКИХ ПРИ ГИПЕРОКСИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	263
<b>Лапко А.В., Голубович В.П.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОСОРБЕНТА ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ IGG НА ОСНОВЕ ОЛИГОПЕПТИДНОГО ЛИГАНДА.....	269
<b>Лукиенко Е.П., Титко О.В., Канунникова Н.П.</b> ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И ПАНТЕНОЛА НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЯХ МОЗГА ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОМ ДИСБАЛАНСЕ.....	274

<b>Макаревич Д.А., Ермола Е.М., Рябцева Т.В.</b> ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНАЛОГОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6.....	278
<b>Макарчиков А.Ф., Кудырко Т.Г., Лучко Т.А., Русина И. М., Колос И. К., Гуринович В.А.</b> ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АДЕНОЗИН-ТИАМИНТРИФОСФАТА .....	283
<b>Максимчук В.П., Лисковский О.В.</b> АНАЛИЗ КОМОРБИДНЫХ РАССТРОЙСТВ У ПАЦИЕНТОВ С ЗАВИСИМОСТЬЮ ОТ АЛКОГОЛЯ.....	289
<b>Марцев С.П., Власов А.П., Пащикова О.Л.</b> ПОЛУЧЕНИЕ «НЕФОЛДИРУЕМЫХ» РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ: СРАВНЕНИЕ ПРЯМОЙ ЭКСПРЕССИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА С ЭКСПРЕССИЕЙ ХИМЕРНОГО БЕЛКА В1-ЭФР, ВКЛЮЧАЮЩЕГО ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ «АССИСТЕНТ» ФОЛДИНГА.....	295
<b>Мойсейенок А.Г., Канунникова Н.П., Гуринович В.А., Лукиенко Е.П., Максимчик Ю.З., Катковская И.Н., Хвесько И.С.</b> ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ ФОРМИРОВАНИЯ И КОРРЕКЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА СТРУКТУР ЦНС ПОСРЕДСТВОМ РЕДОКС-АКТИВНЫХ ФОРМ КАЛЬЦИФЕРОЛОВ И ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ .....	301
<b>Мойсейенок А.Г., Катковская И.Н.</b> ПРОГРЕСС В ИЗУЧЕНИИ БИОСИНТЕЗА КОФЕРМЕНТА А, ЕГО ФУНКЦИЙ И АССОЦИИРОВАННЫХ ПРОЦЕССОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ .....	305
<b>Мойсейенок А.Г., Максимчик Ю.З., Мойсейенок Е.А.</b> ВОЗМОЖНЫЕ D-ВИТАМИННЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ.....	315
<b>Морозова Л.А., Савельев С.В.</b> ВАРЬИРОВАНИЕ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ .....	325
<b>Морозова Л.А., Савельев С.В.</b> ВОЗДЕЙСТВИЕ МИЛЛИМЕТРОВОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НЕТЕПЛОВОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА И ОРГАНИЗМЫ .....	330
<b>Нефёдов Л.И.</b> РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И РАЗРАБОТКА НА ИХ ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ .....	337
<b>Нехорошев С.В., Нехорошева А.В., Сабутова А.Б., Ботиров Э.Х., Дренин А.А., Слепченко Г.Б., Горников Н.В.</b> ОЦЕНКА ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСТРАКТОВ САЛИЦИНА НА ВОДНОЙ ОСНОВЕ .....	342
<b>Нечипуренко Н.И., Пащковская И.Д., Прокопенко Т.А., Юдицкая В.М.</b> СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАЗОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ ПРИ СОСУДИСТОМ СПАЗМЕ ПОСЛЕ АНЕВРИЗМАТИЧЕСКОГО СУБАРАХНОИДАЛЬНОГО КРОВОИЗЛИЯНИЯ.....	348
<b>Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М., Квасюк Е.И., Сыса А.Г.</b> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭМОКСИПИНА НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АНТИМЕТАБОЛИТОВ РЯДА МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ.....	354

<i>Никитина И.А., Логвинович О.С., Громыко М.В., Коваль А.Н., Мазаник М.Е., Грицук А.И.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ПРЕПОДАВАНИЯ КУРСА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ В ГОМЕЛЬСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ МЕДИЦИНСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ .....	360
<i>Павлов К.И., Арабей С.В., Хватова Л.А., Кундельская Л.М., Курклинская Г.А., Наборовская А.М., Метелица Т.Г., Чегодаева Е.В., Гиндюк А.В.</i> СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА В ОТНОШЕНИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ.....	365
<i>Переверзев В.А., Блажко А.С., Евсеев А.В., Вэлком М.О., Разводовский Ю.Е., Александров Д.А., Никитина О.С., Переверзева Е.В., Пожарицкий А.М.</i> РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ НЕУПОТРЕБЛЕНИЯ И УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ СРЕДИ СТУДЕНТОВ-МЕДИКОВ РАЗНОГО ПОЛА МЛАДШИХ КУРСОВ: ВЗАИМОСВЯЗЬ С ИХ УСПЕВАЕМОСТЬЮ .....	372
<i>Петров С.А., Андриевский А.М., Федорко Н.Л., Чернадчук С.С., Сорокин А.В., Будняк А.К., Ягунова Ю.В., Таранец Л.Д.</i> РОЛЬ КАТАБОЛИТОВ ВИТАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕАБОЛИЗМА.....	380
<i>Пехтерева Н.В.</i> МЕТОДИКА ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИПИДСОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И ЗНАЧИМОСТЬ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ЭЯКУЛЯТА МУЖЧИН С НАРУШЕНИЕМ ФЕРТИЛЬНОСТИ .....	386
<i>Побойнев В.В., Хрусталёв В.В., Хрусталёва Т.А.</i> СТАБИЛЬНОСТЬ ДРЕВНИХ БЕЛКОВ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В ИХ УПОРЯДОЧЕННОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ .....	392
<i>Пустюльга Е.С., Грибовская О.В., Ермола Е.М., Голубович В.П., Мойсеёнок А.Г.</i> ОЦЕНКА СВОЙСТВ НАСЫЩАЕМОСТИ И ЁМКОСТИ СОРБЕНТОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ IGG НА ОСНОВЕ ТРИПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ.....	398
<i>Пустюльга Е.С., Ермола Е.М., Голубович В.П.</i> ОЦЕНКА СВОЙСТВ СЕЛЕКТИВНОСТИ СОРБЕНТОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ IGG НА ОСНОВЕ ТРИПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ.....	401
<i>Разводовский Ю.Е., Смирнов В.Ю.</i> ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА АМИНОКИСЛОТНЫЙ ФОНД ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ.....	411
<i>Разводовский Ю.Е., Смирнов В.Ю., Дорошенко Е.М., Переверзев В.А., Максимович Н.Е., Семененя И.Н.</i> ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ L-ТРИПТОФАНА НА СПЕКТР АМИНОКИСЛОТ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА .....	416
<i>Рутковская Ж.А., Котович И.Л., Таганович А.Д.</i> ВЛИЯНИЕ ТОКОФЕРОЛА ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ НА ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОКСИИ.....	421

<b>Савельев С.В., Морозова Л.А.</b> ПЛАНКОВСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ .....	427
<b>Сафонов В.А., Ляпко Н.И., Черницкий А.Е.</b> ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА «АНТИМИОПАТИК» ДЛЯ КОРРЕКЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У КОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДЕФИЦИТОМ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ .....	434
<b>Семененя И. Н.</b> РОЛЬ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ .....	438
<b>Семенович Д.С., Лукиенко Е.П.</b> ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС С ЛИМФОСАРКОМОЙ ПЛИССА ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ ДОКСОРУБИЦИНОМ И СОЧЕТАННОМ ВВЕДЕНИИ ПАНТЕНОЛА С ЦИСТЕАМИНОМ .....	465
<b>Соколовская С.Н.</b> СОДЕРЖАНИЕ ИЗОТОПОВ КАЛИЯ-40 В ПОЧВАХ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ И ИЗМЕНЕНИЕ ЕГО СОДЕРЖАНИЯ ПРИ ВНЕСЕНИИ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ .....	470
<b>Степура Т.Л.</b> ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА В РАЗВИТИИ COVID-19 .....	474
<b>Степура И.И., Агейко С.А., Степура В.И., Дробышевская А.А., Смирнов В.Ю., Янцевич А.В.</b> ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТА UVA ДИАПАЗОНА НА ВОДНЫЕ РАСТВОРЫ ТИОХРОМА .....	478
<b>Степура И.И., Агейко С.А., Степура В.И., Смирнов В.Ю., Янцевич А.В.</b> МЕТАБОЛОНИКА ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ И ИХ РОЛЬ В КЛЕТОЧНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ .....	491
<b>Степура И.И., Завадская В.М., Агейко С.А., Степура В.И., Янцевич А.В.</b> ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИТОХРОМА С И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ И В ОТСУТСТВИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ .....	523
<b>Страх Я.Л., Игнатовец О.С.</b> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ В ЛИСТЬЯХ И ЧЕРЕШКАХ МОРОШКИ ПРИЗЕМНОЙ ( <i>RUBUSCHAMAEMORUS L.</i> ) .....	549
<b>Сутько И.П., Шляхтун А.Г., Титко О.В., Янкевич Н.В., Телегин П.Г., Колодко А.В., Зверинская Н.Г., Зверинский И.В.</b> САМОЭМУЛЬГИРУЮЩАЯСЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ БЕРБЕРИНА И СИЛИМАРИНА .....	552
<b>Туманов А.В., Шляхтун А.Г., Мороз В.Л., Марчик А.И., Полубок В.Ч., Семенкова Г.Н., Сорокин В.Л., Шадыро О.И.</b> ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРОКАТЕХИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ У КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ ЛЕГКИХ .....	558
<b>Хрусталёв В.В.</b> СХОДСТВО СПЕКТРОВ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПРИОННОГО ПЕПТИДА СС36 В СВОБОДНОЙ И КОНЪЮГИРОВАННОЙ ФОРМЕ .....	563
<b>Чепелева Е.В., Самович Т.В., Козел Н.В.</b> ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ <i>DUNALIELLA SALINA</i> ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕДАХ .....	569

<b>Чонабаева Н.Н., Мукашева А.Г.</b> ПРИМЕНЕНИЕ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРИРОДНЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ .....	574
<b>Чуешова Н.В., Чешик И.А.</b> ОЦЕНКА ПРОТЕКТОРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС-САМЦОВ В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МОБИЛЬНОГО ТЕЛЕФОНА.....	579
<b>Шарафетдинов Х.Х., Плотникова О.А., Пилипенко В.В., Кондратьева О.В., Ахматова Х.Р., Фролова Ю.В.</b> ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ НА ФОНЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА.....	586
<b>Шейбак В.М., Шейбак Л.Н., Павлюковец А.Ю., Николаева И.В.</b> ТАУРИН И КАТИОНЫ ЦИНКА — МОДУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА И ЦИТОПРОТЕКТОРЫ .....	591
<b>Шляхтун А.Г., Радута Е.Ф., Сутько И.П., Богдевич Е.В., Каснер Е.В., Семененя И.Н., Турсунходжаева Ф.М.</b> ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ДЕЙСТВИИ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПЕРОКСИСОМ .....	597
<b>Ярец Ю.И.</b> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛДГ-ТЕСТА, ОПРЕДЕЛЕНИЯ CD 95 И 7-ААД ПРИ ОЦЕНКЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МАТРИКСА БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ .....	602
<b>Ярец Ю.И., Русаленко М.Г.</b> СОВРЕМЕННЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДИАГНОСТИКИ ЭНДОКРИННЫХ ГИПЕРТЕНЗИЙ .....	608
<b>Ali Adeeb Hussain Ali, Loseva L.P., Krupskaya T.K.</b> FEATURES OF NUTRITION CORRECTION IN OVERWEIGHT PATIENTS.....	613
<b>Alomer Rwad Ali Jebur</b> THE DIRECT EFFECT OF LEPTIN HORMONE ON TYPE 2 DIABETES .....	618
<b>Andrievskii A.M., Yagupova Yu.V., Ryzhko I.L., Petrov S.A.</b> THE EFFECT OF NIACIN AND ITS METABOLITES ON THE EXERCISE OF TRYPSIN ACTIVITY.....	621
<b>Bashilov A.V., Shutava H.G., Ovsepyan A.S., Avetisyan S.V.</b> INFLUENCE OF A BIOLOGICAL PRODUCT BASED ON THE BACILLUS THURINGIENSIS MELANINOGENIC STRAIN ON GERMINATING CAPACITY AND MORPHOLOGY / OF VERBASCUM THAPSUS L., VERBASCUM NIGRUM L., CENTAUREA SCABIOSA L., BETONICA OFFICINALIS L., AND VISCARIA VULGARIS BERNH.....	628
<b>Shanshool Estabraq Tareq Shanshool</b> CHANGES IN SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD UNDER DIFFUSE DISEASE OF THE LIVER .....	635
<b>Shanshool Mustafa Tareq Shanshool</b> STUDY OF THE LEVELS OF SOME SEXUAL HORMONES IN BLOOD SERUM OF MEN WITH TYPE 2 DIABETES .....	638
<b>Tomulewicz M., Kuzniatsou A., Zakrzaska A., Kitlas P.</b> MELITTIS MELISSOPHYLLUM — THERAPEUTIC POTENTIALITIES .....	641

## ПРЕДИСЛОВИЕ

---

Уважаемые коллеги! Перед вами сборник материалов Международной научно-практической конференции «Биологически активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности», посвященной 50-летию Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, созданного в 1970 г. в г. Гродно первоначально в форме Отдела регуляции обмена веществ АН БССР (далее — Институт). Alma mater Института стал Гродненский государственный медицинский институт, откуда и вышли первые ученые Института вместе с талантливым организатором — лидером-биохимиком профессором Ю.М. Островским.

Основным направлением научной деятельности Института стало всестороннее междисциплинарное изучение фундаментальных аспектов витаминологии и возможностей применения витаминов, их производных, а также антивитаминов в клинической практике с целью коррекции различных нарушений жизнедеятельности. Второе «брендовое» направление – изучение биохимических аспектов действия алкоголя на организм и развития алкогольной зависимости, а также возможностей коррекции различных нарушений, вызванных злоупотреблением алкоголя. Получили также развитие аминокислотное направление, исследование биохимических аспектов злокачественного роста и некоторые другие.

Благодаря трудолюбию, целеустремленности, организованности, высоким профессиональным качествам за прошедшие 50 лет коллектив Института достиг значительных успехов в области разработки актуальных проблем выбранных направлений научной деятельности. На базе Института и с его участием подготовлены и успешно защищены 36 докторских и 152 кандидатские диссертации, получено свыше 80 авторских свидетельств СССР и патентов Республики Беларусь, Российской Федерации на изобретения, издано около 50 монографий. Список журналов, в которых опубликованы результаты научных исследований и разработок ученых Института, включает более 130 наименований, из них свыше 60 — на иностранных языках.

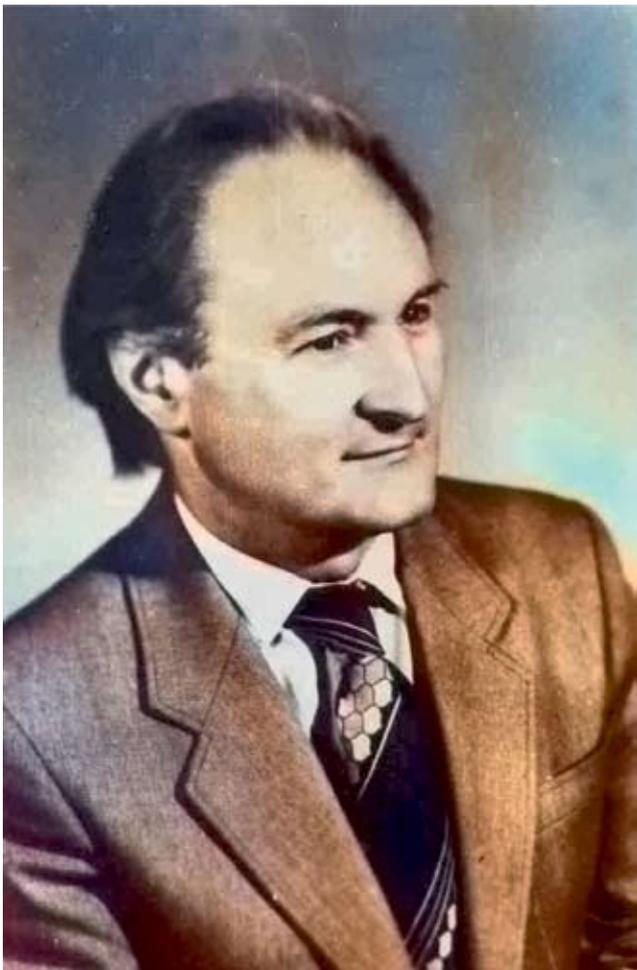
Накануне 50-летия Института благодаря поддержке Гродненского облисполкома из средств инновационного фонда области закуплено современное научное оборудование на сумму около 1,5 млн долларов США, которым оснащены три созданные в Институте в 2018 г. отраслевые лаборатории, что позволило существенно обновить материально-техническую базу и значительно расширить научные и прикладные возможности Института.

Укрепляются научно-технологические связи Института с промышленными предприятиями Гродненщины и других регионов республики, создан образовательно-научный кластер в Гродненском регионе, развивается международное сотрудничество.

Пользуясь случаем, от всей души поздравляю бывших и нынешних работников Института с юбилеем, желаю всем доброго здоровья, семейного счастья, благополучия, творческого долголетия и больших успехов в решении актуальных проблем фундаментальной и прикладной науки. С глубоким почтением отдаю дань памяти работникам Института, ушедшим из этой жизни. Надеюсь, что Институт в дальнейшем достигнет еще больших высот на пути разработки приоритетных направлений научной, научно-технической и инновационно-производственной деятельности, получения новых знаний и технологий, разработок, которые найдут применение в здравоохранении, фармацевтической и пищевой промышленности, парфюмерно-косметической отрасли химической промышленности и других отраслях экономики Республики Беларусь, обеспечении экспортного потенциала Института.

Директор Института биохимии  
биологически активных соединений  
Национальной академии наук 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  
(29.06.1925–31.12.1991)**

**Институт биохимии  
биологически активных  
соединений НАН Беларуси  
(Беларусь, г. Гродно,  
бульвар Ленинского Комсомола, 50)**



***Раздел I***  
***К ИСТОРИОГРАФИИ ИНСТИТУТА БИОХИМИИ***  
***БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ***  
***НАН БЕЛАРУСИ***

**50 ЛЕТ**  
**ИНСТИТУТУ БИОХИМИИ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**  
**НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ**

---

*Семененя И. Н.*

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

**Резюме.** Представлены основные вехи в становлении и основные достижения в научно-организационной деятельности Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, важнейшие результаты научных исследований и разработок по итогам 50-летней деятельности. Обозначены перспективы дальнейшего развития Института.

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (далее — Институт) создан в 1970 г. в г. Гродно первоначально в форме Отдела регуляции обмена веществ АН БССР (далее — Отдел). В возникновении этой структуры Академии наук основную роль сыграли два фактора: наличие к тому времени мощного лидера — профессора-биохимика, а впоследствии академика НАН Беларуси, заслуженного деятеля науки БССР Юрия Михайловича Островского, подготовившего за свою жизнь 14 докторов и 73 кандидата наук, и группы талантливых, целеустремленных научных и научно-педагогических работников, составивших базовый костяк будущего Института. Примером мирового признания выдающихся научных заслуг академика Ю.М. Островского может служить факт официального обращения к нему в 1990 г. Нобелевского комитета с просьбой высказать обоснованное мнение о кандидатуре лауреата Нобелевской премии по химии 1991 года.

Alma mater Института стал Гродненский государственный медицинский институт — кафедра биохимии и две лаборатории ЦНИЛ (проблемная витаминологическая лаборатория и лаборатория клинической биохимии), откуда и вышли первые ученые Института вместе с профессором Ю.М. Островским. На базе этих подразделений первоначально и размещался Отдел. Переезд в новое здание на бульваре Ленинского Комсомола (д. 50), построенное специально для будущего Института, состоялся в первой половине 1976 г. В 2021 г., в связи с передачей здания Института Гродненскому государственному медицинскому университету на основании решений руководства НАН Беларуси, Минздрава и Гродненского облисполкома, Институт переехал в двухэтажное здание на пл. Антония Тызенгауза, 7, сохранив за собой 4-й этаж корпуса на бульваре Ленинского Комсомола (д. 50) и часть вивария.

В развитии Института можно выделить несколько этапов, связанных с его реорганизацией:

- *Отдел регуляции обмена веществ АН БССР — 1970–1985 гг.*
- *Институт биохимии АН БССР (НАН Беларуси) — 1985–2006 гг.*
- *Гродненский филиал Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси — 2006–2011 гг.*
- *Гродненский филиал Института биоорганической химии НАН Беларуси — 2011–2012 гг.*

• *Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси — с 2012 г. по настоящее время.*

Деятельность Института (тогда Отдела) фактически началась 8 сентября 1970 г., когда профессор Ю. М. Островский был назначен на должность руководителя этой организации. В 1970 г. в штат было зачислено 7 человек. Ученым секретарем назначен А. Г. Мойсеенок.

Главное направление научных исследований Отдела было определено постановлением Государственного комитета по науке и технике при Совете Министров СССР от 21 июня 1970 г. № 37 — *изучение роли витаминов, антивитаминов и их производных в регуляции обменных процессов, включая молекулярные механизмы каталитического действия тиаминдифосфата, межвитаминные, витаминно-гормональные и витаминно-лекарственные взаимодействия.* Поэтому в основу научной деятельности Отдела 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. С 1973 г. Институт стал разрабатывать 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.

Научная работа Отдела координировалась:

- Научным советом по проблеме «Биохимия животных и человека» АН СССР;
- Научным советом по медицинским проблемам питания АМН СССР;
- Научным советом по комплексной проблеме «Злокачественные новообразования» АМН СССР;
- Научным советом по проблеме «Микробиология» АН СССР;
- Межведомственным научным советом «Проблемы наркологии» и др.

В 1971 г. были созданы ученый совет и аспирантура, через которую активно осуществлялась подготовка научных кадров высшей квалификации по специальностям «биохимия», «биофизика», «молекулярная биология» и «фармакология». Особенно выделяется 1990 г., когда в аспирантуре Института обучалось 28 человек.

Пополнение Отдела квалифицированными научными кадрами осуществлялось, в том числе, через целевую аспирантуру организаций АН СССР (Институт биоорганической химии имени академика М.М. Шемякина и Институт молекулярной биологии), АН БССР (Институт биоорганической химии). Исследователи Отдела проходили стажировки в Институте биологической физики АН СССР, Институте химической физики АН СССР, Институте физиологии имени И.П. Павлова АН СССР, Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова и других организациях СССР и зарубежных стран.

Быстро росла численность работников Отдела, а затем и Института, которая составляла:

- 1975 г. — 96 человек (научных работников — 48);
- 1978 г. — 143 человека (научных работников — 50);
- 1980 г. — 163 человека (научных работников — 61);
- 1982 г. — 181 человек (научных работников — 94);
- 1985 г. — 189 человек (научных работников — 95);
- 1986 г. — 211 человек (научных работников — 96);
- 1987 г. — 230 человек (научных работников — 86).

Максимальная численность работников Института (около 240 человек) достигла в последние годы руководства Институтом академиком Ю.М. Островским — 1990-1991 гг. С начала 1990-х годов этот показатель стал постепенно снижаться:

- 1996 г. — 175 человек (научных работников — 75);
- 1998 г. — 144 человека (научных работников — 75);
- 2000 г. — 123 человека (научных работников — 70);
- 2006 г. — 99 человек (научных работников — 52);
- 2008 г. — 85 человек (научных работников — 44).

В настоящее время в Институте работает 57 человек, из них 40 научных работников.

В первые годы работы Отдела в нем функционировали 3 научные группы:

- *молекулярных механизмов регуляции обмена веществ* (руководитель — Ю.М. Островский);
- *межвитаминных взаимоотношений* (руководитель — А.Г. Мойсеенок);
- *витаминно-гормональных взаимоотношений* (руководитель — В.В. Виноградов).

В разные годы в Отделе работали и другие научные группы: *белковая, биофизики, биохимии липидов, биохимии серусодержащих витаминов, биологических основ алкоголизма, гистохимии, нуклеиновая, пентоз, экспериментальной онкологии, энзимологии*. Некоторые из них впоследствии были преобразованы в лаборатории.

Первые научные лаборатории были созданы в 1975 г. — *механизмов регуляции обмена веществ* (руководитель — Ю. М. Островский) и *биохимической фармакологии* (руководитель — П. И. Лукиенко). В 1981 г. добавилось еще 3 лаборатории — *биохимии эндокринных желез* (руководитель — В. В. Виноградов), *коферментов* (руководитель — А. Г. Мойсеенок) и *биохимии спиртов и альдегидов* (руководитель — М. Н. Садовник). В дальнейшем сеть лабораторий постепенно расширялась, а с созданием в 1985 г. Института в нем появились и отделы. На начальном этапе работы Отдела в нем были также созданы небольшие инструментальные узкопрофильные лаборатории общего назначения: органического синтеза, физических методов анализа, полярографии и электросинтеза, гистохимии, ультрацентрифугирования и электронной микроскопии, спектрофлуориметрии, газохроматографии, радиоактивных изотопов, бактериологии.

Активное развитие алкогольного направления привело к созданию в сентябре 1990 г. на базе Института филиала Всесоюзного научного центра медико-биологических проблем наркологии Минздрава СССР (директор — С.Ю. Островский), просуществовавший до января 1992 г., когда в СССР (в связи с его распадом) были закрыты все филиалы упомянутого центра. Фактически это событие совпало со смертью директора Института академика Ю. М. Островского (31 декабря 1991 г.). В 1992 г. филиал был реорганизован в лабораторию медико-биологических проблем наркологии при кафедре биохимии ГрГМИ, которую возглавил В. В. Лелевич.

После смерти академика Ю.М. Островского Институтом руководили Ф. С. Ларин (1992–1996), А. Г. Мойсеенок (и.о. директора в 1996–1998), Л. И. Нефедов (1998–2002), В. В. Лелевич (2002–2005), П. С. Пронько (и.о. директора в 2005–2006), Д. И. Романовский (2006–2011), П. Т. Петров (и.о. директора в 2011), С. А. Усанов (2011-2012), П. С. Пронько (и.о. директора в 2013–2014), Л. И. Надольник (2014–2017), И. Н. Семененя (2018–по н/вр.).

В разные годы структурными научными подразделениями Института руководили В. А. Аверин, А. Н. Бородинский, В. У. Буко, М. И. Бушма, Т. Ч. Валюк, М. Г. Величко, А. И. Воскобоев, З. В. Горбач, В. П. Гриневиц, В. А. Гуринович, И. В. Зверинский, С. М. Зиматкин, Н. П. Канунникова, Н. А. Кравченя, Ф. С. Ларин, А. Ф. Макарович, Г. Н. Михальцевич, Н. Н. Мосолов, Л. И. Надольник, Л. И. Нефедов, Д. А. Опарин, С. Ю. Островский, П. С. Пронько, В. И. Сата-

новская, И. И. Степура, С. А. Струмило, Ю. А. Тарасов, Р. В. Требухина, И. П. Черникевич, О. В. Чумакова и др.

В настоящее время научная организационная структура Института включает

1 отдел:

*медико-биологических проблем алкоголизма* (заведующий — Ю.Е. Разводовский) *с сектором молекулярной генетики* (заведующий — А.В. Шуриберко) и *сектором молекулярной биофизики* (заведующий — к.б.н. И.И. Степура);

3 отраслевые лаборатории:

- *доклинического исследования лекарственных средств* (заведующий — к.б.н. А.В. Туманов);

- *мониторинга пищевого (микронутриентного) статуса населения и разработки технологий его коррекции с использованием функциональных продуктов и биологически активных добавок* (и.о. заведующего — к.м.н. Е.П. Лукиенко);

- *биологически активных веществ* (заведующий — А.Г. Шляхтун);

группу *функциональной морфологии* (заведующий — д.м.н., профессор А.А. Островский).

В период становления Отдела успешно пополнялась материально-техническая база науки. Уже в начале 1970-х гг. Отдел приобрел зарубежные спектрофотометры, спектрофлуориметры, хроматографы, центрифуги, включая аналитические, рефрижераторные и суперцентрифуги, биохимические лаборатории, лабораторию органического синтеза, вирусологическую лабораторию, автоматический анализатор аминокислот, полярографы и многое другое. Таким образом, уже тогда, в 1970-е годы, по уровню технической оснащенности Отдел не уступал аналогичным учреждениям биологического профиля АН СССР.

Высокую активность показывала рационализаторская работа. Так, к примеру, в 1978 г. было подано 56 рационализаторских предложений, внедрено — 50. В том же году на базе Отдела организована работа кружков биохимии, биофизики и молекулярной биологии для школьников. В 2019 г. начала работу школа «Юный биохимик» как форма подготовки перспективного кадрового резерва научных работников в области биохимии и молекулярной биологии, начиная со школьной скамьи.

Активное участие Институт принимал в работе Всесоюзного общества «Знание». Только в 1990 г. по линии этого общества учеными Института была прочитана 271 лекция.

По инициативе Ю.М. Островского на базе Отдела на регулярной основе была организована школа-семинар по биохимии, где с докладами выступали ведущие ученые СССР из Москвы, Ленинграда, Минска, Вильнюса, Киева, Харькова, ПНР — Белостока, Варшавы, Кракова, Лодзя, Финляндии — Хельсинки, Швеции — Стокгольма, Италии — Триеста, ФРГ — Йены и др.

Институтом установлены широкие международные творческие связи с организациями в Австрии (Украинский противораковый институт, г. Вена), Великобритании (Оксфордский университет; Кембриджский университет; Институт гликобиологии, г. Оксфорд), Венгрии (Будапештский медицинский университет), Германии (Университет имени Фридриха Шиллера, г. Йена; Геттингенский университет; Институт биохимии Фрайбургского университета; Институт патологической биохимии, г. Йена; фирма «Йенафарм»), Италии (Университет г. Триест; Институт общей патологии, г. Турин; Римский университет), Латвии (Рижский медицинский институт), Литве (НИИ экспериментальной и клинической медицины Минздрава ЛатССР, г. Вильнюс), Польше (Ягеллонский университет, г. Краков; Институт экспериментальной биологии Польской академии наук, г. Варшава; Институт биологии Варшавского университета, г.

Белосток; Институт экспериментальной биологии им. М.Ненцкого, г. Варшава; Медицинская академия, г. Белосток; Университет, г. Лодзь; Институт биофизики Университета, г. Лодзь; Центр онкологии — Институт имени Марии Склодовской-Кюри, г. Гливице; фирма «Тимофарм», г. Варшава; фирма «Шеринг», г. Варшава; фирма «Бетулянд», г. Варшава), США (Национальный институт рака, г. Бетезда; Высшая медицинская школа Индианского университета, г. Индианаполис; Алкогольный исследовательский центр Университета штата Колорадо, г. Денвер; Университет штата Огайо, г. Колумбус; Университет г. Нью-Йорка), Финляндии (Национальный институт здоровья, г. Хельсинки; Университет г. Турку; Биомедицинский исследовательский центр фирмы «Алко», г. Хельсинки), Чехии (Институт микробиологии АН Чехии, г. Прага), Японии (Университет г. Осака; Лаборатория диагностики врожденных нарушений метаболизма, г. Мацуока) и др.

Налажено сотрудничество с рядом международных научных обществ:

- Международным обществом по биохимии и молекулярной биологии (IUBMB);
- Международным обществом по изучению ксенобиотиков (ISSX);
- Международным обществом по биомедицинским исследованиям алкоголизма (ISBRA);
- Европейским обществом по биомедицинским исследованиям алкоголизма (ESBRA);
- Федерацией европейских биохимических обществ (FEBS);
- Европейским обществом клинических исследований (ESBRA);
- Европейским обществом биохимической фармакологии (ESBP);
- Европейской ассоциацией по изучению печени (EASL);
- Европейской конвенцией пивоварения (EBC).

Для проведения исследований в Институте отработаны экспериментальные модели стрептозотоцинового и аллоксанового диабета, алиментарного ожирения и сахарного диабета 2-го типа, острой и хронической алкогольной интоксикации, алкогольного абстинентного синдрома, алкогольных и неалкогольных стеатогепатитов, иных гепатитов неинфекционной этиологии, холестаза, фиброза и цирроза печени, гепатэктомии, эмоционального, холодового и иммобилизационного стресса, стрессорных кардиопатий, инфаркта миокарда, йоддефицитных и нейродегенеративных заболеваний, витаминдефицитных состояний (окситиаминовый авитаминоз и др.), гиперкапнической и гипобарической гипоксии, ишемии-реперфузии головного мозга, механических и ожоговых кожных ран, трансплантации кожи, физических нагрузок и др.

Благодаря трудолюбию, целеустремленности, организованности, высоким профессиональным качествам за прошедшие 50 лет коллектив Института добился значительных успехов в области разработки актуальных медико-биологических проблем витаминологии и алкогольной зависимости, аминокислотного направления, биохимии злокачественного роста, а также в некоторых других областях биохимии. На базе Института и с его участием подготовлено и защищено 188 диссертаций, получено свыше 80 авторских свидетельств СССР и патентов Республики Беларусь и Российской Федерации на изобретения, издано около 50 монографий. Список журналов, в которых опубликованы результаты научных исследований и разработок ученых Института, включает более 130 наименований, из них свыше 60 — на иностранных языках.

Достижения ученых Института отмечены премиями НАН Беларуси:

академик Ю. М. Островский — *за цикл работ по метаболизму тиамина (1995, посмертно)*;  
профессор В. В. Виноградов — *за цикл работ по фундаментальным аспектам адаптации (стресса) (1999)*;

профессор В. У. Буко и к.б.н. О. Я. Лукивская — *за цикл работ «Разработка современных методов коррекции патологии печени и ассоциированных с ней внепеченочных заболеваний» (2008)*.

Профессор В. У. Буко награжден международной премией Хорезми (Исламская Республика Иран, 2013) *за серию работ «Фундаментальные подходы к фармакологической коррекции патологии печени и ассоциированных внепечёночных заболеваний».*

За время существования Института в нем сформировалось несколько научных школ, общим основателем которых является академик Ю. М. Островский. Это школы коферментной витаминологии и нутрициологии члена-корреспондента А. Г. Мойсеенка, некоферментной витаминологии профессора В. В. Виноградова, экспериментальной гепатопатологии и гепатоассоциированных внепеченочных заболеваний профессора В. У. Буко, нейрохимии и нейроморфологии алкоголизма профессора С. М. Зиматкина, биохимии и фармакологии аминокислот и их производных профессора Л. И. Нефедова, энзимологии профессора А. И. Воскобоева, биохимии злокачественного роста профессора Р. В. Требухиной.

Из 188 выполненных и защищенных диссертаций — 36 докторских и 152 кандидатские. По витаминной тематике выполнено 12 докторских и 83 кандидатских диссертации, по алкогольной — 8 докторских и 22 кандидатских диссертации. Итого по двум основным «брендовым» направлениям научной деятельности Института подготовлено и защищено 20 докторских и 105 кандидатских диссертаций, т.е. 66,5% от общего количества диссертаций. Остальные диссертации (16 докторских и 47 кандидатских) выполнены и защищены в рамках иных направлений научной деятельности Института, в частности, аминокислотного и онкологического. Самым плодотворным оказался 1990 год, когда было защищено 13 диссертаций — 3 докторские и 10 кандидатских.

Упомянутые 188 диссертаций защищены в 16 городах 6 стран — Беларуси, России, Украины, Эстонии, Литвы и Польши:

- 74 — в Минске
- 29 — в Гродно
- 29 — в Москве
- 15 — в Ленинграде
- 14 — в Смоленске
- 11 — в Вильнюсе
- 6 — в Киеве
- 2 — в Харькове
- 1 — в Боровске
- 1 — в Варшаве
- 1 — в Витебске
- 1 — в Гомеле
- 1 — в Казани
- 1 — в Одессе
- 1 — в Тарту
- 1 — в Челябинске

**Таблица 1. Докторские и кандидатские диссертации по витаминной тематике, выполненные на базе Института и с участием Института (1970-2020)**

№	Докторские диссертации
<b>1983</b>	
1.	<b>Виноградов В.В.</b> <i>Гормональные механизмы метаболического действия тиамина.</i> — Минск, 1983.
2.	<b>Воскобоев А.И.</b> <i>Ферменты биосинтеза, протеидизация и механизмы транспорта фосфорных эфиров тиамина.</i> — Москва, 1983.

<b>1984</b>	
3.	<b>Требухина Р.В.</b> Особенности метаболизма тиамина в организме при росте злокачественных опухолей. — Минск, 1984.
<b>1985</b>	
4.	<b>Струмило С.А.</b> Полиферментные комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот надпочечных желез (роль, свойства, регуляция). — Ленинград, 1985.
<b>1987</b>	
5.	<b>Горбач З.В.</b> Биохимические механизмы регуляции обмена углеводов в печени при недостаточности тиамина. — Москва, 1987.
<b>1990</b>	
6.	<b>Ларин Ф.С.</b> Обмен липидов при различных вариантах недостаточности витамина В <sub>1</sub> . — Минск, 1990.
<b>1991</b>	
7.	<b>Бушма М.И.</b> Витамины Е, фолиевая кислота и РР как активаторы гидроксиллирующей, глюкуро- и глутатионконъюгирующей систем печени. — Москва, 1991.
<b>1994</b>	
8.	<b>Дорофеев Б.Ф.</b> Исследование токсикологических и фармакокинетических свойств производных пантотеновой кислоты. — Москва, 1994.
<b>1996</b>	
9.	<b>Черникевич И.П.</b> Ферментные системы биотрансформации активных форм витамина В <sub>1</sub> (структура, свойства, регуляция). — Минск, 1996.
10.	<b>Мойсеенок А.Г.</b> Биосинтез кофермента А в метаболической активности производных пантотеновой кислоты. — Москва, 1996.
<b>1999</b>	
11.	<b>Водоевич В.П.</b> Витаминокоррекция стресса в клинике внутренних болезней. — Смоленск, 1999.
<b>2008</b>	
12.	<b>Макарчиков А.Ф.</b> Тиаминтрифосфат и ферменты его гидролиза в биологических объектах. — Минск, 2008.
<b>Кандидатские диссертации</b>	
<b>1970</b>	
1.	<b>Мажуль А.Г.</b> О возможном характере взаимодействия производных тиамина с пиридоксальными ферментами. — Вильнюс, 1970.
<b>1971</b>	
2.	<b>Горенштейн Б.И.</b> Характеристика острых авитаминозов В <sub>1</sub> , вызываемых окситиамином и пиритиамином. — Гродно, 1971.
3.	<b>Мойсеенок А.Г.</b> Изучение межвитаминных взаимоотношений: тиамин и пантотеновая кислота. — Вильнюс, 1971.
4.	<b>Нижегородова О.И.</b> Обмен витамина В <sub>1</sub> у больных с лейкозами до и после комплексного лечения. — Смоленск, 1971.
5.	<b>Садовник М.Н.</b> Активность тиазолового цикла тиамина и его роль для связывания витамина В <sub>1</sub> тканями. — Минск, 1971.
<b>1973</b>	
6.	<b>Балаклеевская В.Г.</b> Сравнительная оценка действия различных производных тиамина на показатели углеводного обмена (транскетолазу, пировиноградную и молочную кислоты) при сахарном диабете. — Смоленск, 1973.
7.	<b>Михальцевич Г.Н.</b> Взаимоотношения тиамина и никотиновой кислоты в животном организме. — Минск, 1973.
<b>1974</b>	
8.	<b>Кравченя Н.А.</b> Антивитаминная активность различных производных окситиамина. — Минск, 1974.
<b>1975</b>	
9.	<b>Кочурко С.Н.</b> Значение фосфорилированных производных тиамина в коррекции нарушений липидного обмена при сахарном диабете. — Смоленск, 1975.

10.	<b>Кузнецов Б.К.</b> Изучение действия ультразвука на тиамин, тиаминдифосфат и пируватдекарбоксилазу. — Минск, 1975.
11.	<b>Степуро И.И.</b> Физико-химические характеристики взаимодействия тиамина и тиаминдифосфата с некоторыми аминокислотами и дрожжевой пируватдекарбоксилазой. — Минск, 1975.
12.	<b>Струмило С.А.</b> Взаимодействие витаминов PP и B <sub>1</sub> в регуляции ферментов пентозофосфатного пути обмена углеводов при различных функциональных состояниях гипофиз-адреналовой системы. — Вильнюс, 1975.
<b>1976</b>	
13.	<b>Ассанович А.Т.</b> Содержание тиамина и пировиноградной кислоты у больных синингомиелией и их динамика в процессе рентгенотерапии. — Ленинград, 1976.
14.	<b>Гриневиц В.П.</b> Взаимодействие дисульфидных производных тиамина с биологически активными природными тиолами и дисульфидами. — Минск, 1976.
15.	<b>Мандрик К.А.</b> Состояние энергетического обмена при различной функции гипофиз-адреналовой системы у животных с недостаточностью или дополнительным введением тиамина. — Минск, 1976.
<b>1977</b>	
16.	<b>Буко В.У.</b> Изучение роли тиамина и некоторых его производных (окситиамин, тиохром) в регуляции обмена жирных кислот. — Минск, 1977.
17.	<b>Горбач З.В.</b> К механизму действия окситиамина на обмен нуклеиновых кислот в печени крыс. — Минск, 1977.
18.	<b>Черникевич И.П.</b> Изучение тиаминпирофосфокиназы из пивных дрожжей. — Минск, 1977.
<b>1978</b>	
19.	<b>Арцукевич И.М.</b> Исследование свойств высокоочищенной тиаминпирофосфокиназы из печени крыс. — Минск, 1978.
20.	<b>Пронько П.С.</b> Анализ взаимоотношений тиамина и фосфогидролазы моноэфиров ортофосфорной кислоты <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> . — Минск, 1978.
<b>1979</b>	
21.	<b>Нефедов Л.И.</b> Свободные аминокислоты тканей крыс при различной обеспеченности организма тиамином. — Минск, 1979.
22.	<b>Тарасов Ю.А.</b> Механизмы взаимовлияний витамина PP и функции коры надпочечников. — Минск, 1979.
23.	<b>Якубчик Т.Н.</b> Особенности обмена пирувата в печени крыс при различной обеспеченности организма тиамином. — Москва, 1979.
<b>1980</b>	
24.	<b>Дворянинович Л.Н.</b> Особенности иммуногенеза при B <sub>1</sub> -авитаминозе, вызванном окситиамином. — Киев, 1980.
25.	<b>Дорофеев Б.Ф.</b> Нейротропная активность некоторых производных и структурных аналогов гамма-аминомасляной и пантотеновой кислот. — Минск, 1980.
26.	<b>Зиматкина Т.И.</b> Изучение антивитаминой активности новых дисульфидных производных окситиамина. — Минск, 1980.
27.	<b>Индушко Г.И.</b> Биосинтез белка в митохондриях печени животных при введении окситиамина. — Минск, 1980.
<b>1981</b>	
28.	<b>Будько Т.Н.</b> Особенности обмена кобаламинов при введении производных пантотеновой кислоты у животных на сбалансированном и витаминдефицитном рационах. — Вильнюс, 1981.
29.	<b>Величко М.Г.</b> Особенности обмена лактата и пирувата в тканях крыс при развитии неоплазмы и применении окситиамина. — Москва, 1981.
30.	<b>Павленя А.К.</b> Обмен фосфолипидов при различной обеспеченности организма животных тиамином. — Минск, 1981.
31.	<b>Сушко Л.И.</b> Роль витамина B <sub>1</sub> в гидроксировании чужеродных веществ. — Минск, 1981.
<b>1982</b>	
32.	<b>Воронов Г.Г.</b> Коррекция альфа-токоферолом нарушения гидроксимирующей функции печени при ишемии и в постшемическом периоде. — Смоленск, 1982.

33.	<b>Карась Я.Ю.</b> <i>Терапевтическая и метаболическая эффективность препаратов тиамин при ревматизме.</i> — Вильнюс, 1982.
34.	<b>Наумов А.В.</b> <i>Биосинтез белка и обмен лейцина в печени крыс при моделировании авитаминоза В<sub>1</sub> окситиамином.</i> — Минск, 1982.
35.	<b>Островский В.Ю.</b> <i>Взаимодействие гексенала и виадрила с сывороточным альбумином и потенцирование наркоза пиридоксальфосфатом.</i> — Смоленск, 1982.
<b>1983</b>	
36.	<b>Аверин В.А.</b> <i>Транспорт тиамин через биологические мембраны.</i> — Вильнюс, 1983.
37.	<b>Гриценко Э.А.</b> <i>Уровень коферментной формы витамина В<sub>1</sub> при различной обеспеченности организма животных тиамин.</i> — Вильнюс, 1983.
38.	<b>Лашак Л.К.</b> <i>Окислительные реакции пентозофосфатного пути при различной обеспеченности организма витаминами РР и В<sub>1</sub>.</i> — Вильнюс, 1983.
39.	<b>Мартинчик А.П.</b> <i>Некоторые показатели обмена пантотеновой кислоты и ее взаимосвязи с метаболизмом тиамин при сахарном диабете.</i> — Киев, 1983.
40.	<b>Маскевич С.А.</b> <i>Спектрально-люминесцентные свойства производных тиамин, пировиноградной кислоты и их комплексов с ионами двухвалентных металлов в растворах.</i> — Минск, 1983.
<b>1984</b>	
41.	<b>Забродская С.В.</b> <i>Тетрагидротиамин, его фосфорилированные производные и действие их на активность тиаминзависимых ферментов в тканях животных.</i> — Минск, 1984.
42.	<b>Маглыш С.С.</b> <i>Свойства б-фосфоглюконатдегидрогеназы печени крыс и ее роль в регуляции гексозомонофосфатного пути при В<sub>1</sub>-недостаточности у животных.</i> — Харьков, 1984.
43.	<b>Овчинников В.А.</b> <i>Обмен пантотеновой кислоты при воздействии ионизирующей радиации.</i> — Киев, 1984.
44.	<b>Петушок В.Г.</b> <i>Обмен триозофосфатов при различной обеспеченности организма тиамин.</i> — Москва, 1984.
45.	<b>Хоха А.М.</b> <i>Биосинтез РНК в ядрах печени животных при недостаточности витамина В<sub>1</sub>.</i> — Москва, 1984.
<b>1985</b>	
46.	<b>Бородинский А.Н.</b> <i>Действие окситиамина на обмен гексозомонофосфатов печени.</i> — Минск, 1985.
47.	<b>Лучко В.С.</b> <i>Изучение тиаминдифосфаткиназы печени крыс и пивных дрожжей.</i> — Москва, 1985.
48.	<b>Смирнов Ю.В.</b> <i>Лекарственно-метаболическая функция печени при гипербарической оксигенации и коррекция её нарушения альфа-токоферолом.</i> — Смоленск, 1985.
<b>1986</b>	
49.	<b>Караедова Л.М.</b> <i>Состояние цикла трикарбоновых кислот при введении антимаболита витамина В<sub>1</sub> окситиамина.</i> — Ленинград, 1986.
50.	<b>Пузач С.С.</b> <i>Механизмы регуляции обмена тиамин и В<sub>1</sub>-зависимых ферментных систем в органах мышей тиаминазой I из различных источников.</i> — Ленинград, 1986.
51.	<b>Туманов В.Н.</b> <i>Биохимические аспекты специфической адаптации к тиаминному дефициту.</i> — Москва, 1986.
52.	<b>Шейбак В.М.</b> <i>Влияние специфических и неспецифических факторов на соотношение уровня кофермента А, ацил-КоА и предшественников кофермента в печени животных на сбалансированном и пантотенатдефицитном рационах.</i> — Минск, 1986.
<b>1987</b>	
53.	<b>Денисенко В.А.</b> <i>Механизмы регуляции активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы печени крыс при витамин В<sub>1</sub>-недостаточности.</i> — Москва, 1987.
54.	<b>Кубышин В.Л.</b> <i>Регуляция активности транскетолазы в печени при витамин В<sub>1</sub>-недостаточности у крыс.</i> — Харьков, 1987.
55.	<b>Солодунов А.А.</b> <i>Обратимое и необратимое взаимодействие пиридоксаль-5-фосфата с сывороточным альбумином.</i> — Ленинград, 1987.
<b>1989</b>	
56.	<b>Забелин Н.Н.</b> <i>Структура и антифибринолитическая активность амидов пантотеновой и никотиновой кислот с аналогами ε-аминокапроновой кислоты.</i> — Минск, 1989.

<b>1990</b>	
57.	<b>Заводник Л.Б.</b> Влияние никотинамида и диэтилникотинамида (кордиамина) на ксенобиотико-метаболическую функцию монооксигеназной системы печени (экспериментально-клиническое исследование). — Минск, 1990.
58.	<b>Легонькова Л.Ф.</b> Влияние витаминов РР, В <sub>с</sub> и Е на процессы конъюгации ксенобиотиков с глюкокуроновой кислотой и глутатионом. — Киев, 1990.
<b>1991</b>	
59.	<b>Кравчук Р.И.</b> Тиаминдифосфатзависимые ферменты в регенерирующей печени крыс при гиповитаминозе В <sub>1</sub> . — Смоленск, 1991.
<b>1992</b>	
60.	<b>Коновалова Н.В.</b> Взаимодействие гемоглобина человека с пиридоксаль-5-фосфатом. — Минск, 1992.
61.	<b>Коноваленко О.В.</b> Пируваткиназа печени и её роль в регуляции гликолиза у крыс при витамин В <sub>1</sub> недостаточности. — Смоленск, 1992.
<b>1993</b>	
62.	<b>Макарчиков А.Ф.</b> Выделение, очистка, физико-химические и кинетические свойства тиамиинтрифосфатазы мозга быка. — Смоленск, 1993.
63.	<b>Фомин К.А.</b> Функциональное состояние печени и его коррекция витамином Н у больных воспалительными заболеваниями желчного пузыря до и после оперативного вмешательства. — Минск, 1993.
64.	<b>Хомич Т.И.</b> Молекулярные механизмы регуляции и кинетические свойства пантотенаткиназы печени крыс. — Минск, 1993.
<b>1995</b>	
65.	<b>Мотылевич Ж.В.</b> Противоопухолевая активность металлоорганических комплексов окситиамина с солями платины (IY), палладия (II), родия (II). — Смоленск, 1995.
<b>1999</b>	
66.	<b>Зверинский И.В.</b> Влияние фолиевой кислоты на ксенобиотико-метаболическую функцию монооксигеназной системы печени (экспериментально-клиническое исследование). — Минск, 1999.
67.	<b>Слышенков В.С.</b> Защитное действие пантотеновой кислоты и ее производных в условиях повреждения клеток и тканей свободными радикалами. — Варшава, 1999.
68.	<b>Соколовская С.Н.</b> Антиоксидантные свойства сывороточного альбумина человека и его комплексов с пиридоксаль-5-фосфатом. — Минск, 1999.
<b>2000</b>	
69.	<b>Петушок Н.Э.</b> Глутатионовая система при воздействии фенола, формальдегида и $\gamma$ -излучения. Возможности коррекции витаминами А, Е и пантенолом. — Гродно, 2000.
<b>2002</b>	
70.	<b>Баранозская А.Б.</b> Уздзеянне рэнтгенаэскага апраменьвання на структуры скуры эктадэर्मальнага паходжання і іх радыялэратэцыя пантэнолам. — Мінск, 2002.
71.	<b>Нарута Е.Е.</b> Исследование гиполлипидемической активности производных пантотеновой кислоты при различных типах ожирения. — Гродно, 2002.
<b>2003</b>	
72.	<b>Гуринович В.А.</b> Биотрансформация и протеидизация производных пантотеновой кислоты в печени животных. — Гродно, 2003.
<b>2004</b>	
73.	<b>Алексо Е.Н.</b> Показатели обеспеченности аскорбиновой кислотой больных туберкулезом и саркоидозом органов дыхания в современных условиях и пути коррекции выявленных нарушений. — Минск, 2004.
74.	<b>Гуляй И.Э.</b> Ферменты гидролиза тиамиинтрифосфата в клетках бактерий, растений и животных. — Гродно, 2004.
75.	<b>Иоскевич Н.Н.</b> Комплексное лечение ишемического и реперфузионно-реоксигенационного синдромов при атеросклеротическом поражении артерий бедренно-подколенно-берцового сегмента. — Гродно, 2004.
76.	<b>Русина И.М.</b> Множественные формы тиамиинтрифосфатазы в почках быка. — Гродно, 2004.

<b>2007</b>	
77.	<b>Ровбуть Т.И.</b> Показатели витаминной обеспеченности и окислительного стресса у детей Гродненской и Гомельской областей Беларуси. — Гродно, 2007.
<b>2009</b>	
78.	<b>Пырочкин А.В.</b> Функциональное состояние эндотелия и артериальная жесткость у пациентов с ишемической болезнью сердца, перенесших инфаркт миокарда, возможности коррекции в условиях комплексной патогенетической терапии. — Минск, 2009.
<b>2016</b>	
79.	<b>Томашева Е.В.</b> Каталитические свойства транскетолазы печени крыс и её роль в регуляции метаболизма фосфонентоз. — Минск, 2016.
80.	<b>Сутько И.П.</b> 5-Формилтетрагидрофолат как регулятор монооксигеназной системы эндоплазматического ретикулума печени. — Гродно, 2016.
81.	<b>Туманов А.В.</b> Разработка способов коррекции стрессорных повреждений щитовидной железы и сердца крыс. — Минск, 2016.
<b>2019</b>	
82.	<b>Колос И.К.</b> Содержание производных тиамина и свойства ферментов их метаболизма в органах и тканях кур. — Гродно, 2019.
<b>2020</b>	
83.	<b>Семенович Д.С.</b> Окислительно-восстановительный баланс глутатиона в головном мозге крыс при экспериментальном нейротоксикозе и его коррекция производными пантотеновой кислоты. — Гродно, 2020.

**Таблица 2. Докторские и кандидатские диссертации по алкогольной тематике, выполненные на базе Института и с участием Института (1970-2020)**

№	Докторские диссертации
<b>1990</b>	
1.	<b>Буко В.У.</b> Взаимоотношения этанола и ацетальдегида с простагландиновой системой в печени. — Ленинград, 1990.
2.	<b>Зиматкин С.М.</b> Альдегиддегидрогеназная система мозга: связь с устойчивостью и влечением к алкоголю. — Москва, 1990.
<b>1992</b>	
3.	<b>Лелевич В.В.</b> Роль нарушений углеводно-энергетического обмена головного мозга в патогенезе экспериментального алкоголизма. — Москва, 1992.
<b>1996</b>	
4.	<b>Селевич М.И.</b> Нарушения липидного обмена в печени и головном мозге при алкогольной интоксикации и его коррекция. — Гродно, 1996.
<b>1998</b>	
5.	<b>Хоха А.М.</b> Биохимические механизмы нарушения гормонпродуцирующей функции семенников при алкогольной интоксикации. — Москва, 1998.
6.	<b>Шейбак В.М.</b> Свободные аминокислоты и кофермент А в механизмах реализации биологической активности этанола. — Москва, 1998.
<b>2000</b>	
7.	<b>Канунникова Н.П.</b> Роль ГАМК в механизмах действия этанола в мозге. — Минск, 2000.
<b>2005</b>	
8.	<b>Пронько П.С.</b> Роль ацетальдегида в механизмах метаболической адаптации организма к алкогольной интоксикации. — Гомель, 2005.
Кандидатские диссертации	
<b>1975</b>	
1.	<b>Мартинчик А.Н.</b> Изучение влияния алкогольной интоксикации на некоторые стороны обмена тиамина. — Москва, 1975.
<b>1981</b>	
2.	<b>Баньковский А.А.</b> Диссертация ДСП. — Ленинград, 1981.

3.	<b>Сагановская В.И.</b> <i>Состояние альдегиддегидрогеназ печени и мозга крыс при предпочтении этанола и алкогольной интоксикации.</i> — Минск, 1981.
<b>1982</b>	
4.	<b>Островский С.Ю.</b> <i>Особенности обмена аминокислот у животных с различной алкогольной мотивацией.</i> — Минск, 1982.
<b>1983</b>	
5.	<b>Селевич М.И.</b> <i>Особенности метаболизма липидов у крыс, предпочтительно потребляющих воду или этанол.</i> — Ленинград, 1983.
6.	<b>Цвербаум Е.А.</b> <i>Обмен пантотеновой кислоты у больных хроническим алкоголизмом (клинико-экспериментальное исследование).</i> — Челябинск, 1983.
<b>1984</b>	
7.	<b>Лелевич В.В.</b> <i>Особенности начальных реакций гликолиза в печени крыс с различной алкогольной мотивацией.</i> — Минск, 1984.
<b>1985</b>	
8.	<b>Петров В.Н.</b> <i>Комплексное лечение больных алкогольным делирием с применением пантотената кальция и пантетина.</i> — Москва, 1985.
9.	<b>Чумакова О.В.</b> <i>Холинергическая система мозга в механизмах предпочтения и толерантности к этанолу.</i> — Киев, 1985.
<b>1989</b>	
10.	<b>Кедров-Зихман В.О.</b> <i>НАДН-окисляющие комплексы и особенности липидного состава митохондрий печени крыс, предпочитающих этанол или воду.</i> — Ленинград, 1989.
<b>1994</b>	
11.	<b>Бардина Л.Р.</b> <i>Системы обмена этанола и механизмы формирования толерантности к этанолу.</i> — Минск, 1994.
12.	<b>Винницкая А.Г.</b> <i>Алкогольная интоксикация и ферменты метаболизма ГАМК в мозге при действии некоторых нейроактивных соединений.</i> — Минск, 1994.
13.	<b>Воронов П.П.</b> <i>Этанолметаболизирующие системы семенников человека.</i> — Смоленск, 1994.
14.	<b>Дорошенко Е.М.</b> <i>Формирование фонда биогенных аминов и нейроактивных аминокислот в головном мозге крыс при алкогольной интоксикации и отмене этанола.</i> — Минск, 1994.
15.	<b>Кашко М.Ф.</b> <i>Перекисное окисление липидов и биосинтез тестостерона в семенниках крыс при острой и хронической алкогольной интоксикации.</i> — Смоленск, 1994.
16.	<b>Лукивская О.Я.</b> <i>Характеристика обмена кетоновых тел в тканях крыс при хронической алкогольной интоксикации.</i> — Смоленск, 1994.
<b>1995</b>	
17.	<b>Быков И.Л.</b> <i>Метаболические эффекты этаноламина при алкогольной интоксикации и отмене этанола у крыс.</i> — Минск, 1995.
<b>1998</b>	
18.	<b>Мальцев А.Н.</b> <i>Механизмы гепатопротективного действия эссенциальных фосфолипидов и простагландина E<sub>2</sub> при алкогольном поражении печени.</i> — Москва, 1998.
<b>1999</b>	
19.	<b>Герашенко Д.Ю.</b> <i>Особенности обмена эндогенного ацетальдегида в организме животных при различных метаболических состояниях.</i> — Гродно, 1999.
<b>2001</b>	
20.	<b>Пивоварчик М.В.</b> <i>Опиоидные рецепторы среднего мозга и дофаминовая система стриатума в механизмах адаптации крыс к этанолу.</i> — Гродно, 2001.
21.	<b>Чумаченко С.С.</b> <i>Адренкортикальная система на начальных этапах развития толерантности к наркотическому действию этанола у крыс.</i> — Гродно, 2001.
<b>2005</b>	
22.	<b>Кузьмич А.Б.</b> <i>Метаболические эффекты ацетальдегида и его распределение в тканях животных при алкогольной интоксикации.</i> — Гродно, 2005.

**Таблица 3. Докторские и кандидатские диссертации по аминокислотной и иным тематикам, выполненные на базе Института и с участием Института (1970-2020)**

№	Докторские диссертации
<b>1971</b>	
1.	<b>Разумович А.Н.</b> <i>Энергетический обмен при старении организма в тканях с различной функциональной специализацией.</i> — Вильнюс, 1971.
<b>1974</b>	
2.	<b>Кухта В.К.</b> <i>Некоторые метаболические механизмы компенсации кровообращения при хирургическом лечении митрального стеноза.</i> — Вильнюс, 1974.
<b>1987</b>	
3.	<b>Гидранович В.И.</b> <i>Сравнительная характеристика гликолиза и пентозофосфатного пути в эндокринных железах крупного рогатого скота.</i> — Боровск, 1987.
<b>1988</b>	
4.	<b>Гордеев Я.Я.</b> <i>Клинико-патогенетические основы диагностики и лечения рассеянного склероза.</i> — Ленинград, 1988.
<b>1993</b>	
5.	<b>Нефёдов Л.И.</b> <i>Формирование фонда свободных аминокислот и их производных в условиях метаболического дисбаланса.</i> — Минск, 1993.
6.	<b>Островский А.А.</b> <i>Морфологический анализ регенераторного потенциала эпидермиса в условиях отслойки и трансплантации.</i> — Москва, 1993.
<b>1996</b>	
7.	<b>Опарин Д.А.</b> <i>Соли тиофталилия. Синтез, строение, свойства.</i> — Минск, 1996.
<b>1997</b>	
8.	<b>Галицкий Э.А.</b> <i>Транскортин крови: свойства, функциональная роль при стрессовом состоянии организма.</i> — Москва, 1997.
9.	<b>Заводник И.Б.</b> <i>Механизмы повреждений эритроцитов.</i> — Минск, 1997.
<b>1998</b>	
10.	<b>Величко М.Г.</b> <i>Стереоизомеры лактата и альдегидметаболизирующие системы в условиях онкопатологии.</i> — Москва, 1998.
11.	<b>Дмитриев А.Л.</b> <i>Электрофизиологические и метаболические процессы при болевом синдроме и гипокинезии: обоснование принципов коррекции.</i> — Москва, 1998.
<b>2000</b>	
12.	<b>Климович И.И.</b> <i>Облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей и роль свободных аминокислот и их производных в патогенезе и лечении.</i> — Минск, 2000.
<b>2001</b>	
13.	<b>Данченко Е.О.</b> <i>Цитотоксичность гепатотропных препаратов и восстановительные процессы в печени.</i> — Гродно, 2001.
14.	<b>Углыница К.Н.</b> <i>Противоопухолевая эффективность препарата Украин (клинико-экспериментальное исследование).</i> — Минск, 2001.
<b>2003</b>	
15.	<b>Басинский В.А.</b> <i>Патоморфоз заболеваний щитовидной железы у жителей Гродненской области (Беларусь).</i> — Минск, 2003.
<b>2012</b>	
16.	<b>Надольник Л.И.</b> <i>Свободнорадикальные процессы и метаболизм йода в клетках щитовидной железы: фундаментальные и прикладные аспекты.</i> — Минск, 2012.
<b>Кандидатские диссертации</b>	
<b>1971</b>	
1.	<b>Царикович В.С.</b> <i>Активность трансаминаз и уровень общего аминокислотного азота у больных псориазом в коже, чешуйках и сыворотке крови в разные периоды болезни при различных методах лечения.</i> — Минск, 1971.
<b>1978</b>	
2.	<b>Зеньков Л.И.</b> <i>Мет- и сульфгемоглобинообразование у хирургических больных.</i> — Москва, 1978.
<b>1979</b>	

3.	<b>Абакумов Г.З.</b> Противогипоксическая активность и механизм действия комбинаций аденозина с никотинамидом и НАД, апрессина с анаприлином и дипразином. — Казань, 1979.
4.	<b>Бушма М.И.</b> Фармакологическая активность уридина и цитидина. — Тарту, 1979.
<b>1981</b>	
5.	<b>Сенкевич С.Б.</b> Очистка и изучение свойств пируватдегидрогеназного комплекса из митохондрий коры надпочечников быка. — Вильнюс, 1981.
<b>1982</b>	
6.	<b>Гачко Г.А.</b> Электронная структура и люминесцентные свойства производных пиримидина в органических и водносолевых растворах. — Минск, 1982.
7.	<b>Эраносьян Т.К.</b> Метаболическая активность среднеминерализованных хлоридных натриевых минеральных вод при патологии гепатобилеарной системы. — Одесса, 1982.
<b>1983</b>	
8.	<b>Яковлева Г.М.</b> Фосфорорганические аналоги промежуточных соединений ферментативных превращений аминокислот как ингибиторы ферментативных реакций. — Москва, 1983.
<b>1984</b>	
9.	<b>Таранда Н.И.</b> Очистка, характеристика, расщепление оксоглутаратдегидрогеназного комплекса из надпочечников быка и свойства его периферических ферментов. — Минск, 1984.
<b>1985</b>	
10.	<b>Заводник И.Б.</b> Физико-химические свойства пируватдекарбоксилазы и ее субстрата в реакциях ферментативного и фотохимического декарбоксилирования. — Минск, 1985.
11.	<b>Немеря Н.С.</b> Особенности холофермент-субстратного взаимодействия пируватдегидрогеназы из грудной мышцы голубя. — Москва, 1985.
<b>1986</b>	
12.	<b>Арцукевич А.Н.</b> Комплексы ионов $Cu$ и $Zn$ с нативным и модифицированным альдегидами сывороточным альбумином. — Минск, 1986.
13.	<b>Дорошкевич Н.А.</b> Окислительный метаболизм липидов и углеводов в надпочечниках при остром стрессе. — Минск, 1986.
14.	<b>Липпо А.В.</b> Особенности мобилизации резервов кардиореспираторной системы как показатель работоспособности человека. — Минск, 1986.
<b>1987</b>	
15.	<b>Вонсович В.А.</b> Сукцинатдегидрогеназа в энергообеспечении функции печени и надпочечников крыс при стрессе. — Ленинград, 1987.
<b>1988</b>	
16.	<b>Мороз А.Р.</b> Взаимодействие биогенных альдегидов с аминокислотами и рибонуклеазой. — Минск, 1988.
<b>1989</b>	
17.	<b>Новицкий Г.К.</b> Перекисное окисление и состав липидов мембран эритроцитов при вирусном гепатите А, вирусном гепатите В и холестатическом его варианте. — Ленинград, 1989.
<b>1990</b>	
18.	<b>Белуга В.Б.</b> Оптимизация родового стресса при недостаточности кровообращения. — Минск, 1990.
19.	<b>Жлобич М.В.</b> Клиническое значение определения альдегиддегидрогеназы, лактата, пирувата в диагностике рака эндометрия. — Ленинград, 1990.
20.	<b>Киселевский Ю.В.</b> Характеристика пируватдегидрогеназного комплекса из сердца человека. — Ленинград, 1990.
21.	<b>Лапшина Е.А.</b> Термостабильность сывороточного альбумина и гемоглобина в присутствии специфических лигандов и при варьировании состава среды. — Москва, 1990.
22.	<b>Надольник Л.И.</b> Кортикостероидсвязывающий глобулин при остром и хроническом стрессе. — Киев, 1990.
23.	<b>Островцова С.А.</b> Свойства оксоглутаратдегидрогеназного комплекса из сердца человека. — Минск, 1990.
24.	<b>Чайковская Н.А.</b> Изменение физико-химических свойств сывороточного альбумина человека при его взаимодействии с глюкозой. — Минск, 1990.

25.	<b>Яроцкий Ю.В.</b> <i>Кинетические свойства и механизмы регуляции пируваткиназы коры надпочечников быка.</i> — Ленинград, 1990.
<b>1992</b>	
26.	<b>Игнатенко В.А.</b> <i>Механизмы действия ультразвука на белки крови и эритроциты.</i> — Минск, 1992.
<b>1994</b>	
27.	<b>Маслакова Н.Д.</b> <i>Направленная коррекция аминокислотного дисбаланса на этапах хирургического лечения внепеченочного холестаза.</i> — Минск, 1994.
<b>1997</b>	
28.	<b>Василевский В.П.</b> <i>Критическая ишемия нижних конечностей (коррекция регионарного кровотока и метаболических нарушений).</i> — Гродно, 1997.
29.	<b>Кулеш С.Д.</b> <i>Нейроактивные аминокислоты в остром периоде ишемического инсульта.</i> — Гродно, 1997.
<b>1998</b>	
30.	<b>Садовничий В.В.</b> <i>Характеристика влияния простагландинов на монооксигеназную систему печени крыс.</i> — Москва, 1998.
31.	<b>Смирнов В.Ю.</b> <i>Фонд свободных аминокислот и их производных при избыточном поступлении таурина и его функциональной недостаточности.</i> — Москва, 1998.
<b>1999</b>	
32.	<b>Пантюк И.В.</b> <i>Становление и развитие медицинской биохимии в Беларуси (18 в. — начало 1990 гг.).</i> — Минск, 1999.
<b>2001</b>	
33.	<b>Каравай А.В.</b> <i>Противоопухолевая активность и механизмы реализации метаболических эффектов композиции производных глутамина и фенилаланина.</i> — Минск, 2001.
34.	<b>Леднева И.О.</b> <i>Особенности метаболического статуса крыс-опухоленосителей при введении производных L-глутамина и L-фенилаланина.</i> — Гродно, 2001.
<b>2002</b>	
35.	<b>Горецкая М.В.</b> <i>Влияние дипептида «Деглутам» на функциональную и метаболическую активность лимфоцитов и макрофагов.</i> — Витебск, 2002.
36.	<b>Таюрская В.В.</b> <i>Регуляция ионами Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и H<sup>+</sup> высокоаффинного транспорта холина и мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы в синапсоммах стриатума крысы.</i> — Гродно, 2002.
<b>2004</b>	
37.	<b>Башун Н.З.</b> <i>Активность ферментов ГАМК-шунта при ишемии-реперфузии мозга.</i> — Гродно, 2004.
38.	<b>Валюк Т.Ч.</b> <i>Ферменты обмена глутамина в тканях печени и опухоли при воздействии производных 2-аминоглутаминовой кислоты.</i> — Гродно, 2004.
39.	<b>Нецецкая З.В.</b> <i>Влияние внешнего радиационного излучения на поглощение и органификацию йода в щитовидной железе крыс.</i> — Гродно, 2004.
40.	<b>Попов Ю.В.</b> <i>Гипохолестеринемические и антиатерогенные свойства эстрогенов, андрогенов и их производных в условиях экспериментальной гиперхолестеринемии.</i> — Гродно, 2004.
<b>2005</b>	
41.	<b>Гурло Н.А.</b> <i>Биохимические показатели у детей с эндокринной патологией до и после озонотерапии.</i> — Гродно, 2005.
<b>2007</b>	
42.	<b>Дремза И.К.</b> <i>Окислительные повреждения тканей пищеварительной системы и кислородсвязывающие свойства крови при эмоционально-болевым стрессе.</i> — Минск, 2007.
<b>2008</b>	
43.	<b>Лупачик С.В.</b> <i>Влияние высоких доз йода на функциональную активность щитовидной железы крыс с нормальным и сниженным глюкокортикоидным статусом.</i> — Минск, 2008.
<b>2010</b>	
44.	<b>Валентюкевич О.И.</b> <i>Прооксидантно-антиоксидантный баланс тканей крыс со сниженным тиреоидным статусом.</i> — Гродно, 2010.
<b>2014</b>	
45.	<b>Чещевик В.Т.</b> <i>Дыхательная активность митохондрий печени крыс при диабетическом и токсическом поражении и её коррекция.</i> — Минск, 2014.

2017	
46.	<b>Буко И.В.</b> Система глутатиона эритроцитов, показатели окислительного стресса и воспаления при ассоциации ишемической болезни сердца и сахарного диабета второго типа. — Гродно, 2017.
2020	
47.	<b>Ильич Т.В.</b> Регуляция функциональной активности митохондрий печени крыс комплексами включения полифенолов с $\beta$ -циклодекстринами. — Гродно, 2020.

В последнее время, после некоторого затишья, активизировалась деятельность Совета по защите диссертаций Д 01.30.01 при Институте, принимающего докторские и кандидатские диссертации по специальности 03.01.04 — биохимия (биологические науки). Только за последний год в Совете защищены 4 кандидатские и 1 докторская диссертации, несколько диссертаций находится в совете на рассмотрении.

#### **Основные достижения Института в области витаминологии.**

Витаминное направление Института начиналось с тиаминологии, т.е. детального изучения структуры и функций витамина В<sub>1</sub>, его производных, природных и синтетических антивитаминов В<sub>1</sub>. Уже в октябре 1972 г. на базе Отдела был проведен 2-й Всесоюзный симпозиум по тиамину, продемонстрировавший ведущую роль Отдела среди научных организаций СССР в изучении метаболизма и биохимических функций тиамин.

К важнейшим достижениям относится выяснение особенностей структуры и механизмов каталитической активности тиамин, тиаминдифосфата и антиметаболитов тиамин, установление роли отдельных атомов и группировок во взаимодействии с белками. В частности, изучена роль сульфидной серы тиазолового компонента тиамин в катализе тиаминдифосфатзависимых реакций, механизмы тиолдисульфидных превращений тиамин с производными серусодержащих аминокислот, пантотеином и коферментом А. Установлено, что фосфорнокислые остатки тиаминфосфатов изменяют  $\pi$ -электронную плотность атома серы и прочность  $\sigma$ -электронного остова тиазолового компонента, существенно влияют на энергию активации, изменение энтальпии, энтропии и стандартной свободной энергии реакции тиолиза у тиаминфосфатов. Фосфорнокислые остатки тиаминтрифосфата непосредственно взаимодействуют с его пиримидиновым компонентом. Доказана возможность активного управления свойствами кофермента, в частности, его активными центрами, через пирофосфатный радикал, взаимодействующий с апоферментным белком [41, 60, 74, 75].

Выделены и очищены ферменты синтеза и гидролиза фосфорных эфиров тиамин, изучены структурная организация, внутримолекулярная динамика, кинетические, физико-химические и регуляторные свойства указанных ферментов, специфичность и механизмы катализируемых ими реакций, роль в формировании внутриклеточного пула активных форм тиамин. Установлена структура и пространственная организация тиаминкиназы, функциональная роль остатков гистидина, триптофана и SH-групп в молекуле фермента, изучены его кинетические параметры. Так, например, присоединение тиамин к молекуле тиаминкиназы осуществляется по гистидиновому остатку активного центра. Ароматические аминокислоты расположены внутри белковых глобул тиаминкиназы [21, 41, 72, 109].

Получены высокоочищенные препараты тиаминпирофосфокиназы из пивных дрожжей и печени крыс, изучены свойства фермента и механизмы регуляции его активности, эффекты антивитаминов тиамин, механизмы фермент-субстратных взаимодействий. Обнаружено независимое присоединение пирувата и тиаминпирофосфата в отдельных, пространственно уда-

ленных участках активного центра пируватдекарбоксилазы, а также роль различных атомов молекулы кофермента в проявлении каталитической активности энзима [2, 18, 19].

Из сердечных мышц эмбриона и взрослого человека, а также миокарда лабораторных животных выделены компоненты 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, куда входит в качестве кофермента тиамин, охарактеризованы их свойства, особенности изменений в онто- и филогенезе, роль в регуляции обмена веществ в миокарде [40].

Исследованы механизмы трансмембранного переноса тиамина. Установлено, что этот процесс связан со специфическим белком-переносчиком, выделенным из мембран митохондрий и эритроцитов. Изучены физико-химические свойства этого белка и проницаемость различных фосфорных эфиров тиамина в митохондрии печени. Сравнительное изучение трансмембранной проницаемости тиамина и тиаминдифосфата показало, что тиаминдифосфат (действующее вещество лекарственного препарата кокарбоксилазы) не проникает через клеточные мембраны. Обосновано более целесообразное использование в клинической практике тиаминтрифосфата (или смеси тиаминфосфатов, образующейся при производстве кокарбоксилазы), который обеспечивает легкое проникновение и быстрое накопление тиаминдифосфата в клетках, более длительное его удерживание в тканях. На экспериментальных моделях сахарного диабета у животных, а также у пациентов с сахарным диабетом и ревматизмом показано, что метаболическая активность и терапевтическая эффективность тиамина и его фосфорных эфиров (тиаминмонофосфат и тиаминдифосфат) убывает в ряду тиаминдифосфат-тиаминмонофосфат-тиамин [20, 21, 41, 109].

Показано, что синтезирующийся в цитоплазме клеток под действием тиаминдифосфаткиназы тиаминтрифосфат является депонируемой формой тиамина, которая используется, в частности, для обеспечения тиаминдифосфатом митохондрий. Выяснено, что в цитоплазме тиаминдифосфат включается только в апофермент транскетолазы, а в митохондриях — исключительно в дегидрогеназы  $\alpha$ -кетокислот. Содержание свободного тиаминдифосфата составляет 80% от общего его пула в митохондриях печени и эритроцитах. Концентрация внутримитохондриального пула тиаминдифосфата не возрастает даже после инъекции тиамина в высоких дозах, что указывает на наличие системы, жестко контролирующей его трансмембранный перенос [21, 42, 43].

Сформулирована гипотеза об универсальной биологической роли тиаминтрифосфата в молекулярных механизмах адаптации клетки, доказано существование нескольких форм тиаминтрифосфатазы, изучено строение каталитического центра и механизм действия рекомбинантной тиаминтрифосфатазы разных тканей человека, выяснено, что регуляция активности тиаминтрифосфатазы осуществляется путем фосфорилирования. Высказана гипотеза о том, что тиаминтрифосфат можно рассматривать как своеобразное связующее звено между системами генерации энергии и механизмами выживания клетки в экстремальных условиях [49, 50].

Установлено, что тиамин восстанавливает тирозильные и триптофанильные радикалы, возникающие при действии ультрафиолетового излучения на тирозин, триптофан и белки, ингибирует образование дитирозина и межбелковых дитирозиновых сшивок, образование пероксидов триптофана, является ловушкой синглетного кислорода. Установлено, что тиаминазой обладают оксоферрильные формы миоглобина. Продукты обмена тиамина (тиохром и оксодигидротиохром) обладают выраженным антиоксидантным действием и защищают оптическую и сосудистую системы глаза. Проведенные исследования дают основания считать, что регулярное употребление тиамина сможет оказать профилактическое действие в отношении развития старческой катаракты и катаракты, вызванной действием ионизирующего излучения. Для лечения катаракты разработан и внедрен способ введения никотинамида в оболочку глазного яблока [69, 100, 103, 104].

Выяснено, что тиамин и его производные активно вмешиваются в обмен липидов, изменяя содержание общих липидов, а также отдельных липидных фракций (триацилглицеролы, фосфолипиды, холестерол) в различных тканях. Установлена взаимосвязь тиамина с обменом полиненасыщенных жирных кислот: добавление витамина к авитаминозной безжировой диете резко стимулирует образование арахидоновой кислоты, по-видимому, — из олеиновой. Изменения в липидном обмене под влиянием тиамина могут быть связаны, в частности, с его вмешательством в активность гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Влияние тиамина на обмен липидов может осуществляться путями, не связанными с коферментными функциями витамина [31, 48, 51].

Изучен метаболизм и функции пантотеновой кислоты, а также всех основных ее производных. Сформулирована и экспериментально обоснована концепция структуры внутриклеточного фонда и биосинтеза кофермента А как ведущего механизма реализации витаминной и фармакотерапевтической активности производных пантотеновой кислоты. Доказано существование автономных внутриклеточных систем биосинтеза кофермента А в клетках печени. Установлено, что насыщение митохондрий предшественниками кофермента А осуществляется вне зависимости от обеспеченности организма пантотеновой кислотой, комплексный метод оценки которой разработан совместно с Иркутским медицинским институтом. Идентифицированы КоА-депонирующие внутриклеточные белковые комплексы, выявлены новые закономерности регуляции пантотенаткиназы и глутатион-зависимых механизмов антиоксидантной защиты. Доказано, что профилактические и лечебные эффекты пантотеновой кислоты и ее производных при различных нарушениях жизнедеятельности (патология сосудистой системы, включая ишемические повреждения головного мозга, нейродегенеративные заболевания и др.) связаны с активацией биосинтеза кофермента А. В механизмах действия производных пантотеновой кислоты существенным является элемент ингибирования захвата ГАМК синапсами мозга с преобладающими эффектами у гомопантотеновой кислоты и пантоноилгомотаурина [33, 56-58, 97, 110, 115].

Совместно с НПО «Витамины» (г. Москва) разработаны новые пантотенат-содержащие препараты — «Пантогам» (гомпантотенат кальция), кальция пантотенат для инъекций, пантенол в таблетках, «Фосфопан» (4-фосфопантотеновая кислота), обоснованы новые показания к применению препаратов пантотеновой кислоты в медицинской практике. Расширены представления о механизмах действия гомпантотената кальция, который, как считалось, действует в неизменном виде. Оказалось, что он превращается в организме в фармакологически активный гомпантетин. Опытный образец пантогама, например, был успешно применен в 1975 г. гродненскими психиатрами у детей с отклонениями в психическом развитии. Показана эффективность фосфопана при экспериментальном сахарном диабете, полиартрите, язвенной болезни желудка и др. [57, 81].

Выявлен гиполипидемический эффект производных пантотеновой кислоты. Показана эффективность пантенола как средства профилактики и лечения реперфузионно-реоксигенационного синдрома нижних конечностей, совместного применения пантенола и карнитина в комплексном лечении пациентов с атеросклерозом нижних конечностей [5, 36].

Исследованы механизмы метаболических и функциональных связей между тиамином, пиридоксином, цианокобаламином, пантотеновой, никотиновой и липоевой кислотами, определяющих в значительной степени состояние межучточного метаболизма, возможности его целенаправленной коррекции при различных нарушениях. Сформулирована гипотеза об участии тиамина, рибофлавина и аскорбиновой кислоты в молекулярных механизмах реализации гипотензивного и антиагрегантного эффектов NO [51, 52, 66].

Показано, что комплексные препараты, содержащие витамин РР, метионин и эссенциальные фосфолипиды, активируют свободнорадикальные процессы в печени, одновременно значительно усиливая антиоксидантное и гепатозащитное действие витамина Е на фоне поражений органа факторами физической, химической и биологической природы. Комплексный препарат фосфолипидов с витамином РР более заметно, чем эссенциале, оказывает защитное действие при остром токсическом гепатите, предупреждая угнетение активности ферментов катаболизма ксенобиотиков. Диэтилникотинамид предложен в качестве активатора глюкуроконъюгирующей системы у пациентов с наследственным дефицитом активности глюкуронилтрансферазы (доброкачественная гипербилирубинемия или синдром Жильбера). Установлен эффект активации фолиевой кислотой детоксицирующей функции печени у животных и человека после ее частичной резекции, а также в постнекротическом периоде при поражении гепатотропными ядами и вирусном гепатите А. Этот витамин повышает активность монооксигеназной системы печени, увеличивая содержание цитохромов Р-450 в микросомах [12, 44, 59].

Проведены исследования, посвященные выяснению специфичности нарушений обмена веществ при алиментарной недостаточности отдельных витаминов. Установлено, например, что недостаточность тиамин приводит к значительному увеличению выделения с мочой у крыс пирувата и лактата (более чем в 30 раз при значительном дефиците тиамин), что может быть связано с уменьшением активности путей утилизации пирувата в цикле Кребса, активации гликолитического пути образования пирувата или сочетания обоих метаболических вариантов. Детально охарактеризована витаминная недостаточность, вызванная применением окситиамина, гомопантотената и ацетилпиридина. Так, например, эффекты окситиамина относительно эффектов тиамин и инсулин всегда противоположны. Окситиамин тормозит включение оротовой кислоты в рибосомальную РНК ядер печени крыс. У мышей с инсулиннезависимым диабетом и ожирением окситиамин оказывает гипополипидемическое действие, подавляя синтез жирных кислот и других липидов, формирующих, в том числе, липопротеины низкой и очень низкой плотности. При окситиаминовом В<sub>1</sub>-авитаминозе электронномикроскопически выявляется повреждение митохондриальных мембран миокарда и т.д. [23, 24, 31, 51, 67, 70, 73, 107].

Синтезировано много антивитаминных препаратов тиамин — нитрат, фосфат, йодид, никотинат окситиамина, окситиаминдисульфид и др. Установлено, что дисульфидные производные окситиамина обладают более выраженными антивитаминными свойствами, чем окситиамин, и являются антивитаминами пролонгированного действия с более низкой (в 3-4 раза) острой токсичностью. Изучены биохимические особенности действия различных антивитаминов на организм [23, 51, 70, 73].

Концепция некоферментной витаминологии, базирующаяся на объяснении ряда эффектов витаминов, опосредованных действием гормонов, дополняет классическую витаминологию в части объяснения ряда фактов, необъяснимых с позиций коферментной витаминологии. Исследована, в частности, роль тиамин и никотиновой кислоты в регуляции функционирования гипофизарно-адренкортикальной системы, обмен этих витаминов в условиях гипо- и гиперкортицизма, двусторонней адреналэктомии, гипофизэктомии. Установлено, что стимулирующее влияние тиамин на продукцию кортикостероидов в надпочечниках опосредуется через В<sub>1</sub>-зависимые ферментативные реакции пучковой зоны коркового вещества, а РР активирует образование глюкокортикоидов опосредованно — через активацию секреции гипофизом АКТГ. Стимуляцией выброса АКТГ под влиянием никотиновой кислоты и никотинамида может объясняться и гипополипидемическое действие этих веществ. У тиамин обнаружена способность оказывать стресс-лимитирующее действие: при развитии стресс-реакций он накапливается в надпочечниках и предупреждает избыточ-

ную продукцию глюкокортикоидов под влиянием стрессорного выброса АКТГ. Таким образом, тиамин может как стимулировать, так и ограничивать образование глюкокортикоидов надпочечниками в зависимости от исходного состояния гипофизарно-адренокортикальной системы: при сниженной ее активности отмечается эффект стимуляции гормонообразования, при избыточной — подавление синтеза глюкокортикоидов. Было показано, что инсулиноподобное действие тиамин в отношении углеводного обмена в печени и других тканях может быть результатом активации синтеза инсулина вводимым витамином (тиамин и инсулин сходным образом влияют на уровень гексомонофосфатов, альдопентоз и глюкозы в печени). Оказалось, что тиамин и витамин РР повышают содержание глюкокортикоидных рецепторов в печени, влияя, тем самым, на выраженность глюкокортикоидной регуляции углеводного обмена [12, 13, 101].

Установлено, что тиамин может использоваться как эффективное средство защиты надпочечников от истощения при хирургическом стрессе, а ниацин может заменять АКТГ с целью предотвращения атрофии надпочечников при длительной терапии препаратами глюкокортикоидных гормонов. Как установлено последними исследованиями ученых Института, подобное действие может оказывать и витамин Д. Выявлено прямое ингибирующее действие витамина Е на 11-гидроксилирование стероидов в митохондриях надпочечников, что можно рассматривать как антистрессовое действие токоферола [13, 14, 30].

Таким образом, исследования в области витаминно-гормональных взаимоотношений, фактически некоферментной витаминологии, позволили разработать витаминные композиции и внедрить их для профилактики и коррекции хирургического стресса, синдрома отмены гормонотерапии, стрессорных кардиопатий, инфаркта миокарда, сепсиса, осложненных родов, врожденных пороков развития, для оптимизации терапевтического эффекта адреноблокаторов и др. [14, 15].

***Важнейшие достижения Института в области биохимических аспектов действия алкоголя на организм и фармакотерапии алкогольной зависимости.***

Сформулирована метаболическая концепция развития алкоголизма, суть которой сводится к следующему. Эндогенные этанол и ацетальдегид являются естественными компонентами метаболизма и создают состояние функционального комфорта при их физиологических концентрациях в организме. Врожденная (генетическая) недостаточность системы «эндогенный этанол — ацетальдегид» приводит к предпочтительному потреблению экспериментальными животными растворов этилового алкоголя вместо воды в условиях свободного выбора. Уровень эндогенного этанола в тканях «пьющих» крыс (особенно самок) значительно ниже, чем у «непьющих», что связано с уменьшением его синтеза в печени в результате снижения активности пируватдегидрогеназы в митохондриях и ускорения метаболизма за счет активации микросомальной этанолокисляющей системы и алкогольдегидрогеназы печени. Факторы, снижающие потребление этанола (тиамин, тиаминдифосфат, холин, рибофлавин, глутамин), повышают содержание эндогенного этанола в тканях в результате уменьшения его распада и, наоборот, факторы, увеличивающие потребление этанола (недостаточность тиамин, введение тетрагидроизохинолинов, голодание, стресс), снижают содержание эндогенного этанола в тканях за счет угнетения его синтеза или активации катаболизма. Таким образом, существует обратная связь между уровнем эндогенного этанола и потреблением алкоголя. Хроническое избыточное употребление алкоголя приводит к нарушению нормальной работы биохимических систем обмена эндогенного этанола в результате устойчивого сдвига их функционирования, сопровождающееся понижением содержания эндогенного этанола. Это объясняет развитие зависимости к алкоголю с потребностью регулярного употребления экзогенного этанола для покрытия искусственно сформированного его дефицита и, соответственно, создания состояния психического и физического

комфорта [27, 78, 123, 124]. Следует отметить, что в 1986 г. в США в журнале «Alcohol» была опубликована статья Ю.М. Островского с изложением концепции о роли эндогенного этанола и ацетальдегида в патогенезе алкоголизма, на оттиски которой сразу поступило около 100 запросов из разных стран.

Пируват и треонин являются метаболическими предшественниками эндогенного ацетальдегида, из которого образуется эндогенный этанол. Пируватдегидрогеназа и треонинальдолаза — ключевые ферменты в поддержании гомеостаза эндогенного этанола и ацетальдегида в организме животных. Значительный вклад в образование эндогенного этанола вносит микрофлора толстого кишечника. По уровню эндогенного этанола можно прогнозировать выраженность алкогольного предпочтения и тяжесть абстинентных проявлений у пациентов с алкогольной зависимостью. Выявлены взаимосвязанные циркадные колебания уровня эндогенного этанола, концентрации 11-оксикортикостероидов в крови и тканях у крыс и величины добровольного потребления животными алкоголя [11, 32, 84].

Изучены особенности топографического распределения в головном мозге каталазы как основного фермента, окисляющего этанол в мозге, и альдегиддегидрогеназ. Показано, что результирующий эффект действия алкоголя на мозг зависит от локального соотношения активности этих ферментов, что приводит к избытку или недостатку ацетальдегида в конкретной структуре мозга. Избыток ацетальдегида может приводить к нарушениям функции, повреждению и гибели клеток, недостаток — к инициированию, например, влечения к алкоголю. Активация альдегиддегидрогеназы при хроническом введении алкоголя может рассматриваться как один из механизмов приобретенной к нему устойчивости. Установлена важная роль цитохрома P450 2E1 в окислении этанола в мозге [28, 29, 133, 134].

Генетические линии крыс, предпочитающих и отвергающих алкоголь, различаются по особенностям распределения и обмена отдельных аминокислот в правом и левом полушариях, стволе мозга и мозжечке. У чувствительной к алкоголю АНТ-линии крыс в левом полушарии и стволе мозга обнаружено преобладание тормозных аминокислот (ГАМК, глицин, таурин) над возбуждающими (аспартат, глутамат). Выявлено, что крысы, отвергающие алкоголь (АНА-линия), используют для защиты ЦНС от нейротоксического действия ацетальдегида преимущественно лизин, а чувствительные к алкоголю (АНТ-линия) — гистидин (обе аминокислоты образуют аддукты с ацетальдегидом) [80, 84].

Изучено состояние ряда нейротрансмиттерных систем мозга при алкогольной интоксикации. Так, выявлено модулирующее влияние центральных гистаминергических систем на обмен дофамина и серотонина в мозге в условиях действия этанола, изучена роль центральных холинергических систем в механизмах предпочтения и толерантности к этанолу, обнаружена более высокая активность холинергических систем головного мозга у крыс, предпочитающих этанол, что дает основания для дальнейших исследований по использованию центральных холиноблокаторов в целях подавления алкогольной мотивации. Выявлена временная динамика плотности и лигандсвязывающей способности дельта- и мю-типов опиоидных рецепторов в среднем мозге у крыс при алкогольной нагрузке, показано, что подавление S-аденозилметионином судорог при алкогольном абстинентном синдроме у крыс связано с активацией  $\mu$ -опиоидных рецепторов среднего мозга. Изучен транспорт и метаболизм ГАМК в головном мозге интактных и стрессированных крыс с разным отношением к этанолу. Показано, что при остром воздействии этанола, хронической алкогольной интоксикации и алкогольном абстинентном синдроме отмечается усиление тормозного действия ГАМК в различных отделах головного мозга [38, 66, 84, 108].

«Пьющие» животные отличаются от «непьющих» по ряду показателей углеводного, белкового и липидного обмена. В печени «пьющих» крыс снижено содержание глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата, что рассматривается как частичный субстратный голод в рамках углеводного обмена. «Пьющие» и «непьющие» животные различаются по содержанию свободных аминокислот в печени (таурин, треонин), плазме крови (орнитин), моче (таурин, аспаратат). Наиболее существенные различия обнаружены в липидном метаболизме. В печени «пьющих» крыс снижено содержание общих липидов за счет фосфолипидной фракции, хотя синтез липидов у них протекает более интенсивно [63, 79, 84, 92].

Изучен метаболизм углеводов и кетоновых тел при алкогольной интоксикации в условиях введения ингибиторов алкоголь- и альдегиддегидрогеназ. Установлено, что эффекты этанола в отношении обмена углеводов и кетоновых тел опосредуются ацетальдегидом. При хронической алкогольной интоксикации усиливается кетогенез из экзогенного этанола и ацетальдегида, тормозится окисление образующихся кетоновых тел, которые используются преимущественно для нужд липогенеза, особенно, в печени. Значительное повышение концентрации ацетона в крови и моче у лиц с алкогольной зависимостью, принимающих дисульфирам, может быть использовано для контроля за приемом препарата [82, 84, 93, 128, 129].

Сформулирована гипотеза участия незаменимых жирных кислот (НЖК) и простагландинов (ПГ) в патогенезе алкогольного поражения печени, суть которой сводится к тому, что хроническая алкогольная интоксикация приводит к недостаточности НЖК (снижение потребления НЖК с пищей вследствие угнетения аппетита, нарушение всасывания НЖК в результате развития воспалительных и других деструктивных процессов в ЖКТ, активация перекисного окисления НЖК продуктами метаболизма этанола, угнетение этанолом активности линолеил-КоА-десатуразы, приводящее к падению уровня арахидоновой кислоты, и т.д.) и, соответственно, ПГ в результате снижения содержания НЖК как предшественников ПГ и угнетения ПГ-синтезирующих ферментов. Падение уровня ПГ в печени приводит к увеличению образования аддуктов ацетальдегида с рецепторными белками для ПГ (преимущественно ПГЕ<sub>1</sub> и ПГЕ<sub>2</sub>) в плазматических мембранах (конкурентное взаимодействие) с последующим нарушением функционирования сигнальных ПГ-опосредованных путей регуляции метаболизма в гепатоцитах и развитием алкогольного гепатоза. Повышение концентрации ПГ в печени тормозит модификацию ПГ-рецепторов ацетальдегидом. На основании изложенной гипотезы предложены подходы к профилактике и коррекции алкогольного поражения печени, направленные на устранение недостаточности НЖК и повышение содержания ПГ в органе [6].

Обнаружено, что различные отделы желудочно-кишечного тракта отличаются по чувствительности к повреждающему действию алкоголя. Окислительное повреждение слизистой толстого кишечника (прежде всего, прямой кишки) ацетальдегидом является потенциальным риск-фактором развития компенсаторной гиперрегенерации и в дальнейшем — канцерогенеза. В связи с тем, что естественная микрофлора толстого кишечника вносит значительный вклад в превращение этанола в ацетальдегид, она, тем самым, способствует увеличению локальной органотоксичности алкоголя и повышению риска малигнизации в слизистой оболочке толстой кишки [84].

При изучении влияния потребления этанола на семенники крыс установлено, что в ранние сроки после попадания спирта в организм проявляется антиоксидантный эффект, в более поздние — прооксидантный. Активация перекисного окисления липидов при острой и хронической алкогольной интоксикации может быть одним из пусковых механизмов угнетения биосинтеза тестостерона в семенниках в результате подавления активности 3 $\beta$ -ОН-стероиддегидроге-

назы. Другим механизмом, участвующим в подавлении тестостероногенеза в семенниках при алкогольной интоксикации, может быть активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, сопряженная с подавлением гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси [7].

Разработаны биохимические тесты для диагностики алкогольной зависимости. Так, совместное определение активностей алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и гамма-глутамилтрансферазы позволяет диагностировать алкоголизм в 98,1% случаев при специфичности теста 78,9%. Выявлено, что показатели содержания в крови этанола, ацетальдегида, ацетата, метанола, ацетона, лактата и пирувата коррелируют с тяжестью алкогольного абстинентного синдрома у пациентов с алкогольной зависимостью, наличием алкогольного делирия и влечением к алкоголю [83, 84].

Выявлено благоприятное влияние витаминов (тиамин, рибофлавин, пиридоксин, пантотенат, никотинамид, фолиевая кислота) в повышенных дозах на обменные процессы при алкогольной интоксикации. Наибольшее значение имеет применение тиамин, пиридоксина и пантотената. Пантетин и кальция пантотенат заметно ускоряют выведение этанола из организма. У пациентов с алкогольной зависимостью применение комплекса витаминов заметно улучшает функции печени. Особенностью пантенола является способность нормализовать структуру фонда КоА в гепатоцитах при хронической алкогольной интоксикации. Выявленная способность диэтилникотинамида активировать монооксигеназную систему печени использована в наркологической клинике у пациентов, которым назначался тетурам, ингибирующий эту систему метаболизма ксенобиотиков. Установлена высокая эффективность комбинации глутамин, липоевой кислоты и ацетилцистеина как гепатопротекторного средства при алкогольной интоксикации и для лечения проявлений алкогольного абстинентного синдрома, а также комбинации  $\alpha$ -кетоглутарата, сукцината натрия и аспарагиновой кислоты при острой алкогольной интоксикации и расстройствах, отмечаемых в постинтоксикационный период. Хорошие результаты получены при купировании алкогольного делирия с помощью пантетина и алкогольного абстинентного синдрома лекарственным средством «Полиамин» (композиция 13 L-аминокислот), что позволило существенно сократить сроки и повысить эффективность лечения пациентов [47, 79, 80, 102].

Выявлено, что синтетический гормон тиролиберин (трипептид) и его пентапептидный аналог (созданы в Институте биоорганической химии НАН Беларуси) обладают антиалкогольными, нейро- и гепатопротекторными свойствами, уменьшают потребление этанола и коэффициент его предпочтения у экспериментальных животных в условиях сформированной алкогольной мотивации после лишения алкоголя, снижают проявления алкогольной абстиненции, выраженность деструктивных морфологических изменений в коре больших полушарий и мозжечке у крыс при хронической алкогольной интоксикации [37].

Изучено гепатозащитное и антифиброзное (антициррозное) действие ряда субстанций растительного (бетулин, берберин, куркумин, масло огуречника лекарственного, сезамин, силимарин, хлорогеновая кислота и др.) и животного происхождения (урсодезоксихолевая, тауроурсодезоксихолевая кислоты, урсодезоксихолевая кислота в комбинации с производным пурина — пентоксифиллином, и др.), которые эффективны, в том числе, при алкогольной болезни печени. Разработаны и выпускаются фармацевтической промышленностью Республики Беларусь «Биеносилим» (биен - комплекс этиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот из липидов мицеллярного гриба *Entomophthora virulenta*; силимарин - смесь 4 изомеров флавонолигнанов плодов расторопши пятнистой) и «Урсаклин» (урсодезоксихолевая кислота) [35, 45, 46, 85, 113, 116, 121, 130, 132].

Значительные достижения Института в области разработки медико-биологических проблем алкогольной зависимости явились основанием для создания в 2015 году на его базе Международного научного центра проблем алкоголизма (далее — Центр; постановление Бюро Президиума НАН Беларуси от 08.09.2015 № 375). Целью Центра является изучение биологических механизмов развития алкогольной зависимости, разработка и внедрение новых технологий и лекарственных средств для лечения пациентов с алкогольной зависимостью, коррекции нарушений в органах и тканях организма, вызванных злоупотреблением алкоголя. Установлены творческие связи Центра с Европейским обществом по биомедицинским исследованиям алкоголизма (ESBRA), Европейским фондом алкогольных исследований (ERAB), Европейской конвенцией пивоварения (ЕВС), Национальным медицинским исследовательским центром психиатрии и наркологии им. В.П.Сербского Минздрава России (далее — Центр им. В.П. Сербского), организациями Республики Польша, занимающимися проблемами алкоголизма (Институт химии и технологии питания Технологического университета г. Лодзь, кафедра биотехнологии Высшей медицинской школы г. Белостока и др.), кафедрой физиологии Университета г. Ульм (Германия) и т.д.

В последние годы спектр исследований Института в области алкогольной тематики расширился в сторону изучения эпидемиологических аспектов алкопотребления и алкопатологии. Так, изучено влияние повышения цен на водку на уровень потребления алкоголя в Беларуси и России, структуры продажи алкоголя на уровень суицидов, потребления алкоголя и гендерного градиента уровня общей смертности и суицидов в Европе. Получены новые данные о ритмологических особенностях заболеваемости алкогольными психозами в Беларуси, о связи алкогольных психозов с гендерным градиентом уровня суицидов и сердечно-сосудистой смертностью в Беларуси, России и Украине и т.д. [86-90, 131].

#### *Аминокислотное направление.*

Сформулирована и экспериментально обоснована оригинальная концепция формирования и регулирования фонда свободных аминокислот и их производных в условиях метаболического дисбаланса. Изучены механизмы и разработаны способы направленной коррекции L-аминокислотами, их производными и комбинациями этих соединений метаболических процессов при различных нарушениях жизнедеятельности (злокачественный рост, радиационные поражения, патология иммунной и сердечно-сосудистой систем, стрессовые повреждения, токсические состояния, связанные с употреблением алкоголя и действию других повреждающих факторов). К примеру, установлено, что таурин и аминокислоты с разветвленной углеводородной цепью (лейцин, изолейцин, валин) при совместном введении способны корректировать аминокислотный дисбаланс при токсическом поражении печени и радиационном облучении. Обоснована целесообразность включения таурина в состав аминокислотных смесей для парентерального питания и т.д. [8, 64-66].

Институт принимал участие в разработке ряда лекарственных средств на основе высокоочищенных L-аминокислот и их производных — «Таурин» (гепато- и радиопротекторное действие), «Лейцин» (иммуномодулирующее, адаптогенное, гепатопротекторное действие), «Тавамин» (мембраностабилизирующее, антиоксидантное, радиопротекторное действие), «Триптофан» (снотворное и антинаркотическое действие), «Глицин» (седативное, снотворное, ноотропное, нейропротективное, антиоксидантное), «Гексаминат» (антиастеническое средство), «Гепамин» (гепатопротекторное действие), «Нейрамин» (психостимулирующее и ноотропное средство), «Атерамин» (антиатеросклеротическое действие), «Гипоамин» (вазо- и кардиопротекторное действие), «Деглутам» (противоопухолевое действие), «ГепталНАН» (гепатопротекторное действие) и др.

### ***Биохимические аспекты злокачественного роста.***

Уже в 1970 г. Научным советом по комплексной проблеме «Злокачественные новообразования» АМН СССР был поддержан проект, представленный Отделом, «Изучить в эксперименте взаимоотношения между опухолью и организмом опухоленосителя в использовании некоторых водорастворимых витаминов», а с 1973 г. стали проводиться систематические исследования в области биохимии злокачественного роста. Отдельные исследования, посвященные противоопухолевой активности антиметаболитов тиамина, выполнены совместно с Всесоюзным онкологическим научным центром АМН СССР.

Выявлено прогрессирующее снижение активности ряда витаминзависимых ферментов в тканях животных-опухоленосителей по мере прогрессирования опухолевого процесса, тогда как в тканях опухолей активность ферментов сохраняется высокой, что объясняется интенсивным поглощением опухолями витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, РР, липоата. Обоснован комплексный подход к лечению пациентов с онкологическими заболеваниями путем назначения им указанных витаминов. Разработан оптимальный режим введения тиамина и ниацина при химиотерапии пациентов со злокачественными опухолями, позволяющий уменьшить токсический эффект цитостатиков [76].

Учитывая, что отдельные витамины могут стимулировать рост опухолей и метастазирование, проведены исследования, которыми установлено, что введение мышам с асцитной карциномой Эрлиха пиридоксина и фолиевой кислоты на фоне полноценного пищевого рациона не приводит к стимулированию роста опухоли. Изучалось также распределение меченого липоата и никотината в организме опухоленосителей. Обнаружено снижение уровня никотинамидсодержащих коферментов в тканях животных-опухоленосителей [16, 59].

Выяснилось, что регуляторные свойства цитрата в организме крыс-опухоленосителей качественно меняются по сравнению со здоровыми животными: активность аланинаминотрансферазы печени резко возрастает у больных животных и теряет свою активность у здоровых. Выдвинуто предположение, что противоопухолевое действие цитрата, так же, как и окситиамина, может быть связано с вмешательством в перераспределение лактата и пирувата между опухолью и другими тканями организма. На основе определения уровня лактата, а также активности альдегиддегидрогеназы в биоптате эндометрия разработан метод ранней диагностики рака эндометрия [9, 10, 71, 77].

Сочетанное применение цитостатика розевина, тиамина и витамина РР в 33% случаев приводит к исчезновению у экспериментальных животных карциносаркомы Уокера-256. У остальных животных рост опухоли тормозился на 60%, а продолжительность жизни увеличивалась в 2 раза [66].

Большая часть исследований по онкологической тематике была посвящена изучению противоопухолевой активности антивитаминов тиамина, особенно окситиамина, дисульфидов и эфиров галоидкислот окситиамина. Так, выявлено, что окситиамин усиливает угнетающее действие сарколизина на рост карциномы Эрлиха у экспериментальных животных. Ферроценовые производные окситиамина обладают выраженным противоопухолевым действием в отношении лейкоза Р-388 и асцитной карциномы Эрлиха, в то время как ферроценовые производные тиамина вызывают некоторую активацию роста опухолей. Оба соединения не проникают через гематоэнцефалический барьер и угнетают эритропоэз. Антивитаминный эффект ферроценовых производных окситиамина значительно более выражен в клетках опухоли, чем организма-опухоленосителя [70, 96].

Изучено цитотоксическое действие новых соединений окситиамина с платиной, палладием, родием и оловом в отношении различных экспериментальных опухолей (асцитной карци-

номы Эрлиха, лейкемии L-1210 и др.). Выявлено, к примеру, что платиновое производное окситамина на 86% тормозит рост саркомы-37, а лекарственный противоопухолевый препарат с платиной платидиам (цисплатина) — только на 39%. На основе модифицированных полисахаридов, антиметаболитов и фолиевой кислоты созданы новые соединения с противоопухолевым эффектом, которые заметно увеличивают продолжительность жизни животных-опухоленосителей. Изучены механизмы противоопухолевой и иммуномодулирующей активности производных глутамина и ароматических кислот (триптофана и фенилаланина), в частности, действие дипептида «Деглутам» на глутаминметаболизирующую систему в клетках карциномы SM-1 [8, 66, 70, 96].

В последние годы совместно с Институтом биологии клетки НАН Украины получены данные о возможности повышения эффективности действия некоторых противоопухолевых антибиотиков (доксорубин, ландомицин), в том числе, преодоления устойчивости опухолей к химиотерапии, в результате редокс-модуляции системы глутатиона в опухолевых клетках [55].

### *Другие направления.*

На протяжении многих лет в Институте проводятся исследования по экстракции, выделению, очистке и синтезу биологически активных соединений. В частности, разработаны технологии получения сухих экстрактов различных растений (более 50 видов), которые могут использоваться как фармацевтические субстанции для получения лекарственных средств, биологически активных добавок, а также в пищевой промышленности и парфюмерно-косметической отрасли химической промышленности. Отработаны технологии получения сухих экстрактов грибов шиитаке, рейши, вешенки обыкновенной, герициума гребенчатого, аурикулярии уховидной, трутовика лакированного, изучены возможности их применения, в частности, как антистрессорных и иммуностимулирующих средств [66, 127].

Разработаны технологии получения антоцианов из ягод клюквы, черники, брусники и черноплодной рябины, установлено их противодиабетическое действие, разработаны технологии получения силимарина (комплекс флаволигнанов) из семян расторопши пятнистой, алкалоидов чистотела из корневой части растения, лупанового тритерпеноида бетулина и родственных соединений (лупеол, бетулиновая и бетулоновая кислоты, аллобетулин) из коры березы и чаги, хамазулена — из цветков ромашки аптечной, эфирных масел из туи, можжевельника, ромашки, аира, табака и других растений, которые могут использоваться в пищевой и фармацевтической промышленности, парфюмерно-косметической отрасли химической промышленности [17, 106].

В последнее время в Институте развивается направление, связанное с созданием так называемых наноструктурированных лекарственных средств, т.е. комплексов известных лекарств и некоторых биологически активных веществ с естественным циклическим углеводом  $\beta$ -циклодекстрином, состоящим из семи остатков моносахарида D-глюкопиранозы и использующимся в пищевой промышленности как пищевая добавка (E459) в качестве стабилизатора и эмульгатора. Комплексообразование лекарственных и других средств с  $\beta$ -циклодекстрином в форме так называемых молекулярных контейнеров приводит к повышению их биодоступности. Особенно эффективны комплексы с 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином. Изучены наноконструкции с полифенолом куркумином, получаемым из корня куркумы рода имбирных (нейропротекторное действие), антоцианидинами капусты краснокочанной (гипогликемическое действие), лупановым тритерпеноидом бетулином из бересты (гепатопротекторное и антидиабетическое действие), лигнаном сезамином из семян кунжута (гепатопротекторное действие), биофлавоноидом кверцетином (ранозаживляющее действие), антидепрессантом сертралином (противодиабетическое действие) и др. [39, 105, 117].

Сформулирована концепция защиты клеток животного организма от повреждающего действия свободных радикалов соединениями липидной природы, которые способны проявлять антирадикальные и антиоксидантные свойства (фосфолипиды, стероиды, желчные кислоты). Выявлены молекулярные механизмы модификации рецепторов простагландинов, цитохрома P-450 и других белков альдегидными продуктами перекисного окисления липидов, продемонстрированы структурные и метаболические последствия этой модификации. Установлено, что малоновый диальдегид увеличивает жесткость плазматических и микросомальных мембран печени на всем поперечном их сечении и снижает специфическое связывание простагландинов E с рецепторами гепатоцитарных мембран, а 4-гидроксиноненаль (продукт перекисного окисления липидов) снижает вязкость приповерхностной зоны мембран и увеличивает неспецифическое связывание простагландинов E с мембранами. Простагландины нормализуют поврежденные микросомальные мембраны печени, влияя на гидрофобные связи между белковыми и липидными компонентами мембран. Исследованы структурные и метаболические сдвиги в печени при действии на организм ионизирующего излучения. Установлено, что гепатоциты после облучения становятся более чувствительными к действию ксенобиотиков, что способствует возникновению различных заболеваний. Разработаны способы коррекции фиброза и цирроза печени различной этиологии с использованием простагландинов E и  $\gamma$ -линолевой кислоты, сахарного диабета и диабетической гепатопатии — полиеноилфосфатидилхолином, урсодезоксихолевой кислотой и ее производными, атеросклероза — дигидропроизводными эстрогенов [26, 112, 114].

Исследовался метаболизм йода в клетках щитовидной железы, активность свободнорадикальных процессов, состояние прооксидантных и антиоксидантных систем в щитовидной железе и других тканях организма при экспериментальном гипотиреозе, сочетании гипотиреоза и эмоционального стресса, действии на организм  $\gamma$ -излучения. Обоснованы новые тиреопротекторные средства [61].

Сформулирована гипотеза биохимической адаптации тканей организма при сахарном диабете (модель аллоксанового диабета) путем усиления использования пентоз в качестве энергетического источника. Показана способность липосом, состоящих из фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина с включенным инсулином, эффективно снижать повышенный уровень глюкозы в крови при их пероральном введении крысам с аллоксановым диабетом [66].

Изучено влияние ультрафиолетового облучения и ультразвука на сывороточный альбумин, взаимодействие активных форм кислорода, свободных органических радикалов и оксидов азота при индукции окислительных процессов разными факторами. Выявлен механизм антиоксидантного эффекта гемоглобина и сывороточного альбумина, реализуемый через образование их комплексов с водорастворимыми витаминами и низкомолекулярными антиоксидантами. Показано, что ферро- и ферри-формы гемоглобина играют важную роль в превращениях оксида азота, а метгемоглобин катализирует образование низкомолекулярных S-нитрозосоединений и нитрозилированных белков. Выявлена способность пероксидных радикалов аминокислот и белков снижать уровень монооксида азота путем трансформации его в диоксид [25, 34, 68, 99].

Изучено содержание селена у населения Гродненской области, определены группы риска по развитию недостаточности этого микроэлемента, обоснованы новые технологии профилактики и коррекции его дефицита, доказана высокая эффективность селенсодержащих препаратов в подавлении окислительных процессов при их чрезмерной активации (в эксперименте на лабораторных животных) [62].

*Некоторые прикладные разработки, не связанные с основной тематикой Института.*

Разработана технология получения 10% молочной кислоты из молочной сыворотки для пищевых целей и лиофилизированных белковых препаратов для косметологии. В Гродненской косметологической лечебнице и Московском институте красоты доказана эффективность этих препаратов при угревой сыпи, жирной себорее лица, которые оказывают противовоспалительное, рассасывающее и отбеливающее действие.

Проведено изучение активного ила, образующегося при биологической очистке отходов капролактамового производства Гродненского производственного объединения «Азот». Сделан вывод, что активный ил относится к классу относительно безвредных субстанций и может быть использован как кормовая добавка к основному рациону сельскохозяйственных животных.

Разработаны и внедрены способы получения молочнокислых заквасок для силосования разнотравья, кукурузы и других кормов.

Осуществлен синтез ацилатов (валерианата и капроната) мочевины с доказанной более высокой агрохимической эффективностью по сравнению с мочевиной.

Разработана и внедрена в агропромышленном комплексе Гродненской области среда для консервации спермы хряков, позволившая повысить оплодотворяемость животных на 10-12% и многоплодие — на 30%.

Разработаны технологии очистки сточных вод от формальдегида и метанола, позволяющие снизить концентрацию токсических субстанций в 3000 и 700 раз соответственно, очистки атмосферного воздуха от спиртов, альдегидов, кетонов, окисей углерода и др.

#### ***Создание отраслевых лабораторий.***

В 2018-2019 гг., благодаря поддержке Гродненского облисполкома, из средств инновационного фонда области закуплено современное научное оборудование на сумму около 1,5 млн. долларов США, которым оснащены три созданные в Институте отраслевые лаборатории (*биологически активных веществ, доклинического исследования лекарственных средств, мониторинга пищевого (микронутриентного) статуса населения и разработки технологий его коррекции с использованием функциональных продуктов и биологически активных добавок*), что позволило существенно обновить материально-техническую базу науки, значительно расширить научные и прикладные возможности Института. Среди закупленной техники — масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой для анализа микроэлементного состава биологических тканей и других образцов, газовые и жидкостные хроматографы, спектрофотометры, спектрофлуориметры, оборудование для вестерн-блоттинга, CO<sub>2</sub>-экстрактор, центрифуги, микроскоп, микротомы, установка для очистки и деионизации воды и др. Всего закуплено 84 единицы оборудования от производителей 13 стран (США, Германия, Великобритания, Франция, Бельгия, Республика Корея и др.).

Работа отраслевых лабораторий нацелена на разработку и внедрение новых технологий в организациях здравоохранения, учреждениях образования, на предприятиях пищевой и фармацевтической промышленности, парфюмерно-косметической отрасли химической промышленности, решение задач оказания платных услуг, увеличение экспорта товаров и услуг и др.

В настоящее время Институт готов к созданию на базе *отраслевой лаборатории биологически активных веществ* (заведующий — А.Г. Шляхтун) собственного производства экстрактов из растительного сырья и получения индивидуальных химических соединений природного происхождения для решения задач поиска веществ природного происхождения с полезными свойствами и разработки на их основе новых лекарственных средств и биологически активных добавок, реализации продукции на внутреннем и внешних рынках.

В *отраслевой лаборатории по доклиническому исследованию лекарственных средств* (заведующий — к.б.н. А.В. Туманов) проводятся доклинические исследования лекарственных средств, включающие оценку их безопасности и эффективности. Выполняются исследования по изучению фармакокинетики и фармакодинамики лекарств. Изучены, в частности, механизмы кардиопротекторного действия ниацина и аргинина (комбинированный препарат арниацин) при изадриновом стрессе, механизмы некоферментного действия компонентов нейровазотропина (тиамин, пиридоксин, липоевая кислота) при оксидативном стрессе [53, 54]. Исследована эффективность комплексного препарата гомеостазина (тиамин, тирозин, липоевая кислота) при сахарном диабете, пространственно экранированных производных пирокатехина при хроническом воспалении и заживлении кожных ран и др.

Создание *отраслевой лаборатории по мониторингу пищевого (микронутриентного) статуса населения и разработки технологий его коррекции с использованием функциональных продуктов и биологически активных добавок* (и.о. заведующего — к.м.н. Е.П. Лукиенко) является актуальной задачей современной медицинской науки и практики. Известно, что общей тенденцией для населения Беларуси является дефицит полноценного животного белка, отдельных витаминов и микроэлементов, пищевых волокон, полиненасыщенных жирных кислот, а также избыток простых углеводов и животных жиров. Особенно заметным является дефицит йода, селена, фтора, кальция, цинка, кобальта, марганца, меди, витамина Д, фолиевой кислоты и некоторых других.

Мониторинг микроэлементного состава и содержания витаминов у детского и взрослого населения, а также в продуктах питания позволит обеспечить раннее выявление недостатка или избытка микроэлементов и витаминов в организме, принять своевременные меры по устранению нарушений. Для коррекции дефицита микронутриентов совместно с Научно-практическим центром НАН Беларуси по продовольствию и Гродненским государственным аграрным университетом планируется выполнение работ по созданию функциональных продуктов питания и биологически активных добавок, содержащих необходимые витамины и микроэлементы, а также другие компоненты питания применительно к целевым группам населения. Кроме того, исследование микроэлементного состава у населения в разных условиях и в эксперименте позволят углубить и расширить знания о роли отдельных микроэлементов, в том числе малоизученных, в организме животных и человека, их связи с возникновением различных заболеваний (как известно, в организме человека обнаружено более 80 химических элементов, хотя относительно детально изучена биологическая роль не более 30).

Таким образом, создание трех отраслевых лабораторий в структуре Института, оснащение их современным научным оборудованием, позволяющим решать актуальные научные, научно-практические и производственные задачи, ориентированные на потребности, прежде всего, Национальной академии наук Беларуси и Министерства здравоохранения, позволит внести достойный вклад в развитие академической и отраслевой науки, разработку технологий сохранения и укрепления здоровья населения Гродненского региона и Беларуси, поднять имидж Института в научном мире.

В последнее время проводится систематическая работа по укреплению научно-технологических связей Института с промышленными предприятиями Гродненщины и других регионов республики. Например, совместно с ОАО «Молочный мир» ведется работа по созданию новых специализированных продуктов питания для профилактики и коррекции различных нарушений жизнедеятельности, включая сахарный диабет. С научно-производственным ЗАО «МАЛКУТ» разработаны рецептуры и готовится выпуск растворимых шипучих таблеток для

снятия (облегчения) похмельного синдрома. Готовятся совместные проекты для выполнения работ с РУП «Белмедпрепараты», Волковыским ОАО «Беллакт», предприятиями концерна «Белгоспищепром», Гродненским ликеро-водочным заводом и др.

С целью повышения эффективности научной, научно-технической, инновационно-производственной, научно-образовательной деятельности в 2018 г. создан образовательно-научный кластер Гродненщины, включающий *Институт, Гродненский государственный медицинский университет, Гродненский областной клинический кардиологический центр, Гродненский областной клинический перинатальный центр, Университетскую клинику, Гродненскую областную инфекционную клиническую больницу, Гродненский областной клинический центр «Фтизиатрия» и Гродненский областной клинический центр «Психиатрия-Наркология»*. Цель такого объединения — повысить эффективность работы входящих в его состав организаций путем интеграции образовательного, научного и клинического секторов, совместного использования материально-технических баз учреждений, их интеллектуального потенциала, выполнения совместных исследований, подготовки кандидатских и докторских диссертаций, «перекрестной» стажировки научных и научно-педагогических работников, проведения совместных научных мероприятий (семинаров, симпозиумов, конференций) и др.

#### ***Перспективы развития Института.***

1 ноября 2019 г. на заседании Бюро Президиума НАН Беларуси были доложены ближайшие и отдаленные перспективы развития Института.

Выделено 9 основных направлений.

- 1. Биохимия, молекулярная генетика и фармакотерапия алкогольной зависимости.*
- 2. Поиск и исследование биологически активных веществ природного происхождения для создания новых лекарственных средств и стандартных образцов.*
- 3. Создание новых форм лекарственных средств с повышенной биодоступностью.*
- 4. Изучение роли химических элементов в процессах жизнедеятельности, оценка содержания незаменимых факторов питания в организме и окружающей среде, разработка технологий предупреждения их недостаточности.*
- 5. Разработка новых технологий прогнозирования, предупреждения и коррекции нарушений жизнедеятельности.*
- 6. Влияние психических состояний человека на экспрессию генов, регулирующих работу биохимических и физиологических систем организма, развитие болезней.*
- 7. Комплексное изучение процессов жизнедеятельности в рамках полного жизненного цикла у поколений животных, обитающих на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника.*
- 8. Оценка состояния общественного здоровья по анализу содержания психоактивных веществ и продуктов метаболизма человека в бытовых сточных водах централизованной канализации.*
- 9. Развитие производства.*

#### **1. Биохимия, молекулярная генетика и фармакотерапия алкогольной зависимости**

В рамках этого направления выделено 6 поднаправлений.

***1.1. Изыскание среди известных лекарственных средств различного назначения препаратов, подавляющих алкогольную мотивацию, изучение механизмов их антиалкогольного действия и решение вопросов применения препаратов по новому показанию.***

В рамках Государственной программы научных исследований «Химические материалы и технологии» (подпрограмма «Фармакология и фармация») завершено выполнение задания «Исследование представителей классов фибратов (фенофибрат, безафибрат), тиазолидиндионов (пиоглитазон) и бигуанидов (метформин) с целью снижения алкогольной зависимости» (2019-2020 гг.). Основные эффекты указанных лекарственных средств — гиполипидемический (фибраты) и антидиабетический–гипогликемический (тиазолидиндионы и бигуаниды). Клинические наблюдения за пациентами, страдающими нарушениями липидного обмена, атеросклерозом, сахарным диабетом и принимающими эти лекарства, позволили обнаружить новый эффект, проявляющийся в подавлении желаний употреблять алкоголь. Учеными Института изучен один из возможных механизмов антиалкогольного эффекта этих средств — влияние на PPAR-рецепторы (рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом) головного мозга [95].

Развитие этого поднаправления предполагает также использование сравнительного анализа химического строения известных препаратов, способных подавлять алкогольную мотивацию, и других лекарств, производящихся мировой фармацевтической промышленностью, в том числе с использованием компьютерных технологий (компьютерного дизайна). Потребуется также изучение возможного антиалкогольного эффекта у известных лекарств, действующих на рецепторы, через которые опосредуется подавление алкогольной мотивации.

Таким образом, в изыскании среди известных лекарств, применяющихся по другим показаниям, лекарственных средств с антиалкогольными свойствами, будут задействованы три подхода:

- эмпирический;
- сходства химического строения;
- рецепторный.

**1.2. Поиск и исследование новых биологически активных веществ природного происхождения и соединений, полученных путем химического синтеза, с антиалкогольными свойствами, включающими:**

- подавление алкогольной мотивации;
- снижение выраженности похмельного синдрома;
- уменьшение токсического влияния алкоголя на организм.

Планируется продолжение сотрудничества с Институтом биоорганической химии НАН Беларуси в области скрининга синтетических пептидов на предмет выявления антиалкогольных свойств и разработки на их основе новых антиалкогольных препаратов.

Обсуждается возможность реализации проекта (совместно с ИБОХ НАН Беларуси и НПЦ «ЛОТИОС»), нацеленного на создание производства нового лекарственного средства на основе пентапептидного аналога тиролиберина, обладающего кроме антиалкогольных свойств, способностью подавлять развитие судорожного синдрома как одного из возможных проявлений алкогольной абстиненции.

Рассматривается также вопрос об углубленном изучении и дальнейшем использовании в клинической практике других эндогенных пептидов (полипептидов), влияющих, в частности, на липидный и углеводный обмен, выраженность алкогольной мотивации — грелина (28 аминокислот), амилина (37 аминокислот) и др.

**1.3. Разработка высокоспецифичных технологий лабораторной диагностики алкогольной зависимости с использованием прямых и непрямых биохимических маркеров.**

Несмотря на длительную историю изучения возможных маркеров для биохимической диагностики алкогольной зависимости, алкогольной интоксикации, их большую востребован-

ность практическим здравоохранением и системой правоохранительных органов, до сих пор отсутствуют в нашей стране утвержденные методики. Поэтому, одна из важнейших задач в алкогольной тематике — разработка высокоточных технологий лабораторной диагностики алкогольной зависимости и различных вариантов алкогольной интоксикации для клинической и экспертной практики.

Среди возможных биохимических кандидатов на роль лабораторных маркеров могут использоваться следующие вещества при обязательном учете их количественных соотношений (коэффициентов) в организме.

*Прямые маркеры:*

- этилглюкуронид;
- фосфатидилэтанол;
- этиловые эфиры жирных кислот;
- ацетальдегидные аддукты с аминокислотами, пептидами, ДНК, дофамином (сальсолинол) и другими метаболитами.

*Непрямые маркеры:*

- карбогидратдефицитный трансферрин;
- 5-гидротриптофол и др.

Особый интерес представляют аддукты ацетальдегида с различными метаболитами. Интересное в этом отношении соединение сальсолинол, обладающее морфиноподобными свойствами, — продукт взаимодействия ацетальдегида и нейротрансмиттера дофамина.

#### ***1.4. Изучение влияния острого и хронического употребления алкоголя на активность генов, ассоциированных с возникновением различных заболеваний:***

- онкологические заболевания (рак пищевода, желудка, печени, поджелудочной железы, толстой кишки, гортани, легких, молочной железы, предстательной железы и др.);
- алкогольная болезнь печени (жировой гепатоз, стеатогепатит, фиброз, цирроз);
- алкогольная кардиомиопатия.

#### ***1.5. Выявление генетических маркеров предрасположенности к развитию алкогольной зависимости из числа генов, связанных с обменом этанола в организме и функционированием рецепторных систем головного мозга, регулирующих эффекты действия алкоголя на психику.***

Представляет интерес изучение в белорусской популяции когорты лиц с алкогольной зависимостью и устойчивых к развитию алкогольной зависимости по критериям полиморфизма генов, определяющих:

- обмен этанола в организме (гены алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, каталазы, цитохрома P-450 и др.);
- синтез, количественное распределение и функциональную активность отдельных рецепторов в ткани головного мозга, связанных с эффектами действия алкоголя на психику (эйфория, психическая зависимость):
  - рецептор нейрокина-1 (NK1R);
  - ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы (GABA<sub>A</sub>);
  - Toll-подобный рецептор-3 (TLR3);
  - орексин-1-рецептор (Ox1R);
  - каннабиноидный рецептор-1 (CB1);
  - рецепторы глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1R);
  - рецепторы серотонина (5-HT<sub>2A</sub>);

- PPAR-рецепторы и др.

### **1.6. Экспериментальное обоснование рецептур новых линий водок со сниженной токсичностью.**

В рамках сотрудничества с ОАО «Гродненский ликеро-водочный завод» и НПЦ по продовольствию НАН Беларуси планируется разработка новых линий водок, содержащих в своем составе биологически активные вещества растительного происхождения, позволяющие:

- уменьшить токсическое влияние алкоголя на организм;
- снизить проявления похмельного синдрома;
- улучшить вкусовые качества продукции;
- уменьшить частоту развития алкогольной зависимости.

С ОАО «Гродненский ликеро-водочный завод» выполняется хоздоговор по изучению влияния биологически активных добавок растительного происхождения (бетулина и сезамина) на токсические свойства водок.

Готовится заявка на проект «Изучить токсические свойства самодельного алкоголя, производимого в разных регионах Беларуси, и составить карту районирования суррогатов алкоголя по степени токсичности». В настоящее время уже собрана коллекция самодельного алкоголя из разных регионов республики (несколько десятков образцов) для проведения химического и биологического анализа.

## **2. Поиск и исследование биологически активных веществ природного происхождения для создания новых лекарственных средств и стандартных образцов.**

### **2.1. Поиск и исследование веществ противодиабетического действия.**

Учеными Института обнаружены соединения, обладающие гипогликемическим действием и одновременно защищающие поджелудочную железу (*бетулин, бетулиновая кислота* — выделены из коры березы повислой и чаги, *куркумин* — выделен из корневищ растений семейства имбирных, *антоцианы краснокочанной капусты и др.*). На их основе планируется разработка отечественных высокоэффективных лекарственных средств для лечения пациентов с сахарным диабетом I и II типа [111].

В дальнейшем планируется продолжить выявление и изучение соединений с антидиабетическим действием, выделенных из растений: *лапчатка прямостоячая (Potentilla erecta), девясил высокий (Inula helenium), тысячелистник обыкновенный (Achillea millefolium), зверобой продырявленный (Hypericum perforatum) и др.*

### **2.2. Поиск и исследование веществ гепатопротекторного действия.**

В Институте изучено гепатозащитное действие ряда субстанций растительного и животного происхождения, которые эффективны при различных поражениях печени. Некоторые из них в виде лекарственных средств выпускаются фармацевтической промышленностью Республики Беларусь (РУП «Белмедпрепараты» и ГП «Академфарм») [113, 116].

Планируется изучение других соединений на предмет их гепатопротекторного действия, которые будут выделены из растений: *люпин желтый (Lupinus luteus), лакрица или солодка голая (Glycyrrhiza glabra), расторопша пятнистая (Silybum marianum) и т.д.*

### **2.3. Поиск и исследование веществ, обладающих противомфиброзным действием.**

За последнее время в медицине коренным образом изменилось представление о необратимости процесса фибротической/цирротической трансформации печени. Оказывается, этим процессом можно управлять (подавлять). В Институте, например, под руководством профессора В.У. Буко обнаружено, что ген, трансформирующий опухоль гипофиза (онкоген), регулирует

ет фиброгенез в печени и рассматривается как новая мишень для фармакотерапии при фиброзе/циррозе органа [126]. Совместно с Университетом COMSATS (г. Исламабад) подготовлен белорусско-пакистанский проект «Семейство генов фибробластов как потенциальная мишень для профилактики и лечения фиброза печени», в рамках которого планируется исследовать 5-6 природных и синтетических соединений, влияющих на активность генов, регулирующих синтез факторов роста фибробластов и их рецепторов, участвующих в развитии фиброза (начальной стадии цирроза) печени.

Установлено, что противофиброзный эффект экстракта зеленых бобов кофе обусловлен высоким содержанием хлорогеновой кислоты (представитель группы кофейно-хинных кислот), содержание которой весьма значительно в топинамбуре и продуктах пчеловодства [118]. Планируется изучение противофиброзной активности различных соединений, выделенных из топинамбура (*Helianthus tuberosus*), барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris*) и др. растений.

#### **2.4. Поиск и исследование веществ, обладающих противоопухолевой активностью, разработка комплексных подходов к терапии онкологических заболеваний.**

##### **2.4.1. Изыскание веществ природного происхождения с прямым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, полученных из:**

- растительного сырья: имбирь лекарственный (*Zingiber officinale*), чистотел большой (*Chelidonium majus*) и др.;
- грибов: вешенки (*Pleurotus ferulae*, *Pleurotus ostreatus*), трутовика скошенного или чаги (*Inonotus obliquus*), аурикулярии уховидной (*Auricularia auricula-judae*) и др.;
- лишайников: фисции припудренной (*Physcia pulverulenta*), уснеи жесткой (*Usnea hirta*) и др.

##### **2.4.2. Разработка комплексных подходов к терапии онкологических заболеваний.**

*1 этап — подготовка организма к иммунотерапии:*

- детоксикация организма (в некоторых опытах детоксикация организма с использованием длительного введения энтеросорбентов увеличивает продолжительность жизни животных-опухоленосителей в 2 раза при сохраняющемся прогрессировании опухолей);
- обеспечение необходимых показателей баланса свертывающей и противосвертывающей систем крови (активация подавленной в условиях злокачественного роста противосвертывающей системы крови угнетает рост первичной опухоли и метастазов);
- насыщение организма витаминами и микроэлементами и др.

*2 этап — мобилизация иммунного звена системы противоопухолевой защиты организма:*

- легкая неспецифическая иммуностимуляция (бактериальные липополисахариды, бактериальные вакцины и др.);
- более мощная специфическая иммуностимуляция — введение в организм компонентов аутологичной опухоли (гомогенат опухоли, белковые и пептидные фракции и др.);
- разработка и использование технологий психоуправления системой противоопухолевой защиты организма при клинических испытаниях (*справочно: состояние психики пациентов тесно коррелирует с динамикой течения онкологических заболеваний. Так, сильные психические потрясения, связанные, например, со смертью родных, близких, разводом, появлением в прессе информации о неэффективности нового противоопухолевого средства, которым лечат или лечили данного пациента, неосторожно сказанным лечащим врачом словом о возможном неблагоприятном исходе заболевания, приводят к резкому ускорению развития болезни или возникновению ее рецидива. И, наоборот, вера в эффективность применяемого лечения, особенно, с применением специальных технологий визуализации, например, при формировании пациентами в своем сознании картин разрушения опухоли системой противоопухолевой защиты организма, способствует торможению роста опухоли, вплоть до ее полного исчезновения.*)

### ***2.5. Модуляция раневого процесса природными биологически активными веществами.***

В перспективе планируется исследовать:

- растительные флавоноиды-антиоксиданты (бетулин, мирицетин и др.);
- вещества животного происхождения (лактоферрин, лизоцим, соединения, выделяющиеся стволовыми клетками, и др.);
- биологически активные вещества, содержащиеся в грибах (весёлка, дождевик, трутовик и др.), лишайниках.

На основе использования различных комбинаций изученных веществ ожидается достижение следующих клинических эффектов, связанных с подавлением раневой инфекции, улучшением микроциркуляции в толще хронических ран и стимуляцией регенерации тканей:

- ускорение заживления плохо заживающих хронических ран (диабетические раны, раны на фоне посттромбофлебитического синдрома, атеросклероза, лучевых повреждений);
- улучшение косметических эффектов ранозаживления (снижение частоты возникновения грубых рубцов);
- улучшение приживления кожных трансплантатов.

### ***2.6. Получение стандартных образцов природных биологически активных соединений для системы фармации (хамазулен, гиперозид, алоин и др.).***

Стандартный образец — образец вещества для определения подлинности и качества поступающего в аптечную сеть растительного сырья и концентрации в нем указанного вещества, градуировки, аттестации и поверки средств измерений. В системе фармации Республики Беларусь используется порядка 10 стандартных образцов и все они закупаются за рубежом. Отечественное производство отсутствует, поэтому есть все основания постараться Институту занять эту нишу.

## **3. Создание новых форм лекарственных средств с повышенной биодоступностью.**

### ***3.1. Разработка наноструктурированных лекарственных форм.***

Около 40% лекарственных препаратов малорастворимы в водной среде и поэтому характеризуются невысокой биодоступностью и, соответственно, более низким фармакологическим эффектом. Одним из методов повышения растворимости лекарств, проникновения их через биологические барьеры и усиления фармакологического эффекта является комплексообразование с наночастицами нетоксичных циклодекстринов (2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин и др.), представляющих собой своего рода молекулярные олигосахаридные контейнеры ( $\beta$ -циклодекстрин применяется в качестве пищевой добавки E459 как стабилизатор и эмульгатор). При этом снижается токсичность, уменьшается выраженность побочных эффектов, а также неприятный вкус и запах.

В Институте изучены наноконструкции циклодекстринов с полифенолом куркумином, получаемым из корня куркумы рода имбирных (нейропротекторное действие), антоцианидинами капусты краснокочанной (гипогликемическое действие), лупановым тритерпеноидом бетулином из бересты (гепатопротекторное действие), лигнаном сезамином из семян кунжута (гепатопротекторное действие), биофлавоноидом кверцетином из гречихи (ранозаживляющее действие), антидепрессантом сертралином (противодиабетическое действие) и др. [105, 117].

Планируется разработка наноструктурированных форм с известными лекарственными средствами антигипертензивного действия (лозартан и др.), биофлавоноидами (рутин, генистеин, дайдзеин) и другими соединениями с последующим их внедрением на предприятиях фармацевтической промышленности. В Республике Беларусь наноструктурированные лекарственные формы разрабатываются только в Институте.

### **3.2. Разработка самоэмульгирующихся систем.**

Самоэмульгирующаяся система (СЭС) — это изотропная смесь синтетических или натуральных масел (масло расторопши, льняное масло и др.), поверхностно активных веществ (твин-20, твин-40 и др.) и гидрофильных растворителей или соразтворителей (полиэтиленгликоль-400 и др.), которые спонтанно эмульгируются в желудочно-кишечном тракте.

В Институте разработаны СЭС для берберина (алкалоид барбариса обыкновенного) и силимарина (флавоноид расторопши пятнистой), увеличивающие биодоступность этих веществ в 2 раза. СЭС с указанными веществами оказывают более значительное гепатозащитное действие при отравлениях печеночными ядами (этанол, тиоацетамид, ацетаминофен и др.) по сравнению с самостоятельно введенными в организм препаратами [22].

Планируется разработка СЭС для других биофлавоноидов. В Республике Беларусь лекарственные формы в виде СЭС разрабатываются только в Институте.

## **4. Изучение роли химических элементов в процессах жизнедеятельности, оценка содержания незаменимых факторов питания в организме и окружающей среде, разработка технологий предупреждения их недостаточности.**

### **4.1. Выяснение роли малоизученных микроэлементов в регуляции процессов жизнедеятельности в норме и при патологии.**

Исследование микроэлементного состава у населения в разных условиях и в эксперименте позволят углубить и расширить знания о роли отдельных микроэлементов, в том числе малоизученных, в организме животных и человека, связи их дефицита или избытка с возникновением различных заболеваний. Для выполнения таких исследований Институтом за счет средств инновационного фонда Гродненского облисполкома закуплен масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой, который позволяет в биологических образцах или других объектах окружающей среды определять содержание 74 химических элементов.

### **4.2. Мониторинг незаменимых факторов питания, в частности, селена, йода, кальция, полиненасыщенных жирных кислот и др.**

Общей характеристикой пищевого статуса населения Беларуси является дефицит полноценного животного белка, витаминов (например, витамина Д, фолиевой кислоты), микроэлементов (особенно йода, селена, фтора, кальция, железа, цинка, кобальта, марганца, меди), пищевых волокон, полиненасыщенных жирных кислот, а также избыток простых углеводов и животных жиров. Исследование, к примеру, содержания селена в организме студентов Белорусского государственного медицинского университета показало наличие его дефицита более чем у 90% учащихся. Как известно, устойчивый дефицит даже одного микроэлемента может приводить к существенным нарушениям процессов жизнедеятельности, преждевременному старению, порождает различные, в том числе тяжелые, заболевания, например, онкологические (описано, в частности, повышение риска возникновения некоторых онкологических заболеваний в условиях недостатка в организме селена).

Мониторинг микроэлементного состава и содержания витаминов у детского и взрослого населения позволит обеспечить раннее выявление недостатка или избытка микроэлементов и витаминов в организме и принять своевременные меры по устранению нарушений. Будет также проводиться мониторинг содержания тяжелых металлов в организме у определенных групп населения с целью принятия мер по предупреждению их накопления

в организме и выведению. В настоящее время в Республике Беларусь такие масштабные задачи не решаются.

#### ***4.3. Оптимизация существующей технологии предупреждения йодного дефицита на основе ликвидации дефицита селена.***

Существует тесная взаимосвязь между функцией щитовидной железы, метаболизмом тиреоидных гормонов и содержанием в организме селена. Дефицит селена может нарушать тиреоидную функцию даже при нормальной концентрации йода в организме. Одна из причин — угнетение селензависимых дейодиназ, которые обеспечивают превращение тироксина (тетрагидротиронина) в 3-5 раз более активный гормон трийодтиронин. Поэтому актуальной в ряде регионов Беларуси остается проблема йодного дефицита, обусловленного дефицитом селена (несмотря на ликвидацию в целом в Республике Беларусь проблемы йодного дефицита). Необходимо сочетанный скрининг тиреоидной функции у населения Беларуси, выявления связи ее недостаточности с содержанием в организме селена и последующим устранением (в необходимых случаях) селенодефицита для нормализации тиреоидного статуса.

#### ***4.4. Разработка нового метода определения витамина D в биологических образцах и обоснование его применения по новым показаниям.***

Планируется разработка нового, существенно более дешевого, газохроматографического метода определения D-витаминной обеспеченности организма с выявлением двух основных фракций витамина D ( $25(\text{OH})\text{D}_2$  и  $25(\text{OH})\text{D}_3$ ) с углубленным выяснением их роли в организме.

Предложен состав первого отечественного лекарственного средства холе-(эрго)кальциферола с добавлением витаминов В<sub>2</sub> и К для повышения биодоступности и эффективности профилактического и лечебного применения витамина D, в частности, за счет снижения риска его передозировки и развития тяжелых побочных эффектов.

Ведется работа по выяснению новых механизмов действия кальциферолов (редокс-модулирующее действие), а также изучению возможностей применения комбинированного препарата витамина D как противовоспалительного и антистрессового средства, а также при синдроме отмены глюкокортикоидных гормонов в клинической практике.

#### ***4.5. Разработка рецептур обогащения пищевых продуктов микронутриентами для сбалансированного питания различных категорий населения.***

Для коррекции дефицита микронутриентов совместно с Научно-практическим центром НАН Беларуси по продовольствию и Гродненским государственным аграрным университетом будут проводиться работы по созданию функциональных продуктов питания и биологически активных добавок, содержащих необходимые витамины и микроэлементы, а также другие компоненты питания применительно к целевым группам населения.

### **5. Разработка новых технологий прогнозирования, предупреждения и коррекции нарушений жизнедеятельности.**

***5.1. Поиск генетических, биохимических и иммунологических маркеров, ассоциированных с риском возникновения неинфекционных заболеваний и их осложнений, прогнозирования устойчивости организма к внешним повреждающим воздействиям, способности организма мобилизовывать функциональные резервы.***

Маркеры:

- риска развития заболевания;
- развивающегося заболевания;
- прогноза развития заболевания, его осложнений, эффективности терапии;

- устойчивости к экстремальным воздействиям (радиационным, температурным, эмоциональным и др.);
- эффективности мобилизации функциональных резервов (в спорте высших достижений, угрозе выживания и др.).

**5.2. Разработка системной оценки окислительно-восстановительного (редокс) баланса крови при развитии воспалительных, нейродегенеративных и онкологических заболеваний, в том числе преодолении устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии.**

Планируется совместно с Гродненским государственным медицинским университетом изучение редокс-статуса крови (анализ основных редокс-пар в цельной крови и плазме: восстановленный/окисленный глутатион, цистеин/цистин, белки с сульфгидрильными/дисульфидными связями) для оценки риска синдрома внезапной смерти у пациентов с сердечно-сосудистыми и другими заболеваниями.

В настоящее время обсуждается вопрос о разработке методики оценки редокс-статуса крови при сепсисе как прогностического показателя и возможного маркера эффективности реанимационных мероприятий.

**6. Изучение влияния психических состояний человека на экспрессию генов, регулирующих работу биохимических и физиологических систем организма, развитие болезней.**

Актуальность этого направления определяется тем, что психика является высшей и самой мощной управляющей системой в организме. В арсенале инструментов психоуправления находятся все нервные и химические регуляторы организма. Ни одна клеточка не свободна от регулирующего влияния психики. Любая мысль изменяет течение молекулярно-генетических, биохимических, биофизических, физиологических процессов в соответствии со своим содержанием. И чем больше вложено мысленной (психической) энергии, тем больший эффект достигается.

Сейчас становится все более очевидным, что информационное, т.е. семантическое или смысловое воздействие нередко может быть более эффективным, чем лекарство или скальпель. Современная действительность такова, что смертность от причин, связанных с употреблением лекарств, — главного инструмента современной медицины в борьбе с болезнями, занимает 5 место в мире после сердечно-сосудистых, онкологических, бронхолегочных заболеваний и травм. Сами лекарства, по данным ВОЗ, порождают до 30% всех болезней. В США ежегодно до 200 тысяч человек погибают от фатальных осложнений лекарственной терапии. Общие экономические затраты, связанные с лекарственными осложнениями, составили в 2000 г. в США 177,4 млрд. долларов.

Все это говорит о том, что необходимо активнее развивать немедикаментозные технологии в медицине, в том числе, — психотехнологии.

Швейцарские ученые из Высшей технической школы г. Цюриха в 2014 г. в журнале «Nature Communications» опубликовали статью, в которой показали возможность в специальной экспериментальной системе управлять с помощью мысли активностью гена, отвечающего за синтез щелочной фосфатазы [122]. Показано, что чувство любви влияет на активность генов иммунного ответа [120]. Мысль может влиять на ритмы электроэнцефалограммы, активность иммунной системы, артериальное давление, селективно изменять содержание в крови отдельных видов лейкоцитов и т.д. Наши мысли могут не только регулировать функциональное состояние организма, но и надолго программировать или перепрограммировать мозг, поведение, состояние регуляторных и исполнительных систем организма. Например, страстное желание женщи-

ны иметь ребенка при невозможности забеременеть может приводить к развитию феномена ложной беременности, при которой прекращаются менструации, увеличивается живот, молочные железы с пигментацией сосков и выделением молозива, может ощущаться шевеление «плода» и др. Максим Горький, работая над книгой «Жизнь Матвея Кожемякина», описывал эпизод, когда муж в припадке ревности убивает свою жену ударом ножа в печень. Писатель настолько эмоционально представлял эту сцену, что упал в обморок и у него появилась ярко-багровая полоса в области печени, которая через несколько дней исчезла (истерическая стигма) [1]. В человеке скрыты колоссальные способности противостоять болезням, в том числе, тяжелым. И ключ к эффективной мобилизации этих способностей — это ключ, прежде всего, к психике человека [3, 94, 98].

В 1979–1980 гг. коллектив российских ученых и специалистов под руководством Игоря Смирнова подготовил 30 членов Олимпийской сборной СССР к выступлению на XXII Летних Олимпийских Играх в Москве с помощью разработанных ими психотехнологий мобилизации внутренних резервов организма. Все они стали золотыми медалистами Олимпиады-80, а завоевано было тогда олимпийцами Советского Союза 80 золотых медалей (*справочно: Игорь Смирнов, сын генерал-полковника Виктора Абакумова, начальника Главного управления контрразведки «СМЕРШ» Наркомата обороны СССР и Министра государственной безопасности СССР, был окрещен в США «отцом психотронного оружия» за разработку им уникального метода компьютерных психотехнологий, созданного после Олимпиады-80; в последние годы своей жизни Игорь Смирнов работал директором по науке ЗАО «НИИ психотехнологий» и ведущим кафедрой психозологии Российского университета дружбы народов*) [98].

В том же 1980 г. при подготовке американскими специалистами группы спортсменов к выступлению на Зимних Олимпийских Играх в Лейк-Плэсиде (штат Нью-Йорк, США) она была разбита на четыре подгруппы: первая тратила на физические тренировки 100% тренировочного времени, вторая — 75% на тренировки, а 25% на визуализацию, т.е. на формирование в своем сознании и, соответственно, подсознании образов точных движений и достижения рекордов, которые фиксируются в мозге и, фактически, превращаются в программы поведения, третья — 50% на тренировки и 50% на визуализацию и четвертая — 25% на тренировки и 75% на визуализацию. В итоге лучшие результаты показали спортсмены четвертой подгруппы, затем третьей, второй и, в последнюю очередь, первой [119].

Накоплено огромное количество данных о способности психики эффективно мобилизовать скрытые резервы организма, добиваться потрясающих результатов в экстремальных ситуациях, порождать болезни и избавляться от них (в том числе онкологических) [3, 4, 91, 94, 125].

## **7. Комплексное изучение процессов жизнедеятельности в рамках полного жизненного цикла у поколений животных, обитающих на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника.**

Совместно с Полесским государственным радиационно-экологическим заповедником (ПГРЭЗ) и Институтом радиобиологии НАН Беларуси планируется развитие системных исследований процессов жизнедеятельности животных в рамках полного жизненного цикла на территории ПГРЭЗ с разным уровнем радиоактивного загрязнения изотопами цезия-137, стронция-90, плутония (238, 239, 240, 241) и америция-241 (*чего до сих пор не было сделано*). Для этого необходимо создать экспериментальные вольеры для разных видов животных на чистых (контроль), слабо- и сильно загрязненных радионуклидами участках ПГРЭЗ и изучить:

- продолжительность жизни животных в поколениях;
- плодовитость;
- дозовые нагрузки, включая накопление радионуклидов в тканях;
- биохимические и физиологические показатели;
- активность генов;
- развитие болезней;
- реактивность организма — ответ организма на предъявление различных раздражителей и т.д.

## **8. Оценка состояния общественного здоровья по анализу содержания психоактивных веществ и продуктов метаболизма человека в бытовых сточных водах централизованной канализации:**

### ***8.1. Разработка и реализация программы Союзного государства «Разработка новых подходов для создания системы мониторинга психоактивных веществ в сточных водах городской канализации».***

Проект указанной программы в настоящее время дорабатывается Институтом совместно с основным ее разработчиком — Национальным медицинским исследовательским центром психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава России. Реализация программы позволит решить следующие задачи:

- прогнозирование возможных негативных тенденций в обществе, связанных с нарастанием социальной напряженности, с целью обеспечения органов государственной власти и управления объективными данными для выработки адекватных и своевременных мер реагирования;
- оценка масштабов и динамики употребления психотропных, в частности, наркотических, веществ и других интересующих соединений в разных регионах Беларуси и России;
- определение реальных объемов теневого рынка наркотических веществ;
- объективная оценка эффективности мероприятий по снижению уровня потребления наркотических и других психотропных веществ среди населения.

#### ***Маркеры социальной напряженности:***

##### Эндогенные:

- кортизол, дегидроэпиандростерон, тестостерон и др.

##### Экзогенные:

- лекарственные средства: антидепрессанты, транквилизаторы и т.д.;
- наркотические вещества:
- амфетамины (бифетамин, мефедрин, метамфетамин и др.), опиаты (кодеин, морфин, героин, метадон), марихуана, псилоцибин, экстази, мескалин, спайс, кокаин и др.

### ***8.2. Дальнейшее (после завершения программы Союзного государства) изучение в сточных водах централизованной канализации маркеров потребления психотропных, в том числе, наркотических веществ, в разных регионах, населенных пунктах и объектах республики.***

### ***8.3. Разработка технологий оценки состояния общественного здоровья (предболезненности и болезненности по наиболее распространенным заболеваниям, репродуктивного потенциала и других состояний) с помощью биохимических маркеров в сточных водах централизованной канализации.***

## 9. Развитие производства.

Планируется получение и реализация на внутреннем и внешних рынках:

### 9.1. Стандартных образцов биологически активных соединений для системы фармации — *хамазулена, гиперозида, алоина и др.*

Стандартные образцы природных биологически активных соединений (в системе фармации Республики Беларусь используются порядка 10 государственных стандартных образцов), которые являются:

- импортозамещающей продукцией (в настоящий момент все стандартные образцы органических веществ используемых в фармакопее импортные);
- экспортноориентированной продукцией (существует потребность в стандартных образцах на рынке ЕАЭС);
- наукоемкой продукцией с очень высокой добавленной стоимостью (стоимость, например, 1 кг хамазулена (Sigma) — 30 млн. долларов США, 1 грамм — 30 тыс. долларов США).

### 9.2. Экстрактов и химически чистых биологически активных веществ из растительного сырья.

Планируется освоить производство:

- сухих растительных экстрактов;
- химически чистых соединений разных групп (алкалоиды, гликозиды, флавоноиды, терпеноиды и др.) из отечественного растительного сырья (чистотела большого, расторопши пятнистой, хмеля обыкновенного и др.), которые востребованы на рынках стран ЕАЭС, Балтии, КНР и других государств в:
  - фармацевтической промышленности;
  - пищевой промышленности;
  - парфюмерно-косметической отрасли химической промышленности и др.

Все изложенные направления получили одобрение на заседании Бюро Президиума НАН Беларуси в связи с их актуальностью. В то же время Председателем Президиума НАН Беларуси академиком В.Г. Гусаковым было отмечено, что Институт должен сосредоточиться, в основном, на решении фундаментальных и прикладных проблем алкогольной зависимости, учитывая ее высокую общемировую значимость и колоссальный ущерб, который наносит алкоголизм человечеству. В своем выступлении академик В.Г. Гусаков подчеркнул, что в перспективе Институт должен стать крупным мировым научным центром по проблемам алкогольной зависимости.

В настоящее время Институтом выполняются исследования, нацеленные на разработку способов коррекции нарушений структурно-функционального состояния митохондрий головного мозга экспериментальных животных при алкогольном абстинентном синдроме с использованием производных пластохинона и комплексных средств метаболического действия (А.В. Туманов и др.), коррекции алкогольной кардиомиопатии и сопутствующей патологии растительными полифенолами (А.А. Островский, Ю.Е. Разводовский, С.Н. Кирко и др.), изучение гепатопротекторной активности метаболитов предшественников никотинамидадениндинуклеотида при алкогольной интоксикации (А.Г. Шляхтун и др.), изучение витаминно-микроэлементных взаимоотношений при сахарном диабете, ишемии головного мозга и хронической алкогольной интоксикации (И.Н. Семененя, Н.П. Канунникова, Е.П. Лукиенко и др.). Изучается способность витаминного средства на основе рибофлавина, витаминов В<sub>6</sub> и тиамина оказывать профилактическое действие в отношении повреждения кровеносных сосудов и хрусталика глаза при различных состояниях, сопровождающихся окислительным стрессом (И.И. Степура и др.), разрабатываются технологии диагностики режимов, продолжительности и давности

употребления алкоголя с использованием биохимических маркеров для решения задач экспертной и медицинской практики (Ю.Е. Разводовский, А.В. Шуриберко и др.).

Развивается перспективное направление, связанное с изучением новых морфо-функциональных свойств и возможностей медицинского применения липохондроцитов, изучаются механизмы заживления кожных ран, трансплантации кожи, разрабатываются технологии управления этими процессами и др. (А.А. Островский, Е.Ф. Радута, А.А. Бакунович и др.).

Совместно с китайской стороной осуществляется разработка антиинфекционного гидрогеля с мезенхимальными стволовыми клетками пуповины для лечения диабетических ран (А.А. Островский и др.). В рамках белорусско-армянского проекта осуществляется разработка технологии ранней лабораторной диагностики острой почечной недостаточности на основе нового метода определения активности пантетинызы в биологических жидкостях (Д. С. Семенович, А.Г. Мойсеенок и др.).

Прошел государственную научную экспертизу проект «Обоснование биомаркеров и исследование механизмов формирования редокс-статуса и редокс-сигналинга, опосредованных системами метаболизма кофермента А, глутатиона, кальцитриола при аутоиммунной и демиелинизирующей патологии ЦНС» (ГПНИ «Конвергенция-2025», подпрограмма «Междисциплинарные исследования и новые зарождающиеся технологии»; руководитель — А.Г. Мойсеенок).

Подана заявка в проект программы Союзного государства «Преодоление», касающаяся выявления новых соединений из растительного сырья, оказывающих антимикробное действие в отношении инфекционных агентов, устойчивых к действию современных лекарств (А.Г. Шляхтун и др.). Готовятся проекты заданий в государственную научно-техническую программу «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» (подпрограмма «Кардиология и кардиохирургия») по вопросам разработки технологий повышения сохранности аутовет (создание консервирующих составов) при операциях аорто-коронарного и иного шунтирования (А.Г. Шляхтун и др.), отраслевую научно-техническую программу «Пищевые технологии» (создание специализированных продуктов питания) и др. Готовятся совместные белорусско-узбекские и белорусско-азербайджанские проекты по вопросам изучения биологических и медицинских эффектов индивидуальных химических веществ из растительного сырья (А.Г. Шляхтун, А.В. Туманов, А.В. Шуриберко).

Прорабатывается вопрос об оказании платных услуг населению по определению содержания в биологических жидкостях (моча, кровь) макро- и микроэлементов (до 74) и составлению *микроэлементного паспорта* организма с последующим анализом обеспеченности населения микроэлементами и др.

**Заключение.** Институтом с момента его основания в 1970 г. достигнуты значительные успехи во всестороннем междисциплинарном изучении фундаментальных аспектов витаминологии и возможностей применения витаминов, их производных, а также антивитаминов в клинической практике с целью коррекции различных нарушений жизнедеятельности. Больших успехов Институт достиг в изучении биохимических аспектов действия алкоголя на организм и развития алкогольной зависимости, а также в разработке технологий коррекции различных нарушений, вызванных злоупотреблением алкоголя. Существенный вклад внесен в развитие аминокислотного направления, исследование биохимических аспектов опухолевого роста, разработку некоторых других проблем биохимии.

В дальнейшем Институт может достигнуть немалых успехов на пути разработки приоритетных направлений научной, научно-технической и инновационной деятельности, получения новых знаний и технологий, создания разработок, которые найдут применение в различных отраслях экономики.

## Список литературы

1. Андреева, М. Ф. Переписка. Воспоминания. Статьи. Документы / М. Ф. Андреева. — М. : Искусство, 1968. — 796 с.
2. Арцукевич, И. М. Функциональная роль сульфгидрильных групп тиаминпирофосфокиназы / И. М. Арцукевич, А. И. Воскобоев, Ю. М. Островский // Биохимия. — 1983. — Т. 48, №4. — С. 634–638.
3. Аткинсон, В. В. Сила мысли в деловой и повседневной жизни / В. В. Аткинсон // Сила мысли. — Мн. : БелЭн, 2004. — С. 10–119.
4. Балицкий, К. П. Нервная система и противоопухолевая защита / К. П. Балицкий [и др.]. — Киев : Наукова думка, 1983. — 255 с.
5. Биохимические механизмы гипополидемического действия пантетина при инсулиннезависимом диабете / И. Г. Обросова [и др.] // Хим.-фарм. журнал. — 1988. — Т. 22, № 11. — С. 1302–1309.
6. Буко, В. У. Простагландины при алкогольном поражении печени / В. У. Буко. — Минск : Навука і тэхніка, 1991. — 152 с.
7. Буко, В. У. Метаболические последствия алкогольной интоксикации / В. У. Буко, О. Я. Лукивская, А. М. Хоха. — Минск : Беларуская навука, 2005. — 207 с.
8. Валюк, Т. Ч. Регуляторное действие дипептида «Деглутам» на глутаминметаболизирующую систему в клетках карциномы SM-1 / Т. Ч. Валюк, М. Г. Величко, Л. И. Нефёдов // Биомед. химия. — 2005. — Т. 50, № 1. — С. 48–52.
9. Величко, М. Г. Тиамин и обмен пирувата у крыс опухоленосителей / М. Г. Величко, Ю. М. Островский, Р. В. Требухина // Вопр. мед. химии. — 1978. — Т. 24, вып. 2. — С. 220–224.
10. Величко, М. Г. Обмен лактата и пирувата в тканях крыс с карциносаркомой Уокер-256 при введении окситиамина / М. Г. Величко, Ю. М. Островский // Эксперим. онкол. — 1984. — № 2. — С. 54–57.
11. Взаимосвязь суточных ритмов уровня эндогенного этанола и 11-оксикортикостероидов в организме крыс / П. С. Пронько [и др.] // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. — 1987. — № 2. — С. 79–82.
12. Виноградов, В. В. Некоферментные функции витамина PP / В. В. Виноградов. — Минск : Наука и техника, 1987. — 199 с.
13. Виноградов, В. В. Некоферментная витаминология / В. В. Виноградов. — Гродно : Издательский центр ГрГМУ, 2000. — 535 с.
14. Виноградов, В. В. Стресс и витамины / В. В. Виноградов. — Гродно : Издательский центр ГрГМУ, 2000. — 260 с.
15. Виноградов, В. В. Стресс и патология / В. В. Виноградов. — Минск : Белорусская наука, 2007. — 351 с.
16. Включение метки S<sup>35</sup>-липоата в ткани животных в различные сроки после перевивки опухолей / Р. В. Требухина [и др.] // Вопр. онкологии. — 1975. — Т. 21, № 7. — С. 96–100.
17. Влияние алкалоидов чистотела на содержание и активность цитохром P450-зависимых монооксигеназ печени крыс / И. В. Зверинский [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2011. — № 1. — С. 76–80.
18. Воскобоев, А. И. Очистка и характеристика тиаминпирофосфокиназы из пивных дрожжей / А. И. Воскобоев, Ю. М. Островский, И. П. Черникевич // Биоорг. химия. — 1975. — № 10. — С. 1489–1497.
19. Воскобоев, А. И. Четвертичная структура и аллостерические свойства тиаминпирофосфокиназы из печени крыс / А. И. Воскобоев, И. М. Арцукевич, Ю. М. Островский // Биохимия. — 1976. — Т. 41, № 12. — С. 2196–2199.
20. Воскобоев, А. И. Изучение проницаемости тиаминдифосфата в гепатоциты крыс / А. И. Воскобоев, Ю. М. Островский // Вопр. мед. химии. — 1983. — Т. 29, вып. 4. — С. 42–44.

21. Воскобоев, А. И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамин / А. И. Воскобоев, И. П. Черникович. — Минск : Наука и техника, 1987. — 198 с.
22. Гепатопротекторная эффективность самоэмульгирующейся композиции с берберинном при экспериментальном токсическом поражении печени ацетаминофеном / И. П. Сутько [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2019. — Т. 16, № 1. — С. 56–64.
23. Горбач, З. В. Возможный механизм действия окситиамина на обмен нуклеиновых кислот / З. В. Горбач, Ю. М. Островский // Биохимия. — 1977. — Т. 42, № 3. — С. 531–533.
24. Горенштейн, Б. И. К характеристике острого авитаминоза В<sub>1</sub>, вызываемого антиметаболитами тиамин / Б. И. Горенштейн, Ю. М. Островский, Э. А. Гриценко // Вопр. мед. химии. — 1972. — Т. 18, вып. 1. — С. 58–65.
25. Действие ультразвука на ферроформы гемоглобина человека / В. А. Игнатенко [и др.] // Журнал физич. химии. — 1988. — Т. 62, № 9. — С. 2468–2476.
26. Заводник, Л. Б. Влияние многократного ионизирующего гамма-облучения на систему метаболизма ксенобиотиков в печени крыс / Л. Б. Заводник, В. У. Буко // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. — 2009. — № 2. — С. 73–76.
27. Зиматкин, С. М. Недостаточность тиамин в организме как предпосылка и следствие повышенного потребления алкоголя / С. М. Зиматкин, Т. И. Зиматкина, Ю. М. Островский // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. — 1996. — № 3. — С. 75–79.
28. 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.
29. Зиматкин, С. М. Метаболизм этанола в мозге / С. М. Зиматкин // Нейрохимия. — 1995. — Т. 12, № 1. — С. 19–26.
30. Змяненне гісталагічнай структуры надныркавых залоз пуцуюць пад уздзеяннем прэднізалона і яго камбінацыі з вітамінам Д / А. А. Астроўскі [і інш.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2017. — № 4. — С. 77–85.
31. Значение инсулин- и тиаминзависимых процессов в регуляции липидного обмена в печени крыс / В. У. Буко [и др.] // Вопр. мед. химии. — 1981. — Т. 27, вып. 6. — С. 795–800.
32. Значение стероидных гормонов в регуляции уровня эндогенного этанола в организме крыс / Ю. А. Тарасов [и др.] // Докл. АН БССР. — 1985. — Т. 29, № 11. — С. 1042–1044.
33. Изменение показателей редокс сигнального каскада и их модуляция производными пантотената в мозге крыс при воспалении / А. Г. Мойсеенок [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2011. — № 3. — С. 17–24.
34. Изучение действия ультрафиолетового излучения и ультразвука на сывороточный альбумин / И. И. Степура [и др.] // Журнал физич. химии. — 1986. — Т. 60, № 10. — С. 2535–2539.
35. Изучение эффективности применения готовой лекарственной формы на основе S-аденозилметионина в условиях неалкогольного стеатогепатита у крыс / Е. Е. Нарута [и др.] // Сб. науч. трудов «Биохимия и молекулярная биология». Вып. 3. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии / Глав. ред. Семененя И.Н. — Минск : ИВЦ Минфина, 2019. — С. 217–222.
36. Иоскевич, Н. Н. Пантенол как средство профилактики и лечения реперфузионно-реоксигенационного синдрома нижних конечностей / Н. Н. Иоскевич, А. Г. Мойсеенок, В. В. Зинчук // Журнал Грод. гос. мед. ун-та. — 2009. — № 1 (25). — С. 78–80.
37. Исследование влияния тиролиберина и его аналога Glp-His-Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> на токсичность этанола при хронической алкогольной интоксикации / К. В. Бородин [и др.] // Сборник ст. междунар. научно-практич. конф. «Актуальные медико-биологические проблемы алкогольной и других химических зависимостей», 3–4 октября 2019 г., г. Гродно, Республика Беларусь / глав. ред. И. Н. Семененя. — Минск : ИВЦ Минфина, 2019. — С. 16–21.
38. Кануннікава, Н. П. Транспарт і метабалізм ГАМК у структурах мозгу інтактных і стрэсаваных пацуюць з рознымі адносінамі да эжывання этанолу / Н. П. Кануннікава, П. С. Пранько, Ю. А. Тарасэ // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. — 1987. — № 4. — С. 84–87.

39. Квантово-химическое моделирование электронной структуры кверцетина и ингибирование кверцетином и комплексом кверцетин–гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин перекисного окисления липидов в митохондриях и эритроцитах крыс / А. Г. Вейко [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. — 2018. — Т. 63, №4. — С. 500–512.
40. Кинетическая характеристика пируват- и оксоглутаратдегидрогеназного комплексов из сердца человека / С. А. Струмило [и др.] // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1991. — № 1. — С. 107–109.
41. Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты / Ю. М. Островский [и др.]. — Минск : Наука и техника, 1974. — 263 с.
42. Колос, И. К. Свойства мембраноассоциированной тиаминтрифосфатазы печени кур / И. К. Колос, А.Ф. Макарчиков // Укр. биохим. журн. — 2015. — Vol. 87, №3. — Р. 37–46.
43. Колос, И. К. Метаболизм витамина В<sub>1</sub> в органах и тканях цыплят мясной и яичной продуктивности / И. К. Колос, А. Ф. Макарчиков // Веснік ГрДУ імя Янкі Купалы. Сер. 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. — 2019. — Т. 9, № 1. — С. 131–143.
44. Комар, В. И. Водорастворимые витамины в инфекционной патологии / В. И. Комар, В. С. Васильев, А. Г. Мойсеенок. — Минск : Наука и техника, 1991. — 207 с.
45. Комбинационная терапия как оптимальный подход для коррекции алкогольного поражения печени / Е. Б. Белоновская [и др.] // Гепатол. и гастроэнтерол. — 2018. — №2. — С. 200–206.
46. Комбинированная терапия экспериментального неалкогольного стеатогепатита урсодезоксихолевой кислотой в сочетании с перспективными гепатопротекторами / Е. Б. Белоновская [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2011. — №4. — С. 75–80.
47. Коррекция полиамином нарушений перекисного окисления липидов у крыс, длительно потреблявших этанол / С. М. Зиматкин [и др.] // Докл. АН Беларусі. — 1994. — №1. — С. 87–90.
48. Ларин, Ф. С. К характеристике взаимоотношений тиамин с обменом липидов / Ф. С. Ларин, Ю. М. Островский // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. — 1977. — №5. — С. 81–85.
49. Макарчиков, А. Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub> / А. Ф. Макарчиков. — Минск : Белорусская наука, 2008. — 433 с.
50. Макарчиков, А. Ф. Скорость молекулярной эволюции растворимой тиаминтрифосфатазы млекопитающих / А. Ф. Макарчиков // Укр. биохим. журн. — 2009. — Т. 81, №6. — С. 26–42.
51. Метаболические эффекты недостаточности функционально связанных В-витаминов / Ф. С. Ларин [и др.]; под ред. Ю. М. Островского. — Минск : Наука и техника, 1987. — 254 с.
52. Механизмы межвитаминных взаимоотношений: тиамин, пиридоксин, пантотеновая и никотиновая кислоты / Ю. М. Островский [и др.]. — Минск : Наука и техника, 1973. — 212 с.
53. Механизмы кардиопротекторного действия ниацина и аргинина при изадриновом стрессе / В. В. Виноградов [и др.] // Новости мед.-биол. наук. — 2011. — №3. — С. 5–13.
54. Механизмы некоферментного действия компонентов нейровазотропина при оксидативном стрессе и разработка антистрессорных тиаминсодержащих препаратов / В. В. Виноградов [и др.] // Докл. НАН Беларусі. — 2015. — Т. 59, №3. — С. 67–71.
55. Модуляция биосинтеза кофермента А в химиотерапии рака: преодоление лекарственной устойчивости *in vitro* и снижение побочных эффектов *in vivo* / Р. Р. Панчук [и др.] // Сб. науч. трудов «Биохимия и молекулярная биология». Вып. 3. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии / Глав. ред. Семененя И.Н. — Минск : ИВЦ Минфина, 2019. — С. 108–114.
56. Мойсеенок, А. Г. Пантотеновая кислота (биохимия и применение витамина) / А. Г. Мойсеенок; под ред. Ю. М. Островского. — Минск : Наука и техника, 1980. — 261 с.
57. Мойсеенок, А. Г. Пантотеновая кислота — витамин ежедневного применения / А. Г. Мойсеенок, С. Н. Омелянчик, Т. В. Дедович // Рецепт. — 2011. — №1 (75). — С. 94–101.
58. Мойсеенок, А. Г. Биосинтез и редокс-активность СоА — механизмы биологической и фармакологической активности производных пантотеновой кислоты / А. Г. Мойсеенок // Сб. на-

уч. трудов «Биохимия и молекулярная биология». Вып. 3. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии / Глав. ред. Семененя И.Н. — Минск : ИВЦ Минфина, 2019. — С. 91–97.

59. Морозкина, Т.С. Витамины: Краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармацевтических и биологических специальностей / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеенок. — Минск : ООО «Асар». — 112 с.

60. Мосолов, Н. Н. Влияние различных заместителей в молекуле тиамина на электронную структуру его тиазолового компонента / Н. Н. Мосолов, Ю. М. Островский, А. Шелленбергер // Биоорг. химия. — 1977. — № 5. — С. 646–653.

61. Надольник, Л. И. Свободнорадикальные процессы и метаболизм йода в клетках щитовидной железы / Л. И. Надольник. — Минск : Беларуская навука, 2014. — 275 с.

62. Недостаточность селена у населения Беларуси: возможные технологии предупреждения и коррекции / А. Г. Мойсеенок [и др.] // Наука и инновации. — 2012. — № 11. — С. 62–67.

63. Некоторые особенности гормональной регуляции гликемии у крыс с различной алкогольной мотивацией / В. В. Лелевич [и др.] // Проблемы эндокринологии. — 1986. — № 1. — С. 53–56.

64. Нефёдов, Л. И. Метаболизм таурина в печени крыс при недостаточности тиамина / Л. И. Нефёдов, Ю. М. Островский, Б. П. Фусточенко // Вопр. мед. химии. — 1982. — Т. 28, вып. 3. — С. 124–127.

65. Нефедов, Л. И. Таурин (биохимия, фармакология, медицинское применение) / Л. И. Нефедов. — Гродно : ГОУПП «Гродненская типография», 1999. — 145 с.

66. Нефедов, Л. И. Результаты фундаментальных исследований и разработок Института биохимии НАН Беларуси и их использование в народном хозяйстве Беларуси / Л. И. Нефедов // Наука — народному хозяйству. — Минск : Аналитический центр НАН Беларуси, 2002. — С. 872–887.

67. Никитин, В. С. Изменение митохондриального аппарата миоцитов папиллярных мышц при окситиаминовом В<sub>1</sub>-гиповитаминозе / В. С. Никитин, Р. И. Кравчук, Ю. М. Островский // Докл. АН БССР. — 1982. — № 5. — С. 458–461.

68. Образование NO при взаимодействии нитрита с гемоглобином / И. И. Степура [и др.] // Биохимия. — 1997. — Т. 62, № 9. — С. 1122–1129.

69. Окислительная трансформация тиаминина и его метаболитов под действием нитрита и оксоферрильных форм миоглобина / А. Ю. Опарин [и др.] // Журнал Грод. гос. мед. ун-та. — 2009. — № 2 (26). — С. 138–141.

70. Окситиамин как регулятор внутриклеточного пула фосфопентоз / Ю. М. Островский [и др.] // Докл. АН БССР. — 1980. — Т. 24, № 1. — С. 75–78.

71. Особенности влияния окситиамина и цитрата на некоторые реакции пентозофосфатного цикла и гликолиза / Р. В. Требухина [и др.] // Вопр. мед. химии. — 1977. — Т. 23, вып. 2. — С. 266–270.

72. Островский Ю.М., Ульрих И., Хольцер Х. Молекулярный вес тиаминкиназы из печени крысы Островский Ю.М., Ульрих И., Хольцер Х. // Докл. АН БССР. — 1971. — № 8. — С. 755–757.

73. Островский, Ю.М. Антивитамины в экспериментальной и лечебной практике / Ю. М. Островский. — Минск : Беларусь, 1973. — 176 с.

74. Островский, Ю. М. О роли серы тиазолового компонента тиаминина в реакциях, катализируемых тиаминдифосфатом / Ю. М. Островский, Н. Н. Мосолов, М. Н. Садовник // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. — 1974. — № 5. — С. 69–75.

75. Островский, Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиаминина / Ю. М. Островский. — Минск : Наука и техника, 1975. — 424 с.

76. Островский, Ю. М. Взаимоотношения опухоли и организма в использовании <sup>14</sup>C-тиаминина / Ю. М. Островский, Р. В. Требухина, Г. Н. Михальцевич // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1979. — № 12. — С. 708–710.

77. Островский, Ю. М. Пируват и лактат в животном организме / Ю. М. Островский, М. Г. Величко, Т. Н. Якубчик. — Минск : Наука и техника, 1984. — 174 с.
78. Островский, Ю. М. Биологический компонент в генезисе алкоголизма / Ю. М. Островский, В. И. Сатановская, М. Н. Садовник. — Минск : Наука и техника, 1986. — 95 с.
79. Островский, Ю. М. Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя / Ю. М. Островский [и др.]. — Минск : Наука и техника, 1988. — 263 с.
80. Островский, Ю. М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю. М. Островский, С. Ю. Островский. — Минск : Навука і тэхніка, 1995. — 280 с.
81. Производные пантотеновой кислоты: Разработка новых витаминных и фармакотерапевтических средств / А. Г. Мойсеенок [и др.]. — Минск : Наука и техника, 1989. — 213 с.
82. Пронько, П. С. Концентрация ацетальдегида в крови у интактных крыс, при алкогольной интоксикации и действии ингибиторов альдегиддегидрогеназы / П. С. Пронько, А. Б. Кузьмич, С. М. Зиматкин // *Вопр. наркологии*. — 1993. — №3. — С. 40–42.
83. Пронько, П. С. Биомаркеры в диагностике алкоголизма / П. С. Пронько // *Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук*. — 2009. — №2. — С. 103–116.
84. Пронько, П. С. Роль ацетальдегида в механизмах чувствительности, толерантности и влечения к алкоголю / П. С. Пронько. — Минск : Беларуская навука, 2016. — 281 с.
85. Профилактическое применение новых производных урсодезоксихолевой кислоты при экспериментальном алкогольном стеатогепатите / Е. Б. Белоновская [и др.] // *Эксперим. и клин. фармакол.* — 2013. — Т. 76, №1. — С. 25–29.
86. Разводовский, Ю. Е. Алкогольные психозы и сердечно-сосудистая смертность в России, Украине и Беларуси / Ю. Е. Разводовский // *Девиантология*. — 2019. — Т. 3, №1. — С. 18–24.
87. Разводовский, Ю. Е. Влияние повышения цен на водку на уровень потребления алкоголя в России и Беларуси / Ю. Е. Разводовский // *Наркология*. — 2019. — Т. 18, №10. — С. 46–51.
88. Разводовский, Ю. Е. Влияние структуры продажи алкоголя на уровень суицидов / Ю. Е. Разводовский // *Академ. журн. Запад. Сибири*. — 2019. — Т. 15, №4. — С. 52–56.
89. Разводовский, Ю. Е. Ритмологические особенности заболеваемости алкогольными психозами в Беларуси / Ю. Е. Разводовский // *Вопр. наркологии*. — 2019. — №9. — С. 54–59.
90. Разводовский, Ю. Е. Потребление алкоголя и гендерный градиент уровня суицидов в Европе / Ю. Е. Разводовский, С. А. Игумнов, С. В. Кондричин // *Суицидология*. — 2019. — Т. 10, №1. — С. 80–83.
91. Саймонтон, К. Возвращение к здоровью : Новый взгляд на тяжелые болезни; пер. с англ. / К. Саймонтон, С. Саймонтон. — СПб. : Питер : Питер-пресс, 1995. — 171 с.
92. Сатановская, В. И. Системы обмена этанола и ацетальдегида в печени крыс при развитии толерантности к этанолу / В. И. Сатановская // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* — 1990. — №2. — С. 161–162.
93. Селевич, М. И. Влияние дисульфирама на метаболизм липидов в печени крыс / М. И. Селевич, Л. М. Караедова, Ю. М. Островский // *Фармакол. и токсикол.* — 1989. — №6. — С. 69–72.
94. Сельченко, К. В. Ключ к будущему: Практическое руководство для пользователя арт-технологического психопроектора / К. В. Сельченко. — Мн. : Харвест, 2004. — 768 с.
95. Семененя, И. Н. Роль рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом, в контроле алкогольной зависимости и лечении сопутствующих заболеваний печени / И. Н. Семененя, А. Г. Шляхтун, Е. Ф. Радута // *Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук*. — 2019. — Т. 16, №2. — С. 244–256.
96. Синтез и противоопухолевая активность производных витамина В<sub>1</sub>, содержащих ферроценовый фрагмент / Д. А. Опарин [и др.] // *Хим.-фарм. журнал*. — 1996. — Т. 30, №2. — С. 11–13.
97. Слышенков, В. С. Предупреждение пантотенатом нарушений системы глутатиона и показателей состояния синаптосомальной мембраны при моделировании окислительного стресса / В. С. Слышенков, А. А. Шевалье, А. Г. Мойсеенок // *Нейрохимия*. — 2006. — Т. 23, №3. — С. 1–5.

98. Смирнов, И. В. Психотехнологии. Компьютерный психосемантический анализ и психокоррекция на неосознаваемом уровне / И. В. Смирнов, Е. В. Безносюк, А. Н. Журавлев. — М. : Издательская группа “Прогресс” — “Культура”, 1995. — 416 с.
99. Степуро, И. И. Взаимодействие рибофлавина и гемопротеинов с органическими свободными радикалами и супероксиданионами, генерируемыми в ультразвуковом поле / И. И. Степуро, Р. И. Адамчук, А. И. Степуро // Биофизика. — 2002. — Т. 47, №6. — С. 903–913.
100. Степуро, И. И. Окисление тиамин под действием диоксида азота, генерируемого ферри-формами миоглобина и гемоглобина в присутствии нитрита и пероксида водорода / И. И. Степуро, С. А. Маскевич, В. Ю. Титов // Биохимия. — 2012. — Т. 77, №1. — С. 53–70.
101. Струмило, С. А. Витаминзависимые ферменты надпочечников: дегидрогеназы 2-оксокислот / С. А. Струмило, В. В. Виноградов. — Минск : Наука и техника, 1988. — 213 с.
102. Сутько, И. П. Влияние 5-формилтетрагидрофолиевой кислоты на характер изменения активности цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы гепатоцитов и некоторые биохимические показатели крови крыс при хронической алкогольной интоксикации / И. П. Сутько // Журнал Грод. гос. мед. ун-та. — 2011. — №1. — С. 49–52.
103. Тиамин ингибирует образование дитиозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина / А. И. Степуро [и др.] // Биохимия. — 2008. — Т. 73, №9. — С. 1281–1293.
104. Тиаминная активность оксоферрильных форм миоглобина / И. И. Степуро [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. — 2018. — Т. 63, №2. — С. 176–187.
105. Уплыў кверцэтына і яго камбінацыі з цыкладэкстрынам на загойванне апёкавых ран у лабараторных пацукоў / А. А. Бакуновіч [і інш.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2019. — Т. 16, №4. — С. 410–423.
106. Фармакология, биологические свойства и медицинское применение экстракта расторопши пятнистой / В. У. Буко [и др.] // Рецепт. — 2009. — №6. — С. 110–118.
107. Фусточенко, Б. П. Включение радиоактивных предшественников белка и РНК в полисомы печени животных при введении окситиамина / Б. П. Фусточенко, Ю. М. Островский // Биохимия. — 1978. — Т. 43, №2. — С. 305–311.
108. Чумакова, О. В. Сравнительное исследование компонентов холинергической системы мозга крыс, различающихся по выраженности алкогольной мотивации / О. В. Чумакова, Ю. М. Островский // Вопр. мед. химии. — 1987. — Т. 33, вып. 2. — С. 142–145.
109. Экспериментальная витаминология: справочное руководство / Ю. М. Островский [и др.]. — Минск : Наука и техника, 1979. — 551 с.
110. Absorption and biotransformation of the coenzyme A precursor D-pantethine in rat hippocampus / A. G. Moiseenok [et al.] // Neurochem. J. — 2010. — Vol. 4, №. 4. — P. 257–264.
111. Antidiabetic effects and erythrocyte stabilization by red cabbage extract in streptozotocin-treated rats / V. U. Buko [et al.] // Food & Function. — 2018. — №9. — P. 1850–1863.
112. Antioxidative effect of prostaglandin E<sub>2</sub> in thioacetamide-induced liver cirrhosis / V. U. Buko [et al.] // Exp. Toxicol. Pathol. — 1997. — V. 49, №1–2. — P. 141–146.
113. Betulin attenuated liver damage by prevention of hepatic mitochondrial dysfunction in rats with alcoholic steatohepatitis / V. U. Buko [et al.] // Physiol. International. — 2019. — Vol. 106, №4. — P. 323–334.
114. Buko, V. U. Cytochrome P-450 and free radical generation in rat liver microsomes under the influence of prostaglandin E<sub>1</sub> / V. U. Buko, V. V. Sadovnichy // Biochem. Mol. Biol. Internation. — 1996. — Vol. 39, №6. — P. 1177–1184.
115. Correction of postischemic disturbances in the hemispheres of the brain using precursors of succinyl-CoA biosynthesis / N. Z. Bashun [et al.] // Neurochem. J. — 2007. — Vol. 1, №3. — P. 249–252.
116. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) peel polyphenol-rich extract attenuates rat liver mitochondria impairments in alcoholic steatohepatitis in vivo and after oxidative treatment in vitro / I. B. Zavodnik [et al.] // J. Funct. Foods. — 2019. — Vol. 57. — P. 83–94.

117. Cytoprotection of pancreatic  $\beta$ -cells and hypoglycemic effect of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: sertraline complex in alloxan-induced diabetic rats / V. U. Buko [et al.] // *Chem.-Biol. Interactions*. — 2016. — №244. — P. 105–112.
118. Evaluation of antifibrotic effects of coffee and cocoa extracts in rats with thioacetamide-induced fibrosis / G. Budryn [et al.] // *Eur. Food Res. Technol.* — 2018. — Vol. 244, Issue 12. — P. 2107–2115.
119. Garfield, C. A. *Peak Performance : Mental Training Techniques of the World, Greatest Athletes* / C. A. Garfield. — New York, 1984. — 319 c.
120. Falling in love is associated with immune system gene regulation / D. R. Murray [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. — 2019. — Vol. 100. — P. 120–126.
121. Inhibition of inducible nitric oxide synthase activity prevents liver recovery in rat thioacetamide-induced fibrosis reversal / O. Y. Lukivskaya [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* — 2008. — Vol. 38, №5. — P. 317–325.
122. Mind-controlled transgene expression by a wireless-powered optogenetic designer cell implant / M. Folcher [et al.] // *Nature Communications*. — 2014. — Vol. 5. — P. 1–11. <https://www.sciencedirect.com/science/journal/03064530/100/supp/C>.
123. Ostrovsky Yu.M. Endogenous ethanol — its metabolic, behavioral and biomedical significance // *Alcohol*. — 1986. — Vol. 3. — P. 239–247.
124. Ostrovsky, Yu. M. An attempt to evaluate diagnostic and prognostic significance of blood endogenous ethanol in alcoholics and their relatives / Yu. M. Ostrovsky, P. S. Pronko, S. N. Shishkin // *Alcohol*. — 1989. — Vol. 6. — P. 97–102.
125. Papac, J. R. Spontaneous regression of cancer / J. R. Papac // *Cancer Treat. Rev.* — 1996. — Vol. 22. — P. 395–423.
126. Pituitary tumor transforming gene as a novel regulatory factor of liver fibrosis / V. U. Buko [et al.] // *Life Sciences*. — 2015. — Vol. 132. — P. 34–40.
127. Polysaccharides of mushroom phallus impudicus mycelium: immunomodulating and wound healing properties / V. U. Buko [et al.] // *Modern Food Sci. Technol.* — 2019. — Vol. 35, №9. — P. 30–37.
128. Pronko, P. S. Effect of aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase inhibitors and ethanol on blood and liver ketone bodies in the rat / P. S. Pronko, S. M. Zimatkin, A. B. Kuzmich // *Pol. J. Pharmacol.* — 1994. — Vol. 46. — P. 445–449.
129. Pronko, P. S. Acinar distribution of rat liver arylamine N-acetyltransferase: effect of chronic ethanol and endotoxin exposure / P. S. Pronko, H. Jarvelainen, K. O. Lindros // *Pharmacol. Toxicol.* — 2002. — Vol. 90. — P. 150–154.
130. Protective effects of norursodeoxycholic acid versus ursodeoxycholic acid on thioacetamide-induced rat liver fibrosis / V. U. Buko [et al.] // *J. Clin. Exp. Hepatol.* — 2014. — Vol. 4, №4. — P. 293–301.
131. Razvodovsky, Y. E. The effects of alcohol pricing policy on suicide rates in Russia / Y. E. Razvodovsky // *Alkoholizm i Narkomania*. — 2019. — Vol. 32, №1. — P. 71–76.
132. Reversal of experimental ethanol-induced liver steatosis by Borage oil / O. Y. Lukivskaya [et al.] // *Phytotherapy Research*. — 2012. — Vol. 26, №11. — P. 1626–1631.
133. 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.
134. Zimatkin, S. M. Ethanol metabolism in the brain / S. M. Zimatkin, R. A. Deitrich // *Addiction Biology*. — 1997. — Vol. 2. — P. 387–399.

**50<sup>th</sup> ANNIVERSARY**  
**OF THE INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF BIOLOGICALLY ACTIVE**  
**COMPOUNDS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS**

---

*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 represents the main landmarks in development and the most outstanding achievements in scientific and organizational activities of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the NAS of Belarus and the most important findings of research and development based on the results of the 50-year performance. Prospects for further development of the Institute are outlined.

---

**ИЗ АКАДЕМИЧЕСКОГО ОТДЕЛА В АКАДЕМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

---

*Мойсеёнок А.Г.*

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

**Резюме.** Приводятся сведения о структуре, научном потенциале и научных направлениях подразделений Отдела регуляции обмена веществ АН БССР в начале 1985 г., определивших решение об организации на его базе Института биохимии АН БССР. Дан краткий анализ первых лет развития Института биохимии и перспектив его развития (начиная с 1988 г.) на основании справки, подготовленной основателем академического учреждения в г. Гродно академиком Ю.М. Островским. Обращается внимание на актуальность предложений Ю.М. Островского по реформированию науки и ее развитию в современных условиях.

Идея создания полноценного академического учреждения на Гродненщине была заложена при открытии Отдела регуляции обмена веществ (ОРОВ) АН БССР в 1970 г. и последовательно реализовывалась в его развитии по мере укрепления его кадровой и материальной базы. Уже на рубеже 1975–1976 гг. во время освоения нового лабораторного корпуса руководителем Отдела, профессором Ю.М. Островским был поставлен вопрос об организации в г. Гродно Института регуляции обмена веществ АН БССР с учетом фактически сформировавшихся научных лабораторий и инструментально профилированных лабораторий общего назначения. К числу первых относились: молекулярных механизмов регуляции обмена веществ (руководитель Ю.М. Островский), межвитаминовых взаимоотношений (руководитель А.Г. Мойсеёнок), витаминно-гормональных взаимоотношений (руководитель В.В. Виноградов), биохимической фармакологии (руководитель П.И. Лукиенко), биоорганической химии (руководитель Н.А. Кравченко). Ключевыми научными лидерами в этот период являлись 2 доктора и 9 кандидатов наук, кроме того, выполнялись 3 докторские и 11 кандидатских диссертаций при общей численности сотрудников 85 человек (в том числе научного персонала — 37 человек). Приборное оснащение подразделений к 1976 г. было на исключительно высоком уровне, что получило одобрение Отделения биологических наук и Президиума АН БССР по результатам комплексной проверки. Однако инициатива Ю.М. Островского не получила поддержки руководства по весьма аргументированной причине. В Отделе юридически существовали только две научные лаборатории, так как их руководителями были доктора наук (Ю.М. Островский, П.И. Лукиенко). Было рекомендовано усилить подготовку специалистов высшей квалификации, прежде всего докторов наук, расширить направление сотрудников в целевую аспирантуру и докторантуру. Реальный ход событий после 1976 г. (этапа работы в новом лабораторном корпусе) показал, что в ближайшее пятилетие, т. е. до 1981 г. (включительно) было защищено 18 кандидатских диссертаций: И.И. Степура, С.А. Струмило (1976), В.П. Гриневич, К.А. Мандрик (1977), П.С. Пронько, И.П. Черникевич, В.У. Буко, З.В. Горбач (1978), Г.З. Абакумов, М.И. Бушма, И.М. Арцукевич (1979), Т.И. Зиматкина, Т.И. Якубчик, Л.И. Нефёдов (1980), Т.Н. Будько, Л.И. Сушко, В.Н. Сатановская, А.К. Павленя (1981). Однако работы докторского уровня, выполнявшиеся в этот период, не были завершены.

Вместе с тем к 1980 г. прочное место в структуре научных исследований ОРОВ заняли исследования тиамин-зависимых процессов метаболизма двууглеродного радикала, эндогенного этанола и смежных областей биохимии, которые выполнялись под руководством М.Н. Садовник, защитившей кандидатскую диссертацию в 1972 г. Это не осталось без внимания со стороны руководства Президиума АН БССР, который высоко оценил деятельность ОРОВ в указанном направлении наряду с результатами организованного в 1980 г. в г. Гродно Всесоюзного симпозиума по биохимии алкоголизма (6-й Гродненский). Вероятно, это было в контексте общесоюзной тенденции усиления борьбы с пьянством и алкоголизмом директируемой руководством страны и республики. Открытие лаборатории биохимии спиртов и альдегидов под руководством к.б.н. М.Н. Садовник в 1981 г. стало прецедентом для создания еще двух лабораторий: биохимии эндокринных желез (ранее — витаминно-гормональных взаимоотношений) — руководитель к.б.н. В.В. Виноградов, лаборатории коферментов (ранее — межвитаминных взаимоотношений) — руководитель к.м.н. А.Г. Мойсеёнок, как наиболее перспективных в развитии кадровой базы и основных научных направлений.

В период 1981–1985 гг. научный коллектив ОРОВ был укреплен 2 защитами докторских диссертаций (В.В. Виноградов — 1984 г., С.А. Струмило — 1986 г.) и 22 кандидатских диссертаций (В.Ю. Островский, Г.Г. Воронов, М.Г. Величко, Г.И. Индушко, С.Б. Сенкевич — 1982 г.; В.И. Кондаков, С.Ю. Островский, Э.А. Гриценко, М.И. Селевич, А.В. Наумов — 1983 г.; С.С. Маглыш, А.А. Баньковский, Г.М. Яковлева, С.В. Забродская, В.А. Аверин — 1984; А.Н. Бородинский, И.Б. Заводник, Ю.М. Смирнов, В.С. Лучко, А.М. Хоха, Н.И.Таранда, Ю.В. Бандажевский — 1985 г.). На базе лаборатории коферментов были подготовлены 5 кандидатов наук, работающих в других учреждениях города и страны: Я.Ю. Карась (1982 г.), Е.А. Цвербаум и А.П. Мартинчик (1983 г.), В.А. Овчинников (1984 г.), В.Н. Петров (1985 г.).

Становление научной деятельности ОРОВ происходило в тесной связи с Научным советом АН СССР по проблемам биохимии животных и человека (руководитель академик С.Е. Северин), проблемной комиссией по витаминологии (руководитель профессор В.Б. Спиричев) Научного совета по медицинским проблемам питания АМН СССР (руководитель академик АМН СССР А.А. Покровский) и Всесоюзным научным советом по проблемам алкоголизма и наркомании. Установились прочные научные связи с ведущим научно-производственным объединением «Витамины» (руководитель профессор В.И. Гунар). В 1982 г. на базе ОРОВ в г. Гродно состоялась IV-я Всесоюзная школа «Пути регуляции ферментативной активности» под руководством академика С.Е. Северина, а в 1983 г. прошел Всесоюзный симпозиум «Антивитамины в регуляции обмена веществ» (7-й Гродненский). Увеличилось количество международных связей сотрудников (международные научные мероприятия) и визитов иностранных ученых в институт.

К моменту формирования Института биохимии АН БССР (1985 г.) коллектив насчитывал 189 сотрудников, в том числе 95 научных, 6 докторов и 46 кандидатов наук. Помимо 5 ранее существовавших научных лабораторий при основании Института биохимии были сформированы еще 4 научных подразделения: энзимологии и биотехнологии (руководитель А.И. Воскобоев), биофизики (руководитель И.И. Степура), биохимии опухолей (руководитель Р.В. Требухина), математического моделирования (руководитель С.Ю. Островский). В ближайшие годы после реорганизации ОРОВ в Институт биохимии число докторов наук выросло до 6, а кандидатов наук — до 57. Защитил докторскую диссертацию А.И. Воскобоев (1986 г.), кандидатские — В.М. Шейбак, С.С. Пузач, О.В. Чумакова, В.Г. Петушок, Н.С. Немеря, Н.А. Дорошкевич, А.А. Островский, Л.М. Караедова (1986 г.).

Как следует из «Краткой информации об Институте биохимии АН БССР», подготовленной 19 сентября 1988 г. Ю.М. Островским, Институт включал 9 лабораторий, в которых были заняты 106 научных сотрудников (в том числе 6 докторов наук, 57 кандидатов). Общее научное направление — регуляция обмена веществ на молекулярном, субклеточном и организменном уровнях. Основным предметом исследований являлось изучение роли витаминов (тиамин, пантотенат, никотинат), гормонов (стероиды, инсулин), субстратов витаминзависимых реакций (аминокислоты, кетокислоты, спирты, альдегиды) и некоторых ксенобиотиков (этанол, медикаменты) в обеспечении или нарушении метаболического гомеостаза.

Оценивая первые годы деятельности Института биохимии, руководитель и основатель учреждения указывал на основные направления деятельности: *«фундаментальные исследования концентрируются на изучении биохимии тиамин- и пантотеновой кислот (системы синтеза и катаболизма тиаминфосфатов, коэнзима А, тиамин- и КоА-зависимые ферменты), изменений метаболических потоков путем регуляции уровня коферментов и антикоферментов, гормонального опосредования эффектов витаминов и антивитаминов, биосинтеза биогенных спиртов и альдегидов и взаимодействия последних с белками, аминокислотами и биогенными аминами. На основе фундаментальных исследований сформулированы принципы регуляции взаимоотношений углеводного и липидного обменов в животном организме, предложена новая концепция патогенеза алкоголизма, разработаны приемы оптимизации витамин- и гормонотерапии, новые методы лечения аммиачных ожогов глаз и утилизации некоторых биоактивных отходов химической и пищевой промышленности, способы диагностики, а также приемы более эффективной консервации биологического материала (онкоклетки, сперматозоиды). Сотрудниками Института биохимии опубликовано за последние 10 лет существования коллектива 12 монографий, более 1400 научных публикаций, в том числе 100 — в международных изданиях (32 статьи и 68 тезисов), получено 38 авторских свидетельств на изобретения».*

Развитие и совершенствование структуры Института, базовых научных направлений было проанализировано в 1988 г., когда менялась общественно-политическая атмосфера страны, взаимоотношения центральных и республиканских органов управления наукой и образованием. В этот период институт насчитывал 228 сотрудников, включая 105 научных работников (6 докторов и 56 кандидатов наук). Это был период достижения максимальной численности научного персонала (в советский период) и создания условий для результативного научного роста активных сотрудников и формирования на базе Института второго научного учреждения — Гродненского филиала Наркоцентра АМН СССР. Какими представлялись перспективы развития Института биохимии его основателю академику АН БССР Ю.М. Островскому в 1988 г.? Судя по подготовленной записке о перспективах развития на 1988–1993 гг., генеральными направлениями предполагались следующие:

- 1) витамины в обеспечении метаболического гомеостаза;
- 2) биохимические механизмы патогенеза алкоголизма.

По мнению Ю.М. Островского, *«в рамках этих направлений Институт биохимии пользуется признанным авторитетом по проблемам биохимии тиамин- и пантотеновой кислот, витамин-лекарственных взаимодействий, по изучению витаминзависимых ферментов и их роли в обмене веществ, по изучению антивитаминов, биохимии спиртов и альдегидов, некоторых частных проблем онкологии и общей биохимии. В Гродно проводились неоднократно различные всесоюзные симпозиумы, школы, совещания. Результаты наших исследований ежегодно принимаются для представления на союзных и международных научных форумах. О нас*

многие знают, многие на нас ссылаются или запрашивают наше мнение по отдельным биохимическим вопросам. Признание авторитета, однако, понятие динамическое. Авторитет трудно зарабатывается и им следует дорожить, его нужно закреплять и всячески повышать. Именно под таким углом зрения сейчас самое время сделать обзор первоочередных задач и тенденций развития учреждения на ближайшие 5 лет.

Вряд ли целесообразно терять накопленный потенциал знаний радикальной сменой направлений наших исследований. На нынешнем этапе следует всячески повышать методологический и технический уровень нашей работы. Нельзя из года в год заниматься накопительством данных, получаемых одними и теми же методами исследования. Пора ставить вопросы обновления методической базы не только отдельных исполнителей, но и групп, и лабораторий. Полагаю, что первоочередными задачами в этом плане должны стать новые методы иммунологического анализа, жидкостной хроматографии высокого давления, использования методов остановленной струи в энзимологических работах, привлечение новых математических методов, планирования и оценки эксперимента, внедрения приемов рецепторного анализа и т. п. Для успешного решения сложных методических задач будут более широко практиковаться длительные прикомандирование отдельных сотрудников в соответствующие отечественные и зарубежные лаборатории. Новый методический уровень не самоцель, а лишь средство более успешного решения наших сугубо научных и тесно связанных с ними прикладных задач. В последних по профилю нашей квалификации видятся новые способы диагностики и лечения ряда заболеваний, оптимизация режимов фармако- и витаминотерапии, совершенствование средств и способов коррекции метаболических нарушений в человеческом и животном организме. Говоря более общим языком — большая отдача в решении повседневных задач здравоохранения и животноводства.

Институт не окостеневшая система, поэтому мы должны видеть пути к его тематическому и кадровому обновлению. Нужны свежие идеи и новые взгляды на наши проблемы. С этой целью администрация Института должна шире привлекать к постановке новых задач инициативные группы молодых исследователей, у которых впереди не 10–15 лет плодотворной работы, а 20–30 лет, т. е. сроки, за которые любая новая идея обрастает своей школой, своими последователями и дает новые оригинальные научные и прикладные решения. Лучший путь для решения таких задач — создание временных (преимущественно молодежных) творческих коллективов. Нужно четко представлять только, что решать эту задачу следует временными жертвами, выделяя в такие коллективы энтузиастов из любого нашего подразделения. Временный научный коллектив не средство удовлетворения личных материальных интересов, а оптимальный способ проявить себя каждому молодому исследователю. Формирование самостоятельности инициативного молодого научного исследователя или их группы должно начинаться с освобождения от сковывающей опеки формальных руководителей. Уместны в такой ситуации лишь научные консультанты. Каждый творческий молодежный коллектив будет существовать в Институте как самостоятельное подразделение. В вопросах формирования таких коллективов особую роль должно играть расширение прав Ученого Совета, который в самое ближайшее время будет реформирован на новых демократических началах. Приветствоваться будет, в решении назревших задач, конкурсное начало при формировании молодежных творческих коллективов.

Большие задачи решаются только высококвалифицированными кадрами. Ближайшее пятилетие должно дать Институту не менее 5 новых, выросших из наших рядов, докторов

наук. Пришло время Институту биохимии стать обладателем спецсовета по защите диссертаций, чтобы не наши специалисты искали себе оппонентов и спецсоветы по всей стране, а чтобы к нам в Гродно ехали из всей страны за присуждением ученой степени. Вопрос с созданием спецсовета имеет для Гродно и межотраслевое значение, поскольку биохимики имеются в ГГУ, ГГМИ и СХИ. Спецсовет — еще одна веха в поднятии научного авторитета нашего коллектива.

Сейчас много говорят и все настоятельнее требуют поднять уровень исследований до мировых стандартов. Задача в наших условиях, скажем прямо, не из легких, если учесть состояние и перспективы улучшения нашей инструментальной базы. Один из путей, который признан совсем недавно перспективным в этом плане, это создание специальных инструментальных подразделений. Путь этот нами принят несколько лет назад, он оправдал себя и будет всячески развиваться. Второй возможный вариант решения инструментальных проблем — заключение договоров о научном сотрудничестве с головными союзными институтами. Институтами стран СЭВ и капиталистических стран. Развитие двухстороннего сотрудничества поэтому будет всячески поощряться, но это накладывает и новые серьезные обязательства на проводников такого сотрудничества. Необходимо совершенное знание английского языка, свободное владение иностранной научной литературой, контакты с иностранной научной периодикой путем зарубежных публикаций. Не может быть мирового уровня без широких мировых контактов. Рекомендуется всячески способствовать установлению двухсторонних творческих научных контактов с зарубежными научными центрами вплоть до направления туда для длительных стажировок отдельных молодых специалистов.

Переход науки на условия максимального самофинансирования весьма остро ставит проблемы договорных отношений с прикладными ведомствами. Всячески будут поощряться хоздоговорные отношения на лимитной и безлимитной основе. В последнем случае предполагается стимулировать заинтересованность исполнителей максимальным поощрением (до 5–6 месячных окладов) из заработанных по хоздоговору средств, отчисляемых от гарантированного или достигнутого экономического эффекта. Необходимо продумать еще несколько вариантов коммерческого обеспечения самофинансирования путем разовой продажи отдельных разработок (препараты, способы) и, может быть, создания для указанных целей опытного производства или даже научного кооператива.

Мы живем и работаем не в вакууме и питаемся не духом святым. Упорядочение зарплаты — сложная и острая проблема. По-видимому, следует чаще прибегать к переаттестации не как средству повышения окладов, а как к способу отнятия у нерадивых и добавок активным. Некоторые частные проблемы в этой сфере в течение ближайших 3–4 лет можно будет решать путем дополнительных (особо важных) научных знаний. В далекой же перспективе это основа хоздоговора, госзаказы, отчисления от прибыли. С последними весьма связаны и многие наши социальные проблемы. Бюджетные отчисления на жилищное строительство невелики и всех наших проблем решить не могут. Пока удалось достичь выделения средств на несколько квартир в 1989 г., наконец конструктивно стал рассматриваться вопрос о средствах на общежитие для малосемейных. Мы можем оказывать материальную помощь в кооперативном жилищном или индивидуальном строительстве. Из отчислений от прибыльного хоздоговора такие суммы ответственным исполнителям могут составлять по несколько тысяч рублей безвозмездно. Пора учиться зарабатывать самим на себя».

Приведенный документ на полном основании может быть признан как духовное завещание основателя Института биохимии, его видение развития в новых условиях жизнедеятельности с полным пониманием необходимости изменений и перестройки научного коллектива, повышения эффективности научного процесса. В 1989–1991 гг. часть задумок академика Ю.М. Островского была осуществлена, но его ученикам и коллективу пришлось взять на свои плечи решение сложных грядущих задач, которые обострились и остались тяжким бременем после безвременной кончины Юрия Михайловича в последний день судьбоносного 1991 г.

## FROM THE ACADEMIC DEPARTMENT TO ACADEMIC INSTITUTION

---

*Moiseenok A.G.*

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

***Summary.*** *The structural organization, scientific potential and research activities of subdivisions included in the Department of Metabolism Regulation of the Academy of Sciences of the BSSR at the beginning of 1985 is described explaining the decision to organize the Institute of Biochemistry of the Academy of Sciences of the BSSR. On the basis of the documents prepared by Yuri Mikhailovich Ostrovsky who was the founder of the Academic Institution in Grodno a brief overview has been made considering the development of the Institute in the early years and long-term prospects for its development since 1985. Special attention is paid to the relevant ideas of Yu.M. Ostrovsky for implementing reforms in the science sector and research developments in modern times.*

## НАУЧНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ АЛКОГОЛИЗМА В ИНСТИТУТЕ БИОХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ

---

*Лелевич В.В.*

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

**Резюме.** В статье отражена история зарождения и развития научного направления по изучению алкоголизма в Институте биохимии НАН Беларуси. Подчеркнута ведущая роль в этом академика Ю.М. Островского. Представлены докторские и кандидатские диссертации сотрудников института, а также результаты научных форум, прошедших в стенах учреждения, посвященных различным биохимическим аспектам алкоголизма.

Гродненская научная биохимическая школа сформировалась в начале 60-х годов прошлого века под руководством Ю.М. Островского. Научная тематика руководимой им кафедры биохимии Гродненского государственного медицинского института (ГГМИ) была сконцентрирована преимущественно на разных аспектах метаболической активности витамина В<sub>1</sub> — тиамина, нарушениях обменных процессов при различной обеспеченности организма человека и животных витаминами. Результаты исследований докладывались на республиканских, всесоюзных и международных симпозиумах, конференциях и съездах. Защита Ю.М. Островским докторской диссертации в 1964 г., а также ряда кандидатских диссертаций его учениками привели в 1967 г. к организации проблемной витаминологической лаборатории на базе кафедры биохимии и ЦНИЛ ГГМИ. Проблемная лаборатория по витаминологии подготовила группу квалифицированных биохимиков, которые сформировали штат Отдела регуляции обмена веществ Академии наук БССР (ОРОВ), открытый в Гродно в 1970 г., 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 в работе 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. Данные научные направления успешно развивались, что подтверждается многими защищенными докторскими и кандидатскими диссертациями, изданными монографиями и журнальными статьями.

В середине 70-х годов научные интересы Ю.М. Островского начали распространяться на такую актуальную медико-социальную патологию, как алкоголизм. В то время наметились две на первый взгляд исключаящие друг друга тенденции, объясняющие возникновение данного заболевания. Одни считали алкоголизм следствием сугубо социальных причин, другие отстаивали точку зрения, что это болезнь, имеющая врожденные или приобретенные, но биологические предпосылки. Биохимическое изучение патогенеза алкоголизма в лабораториях ОРОВ АН БССР (впоследствии Институт биохимии) было начато на крысах с различной алкогольной мотивацией. Предпосылкой этому явилась информация об обнаружении линий животных, склонных предпочитать растворы этанола воде в условиях свободного выбора. Естественно, что у таких животных нет никаких «социальных» мотиваций потреблять этанол. Данные об особенностях обмена веществ у таких животных позволили бы прояснить вопрос о существовании биологических (врожденных и приобретен-

ных) факторов склонных к потреблению алкоголя. Первая журнальная статья по характеристике метаболизма у крыс с различной алкогольной мотивацией была опубликована в журнале «Весті АН БССР. Сер. біял. навук» в 1976 г. (Ю.М. Островский и соавторы). В разных лабораториях ОРОВ активно начали изучаться особенности обмена отдельных классов органических соединений при феномене алкогольной мотивации. Большой объем новых научных результатов по данной проблеме, их перспективность и важное прикладное значение позволили в 1980 г. провести на базе ОРОВ Всесоюзный симпозиум «Биохимия алкоголизма» с участием всех ведущих ученых СССР. Ключевым моментом данного научного форума явилась представленная Ю.М. Островским «Метаболическая концепция генеза алкоголизма». В обобщенном плане суть ее заключается в следующем. Сам этанол, его производные и другие двухуглеводные соединения вступают в организме в сложные (синергизм, конкуренция, образование необходимых метаболитов и т. п.) взаимоотношения и взаимодействия, формируя в конечном итоге состояние метаболического фона, к которому организм стремится (комфорт) или которого избегает (дискомфорт). Биохимический, молекулярный характер алкогольной мотивации в качестве производных частных включает в себя подходы ко всей проблеме различных исследователей, из которых каждый придает решающее значение какому-либо одному фактору или их многообразным комбинациям. Проверка правильности выдвинутой концепции была активно продолжена целым рядом исследователей поисками метаболических различий у предпочитающих этанол (ПЭ) или воду (ПВ) животных. Важным, постоянно обнаруживающим отличием ПЭ животных являлся более низкий уровень эндогенного этанола в их тканях, более активное потребление ацетата в биосинтезе липидов, отклонения уровней отдельных свободных аминокислот; активность ферментов метаболизма глюкозы от таковых у ПВ животных. Поскольку между уровнем эндогенного этанола в крови и характером предпочтения также была выявлена выраженная связь (М.Н. Садовник, В.И. Сатановская, 1979), часть последующих наблюдений касались проверки возможности коррекции ранее обнаруженных метаболических различий с помощью умеренной (нормальной) для ПЭ и принудительной для ПВ животных алкоголизации. В результате приема этанола ранее наблюдаемые между группами различия в обмене глюкозы, липидов, уровней отдельных аминокислот исчезали, подтверждая активное участие этанола в формировании определенного метаболического фона. Логическим итогом этих исследований явились 4 защищенные кандидатские диссертации: В.И. Сатановская «Состояние альдегиддегидрогеназ печени и мозга крыс при предпочтении этанола и алкогольной интоксикации» (Минск, 1981); С.Ю. Островский «Особенности обмена аминокислот у животных с различной алкогольной мотивацией» (Минск, 1982); М.И. Селевич «Особенности метаболизма липидов у крыс, предпочтительно потребляющих воду или этанол» (Ленинград, 1983); В.В. Лелевич «Особенности начальных реакций гликолиза в печени крыс с различной алкогольной мотивацией» (Минск, 1984). Полученные в этих исследованиях результаты были обобщены в ряде монографий: Ю.М. Островский и др. «Этанол и обмен веществ» (1982 г.); Ю.М. Островский и др. «Биологический компонент в генезе алкоголизма» (1986 г.); Ю.М. Островский и др. «Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя» (1988 г.). Весь представленный в них материал свидетельствует о существовании значительных различий в обмене веществ у крыс с различной алкогольной мотивацией. Неоднородность сравниваемых групп животных захватывает широкий круг биохимических показателей, при этом ПЭ особи отличается от 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 играет характер субстратов, используемых для энергетических целей, что нашло отражение в особом замедленном типе функционирования начальных этапов гликолиза, накоплении заменимых аминокислот в печени, относительной недостаточности инсулина. Этанол у ПЭ животных легче ассимилируется, яв-

ляется лучшим энергоресурсом или предшественником каких-то эндогенных регуляторов, чем собственно и определяется характер их питьевого поведения.

В дальнейшем, продолжая изучать биохимические аспекты феномена алкогольной мотивации, в экспериментальную практику были внедрены другие модели алкоголизации — острая и хроническая алкогольная интоксикация, алкогольный абстинентный синдром. Начали изучаться метаболические эффекты противоалкогольных препаратов, наиболее часто используемых в клинической практике, предприняты первые попытки метаболической коррекции алкогольной интоксикации как в эксперименте, так и у больных алкоголизмом. Это отразилось в защите второй волны кандидатских диссертаций по данному направлению: В.О. Кедров-Зихман «НАДН-окисляющие комплексы и особенности липидного обмена митохондрий печени крыс, предпочитающих этанол или воду» (1989 г.); А.В. Козловский «Характеристика фонда свободных аминокислот сыворотки крови в динамике алкогольного абстинентного синдрома» (1993 г.); А.Г. Виницкая «Алкогольная интоксикация и ферменты метаболизма ГАМК в мозге при действии некоторых нейроактивных соединений» (1994 г.); Е.М. Дорошенко «Формирование фонда биогенных аминов и нейроактивных аминокислот в головном мозге крыс при алкогольной интоксикации и отмене этанола» (1994 г.); Л.Р. Бардина «Система обмена этанола в механизмах формирования толерантности к этанолу» (1994 г.); М.Ф. Кашко «Переокисление липидов и биосинтез тестостерона в семенниках крыс при острой и хронической алкогольной интоксикации» (1994 г.); И.Л. Быков «Метаболические эффекты этаноламина при алкогольной интоксикации и отмене этанола у крыс» (1995 г.).

Важным качественным этапом в развитии научного направления по изучению алкоголизма в Гродно стали первые докторские диссертации, защищенные сотрудниками института. Ими являлись: В.У. Буко «Взаимоотношения этанола и ацетальдегида с простагландиновой системой в печени» (1990 г.); С.М. Зиматкин «Альдегиддегидрогеназная система мозга: связь с устойчивостью и влечением к алкоголю» (1990 г.).

В тесном сотрудничестве с Институтом биохимии изучение некоторых аспектов алкогольной мотивации и алкогольной интоксикации начиная с 1979 г. проводилось и на кафедре биохимии ГГМИ. В 1992 г. В.В. Лелевичем была защищена докторская диссертация «Роль нарушений углеводно-энергетического обмена головного мозга в патогенезе экспериментального алкоголизма» [ 1 ].

Официальным признанием значимости и перспективности проводимых в Институте биохимии исследований в области алкоголизма явилось создание здесь в 1989 г. филиала Всесоюзного научного центра наркологии Министерства здравоохранения СССР. В состав филиала входило три лаборатории с общей численностью сотрудников более тридцати человек. Основными направлениями научной деятельности филиала было изучение биологических основ предрасположенности и механизмов формирования болезненного влечения к алкоголю и наркотикам, разработка новых методов и средств диагностики, лечения и комплексной профилактики алкоголизма и наркомании. После распада Советского Союза в марте 1992 г. этот филиал был ликвидирован и часть его сотрудников перешла во вновь открытую лабораторию медико-биологических проблем наркологии ГГМИ. Ими активно разрабатывались научные направления, начатые еще в Институте биохимии, что нашло отражение в защите еще двух докторских диссертаций: М.И. Селевич «Нарушение липидного обмена в печени и головном мозге при алкогольной интоксикации и его коррекция» (1997 г.); В.М. Шейбак «Особенности формирования аминокислотного дисбаланса, нарушения метаболизма кофермента А и их коррекция при экспериментальном алкоголизме» (1998 г.).

Несмотря на структурные и кадровые изменения, произошедшие в Институте во второй половине 90-х годов, «алкогольное» направление исследований продолжало плодотворно развиваться. Подтверждением этому явилась защита еще трех докторских диссертаций: А.М. Хоха «Биохими-

ческие механизмы нарушения гормонпродуцирующей функции семенников при алкогольной интоксикации» (1998 г.); М.П. Каннуникова «Роль ГАМК в механизмах действия этанола в мозге» (1999 г.); П.С. Пронько «Роль ацетальдегида в механизмах метаболической адаптации организма к алкогольной интоксикации» (2005 г.) и нескольких кандидатских диссертаций: Д.Ю. Геращенко «Особенности обмена эндогенного ацетальдегида в организме животных при различных метаболических состояниях» (1999 г.); С.С. Чумаченко «Адренкортикальная система на начальных этапах развития толерантности к наркотическому действию этанола у крыс» (2001 г.); М.В. Пивоварчик «Опиоидные рецепторы среднего мозга и дофаминовая система стриатума в механизмах адаптации крыс к этанолу» (2001 г.); А.Б. Кузмич «Метаболические эффекты ацетальдегида и его распределение в тканях животного при алкогольной интоксикации» (2005 г.).

Важным этапом в признании ведущей роли Института биохимии по экспериментальному изучению алкоголизма в Республике Беларусь явилось проведение здесь в 2004 г. Международного симпозиума «Современные аспекты изучения алкогольной и наркотической зависимости». В работе симпозиума приняли участие ученые из Российской Федерации, Кыргызстана, медицинских вузов и наркологических учреждений Республики Беларусь. Сотрудниками Института биохимии были представлены новые результаты, имеющие фундаментальное и прикладное значение. В частности показано значение отдельных нейромедиаторных систем головного мозга в патогенетических механизмах формирования алкогольной зависимости. На основе интегрального анализа комплекса патохимических изменений при алкогольной интоксикации предложены различные подходы целенаправленной коррекции выявленных метаболических нарушений с использованием природных биологически активных соединений (аминокислоты и их производные, витамины, ненасыщенные жирные кислоты). На симпозиуме обсуждены новые подходы в моделировании алкогольной интоксикации и их использование в экспериментальной практике. В частности была представлена новая форма алкоголизации — прерывистая алкогольная интоксикация, обсуждены ее перспективы при изучении алкоголизма. Очевидно, что моделирование ситуации прерывистой алкоголизации является довольно близким отображением реальных условий прерывистого употребления алкоголя, встречающегося в человеческой популяции, и может быть использовано в изучении данной разновидности алкогольной болезни.

Важный вклад в изучение метаболических аспектов алкогольной интоксикации внесли исследования, проводимые под руководством профессора В.У. Буко, который в 1990–2006 гг. руководил лабораторией экспериментальной гепатологии, а в 2006–2020 гг. — отделом биохимической фармакологии. Была изучена роль нарушений обмена простагландинов и незаменимых жирных кислот в патогенезе поражений печени этиловым спиртом и ацетальдегидом. Исследовались гепатопротекторные и антиоксидантные свойства целого ряда соединений, в том числе простогландинов, S-аденозилметионина, урсодезоксихолевой кислоты и др. Сформулирована оригинальная гипотеза алкогольного поражения печени, являющаяся принципиально новым подходом к профилактике и патогенетической терапии этой патологии. Результаты этих исследований представлены в двух монографиях: В.У. Буко «Простагландины при алкогольном поражении печени» (1991 г.); В.У. Буко и соавторы «Метаболические последствия алкогольной интоксикации» (2005 г.).

Многолетние исследования патогенеза алкоголизма проводились доктором биологических наук П.С. Пронько. Им показано, что механизмы чувствительности к действию алкоголя и развитие толерантности к его эффектам связаны не только со скоростью метаболизма этанола, но и ацетальдегида. Фенотип высокой чувствительности ЦНС к депрессивному действию этанола в сочетании с нужной скоростью его метаболизма в организме может предупреждать прием алкоголя. Процессы метаболизма этанола и ацетальдегида в желудочно-кишечном тракте изменяют их системную доступность и играют роль в механизмах локальной органотоксичности. Существенное значение

в адаптации организма к алкогольной интоксикации имеет индукция ферментативных систем, окисляющих этанол и ацетальдегид и сопряженных с ним метаболических процессов, что показывает влияние на метаболизм этанола, чувствительность к его эффектам и токсичность для организма. Основная часть этих результатов была представлена в монографии П.С. Пронько «Роль ацетальдегида в механизмах чувствительности, толерантности и влечения к алкоголю» (2016 г.).

В настоящее время в Институте биохимии биологически активных соединений продолжаются исследования в области медико-биологических проблем алкоголизма. К перспективным направлениям деятельности института в этой сфере можно отнести: 1. Поиск лекарственных средств, подавляющих алкогольную мотивацию, изучение механизмов их антиалкогольного действия. 2. Изучение новых биологически активных веществ природного происхождения с антиалкогольными свойствами. 3. Разработка высокоспецифических технологий лабораторной диагностики алкогольной зависимости с использованием прямых и непрямых биохимических маркеров [2]. В 2019 г. в институте была проведена Международная научно-практическая конференция «Алкогольные медико-биологические проблемы алкогольной и других химических зависимостей» с изданием сборника статей.

**Заключение.** Таким образом, на протяжении последних 45 лет Институт биохимии биологически активных соединений (ОРОВ, Институт биохимии) является ведущим учреждением в Республике Беларусь по изучению медико-биологических проблем алкогольной мотивации, алкогольной интоксикации и зависимости. Достижения по этому направлению получили международное признание. Научными результатами работы, проведенными в институте по данному направлению, являются десятки защищенных докторских и кандидатских диссертаций, многочисленные монографии и журнальные статьи, проведенные международные научные симпозиумы и конференции.

### Список литературы

1. Лелевич, В.В. Развитие научного направления «Экспериментальная наркология» на кафедре биохимии ГрГМУ / В.В. Лелевич // Актуальные проблемы биохимии: материалы науч.-практ. конф. — Гродно: ГрГМУ, 2019. — С. 51–54.

2. Семененя, И.Н. Основные достижения и перспективы развития исследований в области медико-биологических проблем алкогольной зависимости в Институте биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси / И.Н. Семененя // Актуальные медико-биологические проблемы алкогольной и других химических зависимостей: материалы Межд. науч.-практ. конф. — Минск, 2019. — С. 173–180.

## STUDIES OF ALCOHOLISM AT THE INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

---

*Lelevich V.V.*

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

**Summary.** *The article describes the history of the origin and development of the scientific direction in the study of alcoholism at the Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Belarus. The leading role of Academician Yu.M. Ostrovsky in this is emphasized. The doctoral and candidate dissertations of the Institute's fellow workers, as well as the scientific forums on various biochemical aspects of alcoholism held within the walls of the institution are presented.*

## СТАНОВЛЕНИЕ И РАЗВИТИЕ ЭНЗИМОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ИНСТИТУТЕ БИОХИМИИ

---

*Черникевич И. П.*

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

**Резюме.** Излагается направление исследований по энзимологии метаболизма тиаминкиназы (тиаминкиназа, тиаминдифосфаткиназа) в ранний период деятельности Отдела регуляции обмена веществ АН БССР и формирование предпосылок для организации лаборатории энзимологии под руководством А. И. Воскобоева. Указывается на разносторонний характер работ подразделения по биотрансформации тиаминкиназы и тиаминфосфатов, выяснение механизмов транспорта витамина, получение молекулярно-кинетических характеристик пируватдегидрогеназы и транскетолазы. Эти исследования продолжены после 1983 г. и были расширены в биотехнологическом плане. Кроме того, начаты исследования ферментов гидролаз тиаминфосфатов (А. Ф. Макаричиков), которые в последующее десятилетие дополнены концепцией фундаментальной роли тиаминтрифосфата в биологии клетки, связанной с адаптацией в условиях среды. Идентифицирована новая производная тиаминкиназы — аденилированный тиаминтрифосфат и фермент его биосинтеза.

В годы существования Советского Союза все академические биохимические институты имели в своем составе энзимологические лаборатории. Как талантливый организатор с мыслями о будущем, Юрий Михайлович Островский отчетливо понимал надобность такого подразделения в открывшемся Отделе регуляции обмена веществ, а в перспективе и в Институте биохимии как связующего звена при изучении витаминно-гормональных взаимоотношений. В качестве отправной точки исследования им была выбрана тиаминкиназа (КФ 2.7.6.2), ответственная за начальный этап фосфорилирования витамина В<sub>1</sub> до его коферментной формы — тиаминдифосфата (ТДФ). Уже в то время было достаточно очевидно, что несмотря на все более прослеживаемые данные о кардиотропных и нейротропных свойствах тиаминкиназы главный путь реализации его биологической активности обусловлен коферментными функциями дифосфорного эфира, синтезирующегося в тиаминкиназной реакции. Будучи в Германии, Юрий Михайлович привез оттуда методику определения активности фермента и методом ультрацентрифугирования, совместно с И. Ульрихом и Х. Хольцером, определили его молекулярную массу. Продолжить исследования было поручено Александру Ивановичу Воскобоеву, который только что окончил аспирантуру в Институте биохимии им. А.Н. Баха, защитил кандидатскую диссертацию по ферментам азотистого обмена, но из-за отсутствия вакансии в Белорусском государственном университете, который он окончил, обосновался в Гродно. По сути с именем Александра Ивановича связано становление лаборатории энзимологии. Обладая достаточно большим набором методологических приемов работы с белковыми молекулами, позаимствованных за годы обучения в аспирантуре, он активно применял их и в случае работы с ферментами обмена В<sub>1</sub>. Немного позже, в 1972 г., окончился срок моей двухгодичной стажировки в Москве, в пединституте им. В.И. Ленина, по органической химии, где я занимался синтезом, очисткой и характеристикой фосфорорганических соединений, используемых для получения инсектицидов и боевых отравляющих веществ. Поскольку к этому времени был закрыт биолого-химический факультет Гродненского пединститута им. Я.Купалы, который я окончил, мне предоставили свободное трудоустройство. В итоге оказался в Отделе регуляции обмена веществ. Юрий Михайлович подробно расспросив о приемах синтеза, выделения и очистки неорганических со-

единений, их идентификации порекомендовал мне войти в группу А.И. Воскобоева в составе его лаборатории. Это было удачное сочетание, удачный тандем исследователей. В помощь к нам была прикреплена прекрасный, исполнительный и очень ответственный лаборант — Помозова Ада Васильевна. Варьируя различные подходы, приемы, к концу первого года нам удалось получить электрофореграмму с тремя белковыми полосами, где наиболее интенсивная полоса принадлежала тиаминкиназе. Это был успех, надежда, что гомогенный препарат будет получен. Началось интенсивное изучение фермента: молекулярно-кинетических параметров, структуры, механизма реакции, идентификации групп активного центра с параллельным выявлением функционирования тиаминкиназы *in vivo*, что представляло значительный интерес не только с точки зрения энзимологии и физиологии обмена тиамин, но и вносило вклад в развитие молекулярной витаминологии. Пошли публикации, пожелания получить отписки статей. Материалы исследований неоднократно представлялись Юрием Михайловичем за рубежом.

Фермент нами был очищен из пивных дрожжей, наиболее богатого по содержанию ТДФ-источника. Для рассмотрения функционирования тиаминкиназы в филогенетическом аспекте в группу была приглашена Ирина Михайловна Арцукевич, выделившая и охарактеризовавшая белок из печени крыс, показав сходство и различие молекул. В изучении транспорта, депонирования и протеидизации коферментной формы — ТДФ в соответствующие ТДФ-зависимые ферменты, попытке объяснить происходящие процессы в условиях *in vivo*, выделить ТДФ-зависимые системы, принимающие непосредственное участие в связывании дифосфорного эфира тиамин, огромная заслуга принадлежит Эмме Александровне Гриценко, неопережимого труженика, готового сутками находиться в лаборатории во имя решения поставленной задачи. Сказанное касается и тиаминсвязывающего белка (исполнитель — Виктор Афанасьевич Аверин), одного из компонентов транспортной системы витамина В<sub>1</sub>.

Успех с очисткой тиаминкиназы предопределил начало работ по выделению второго белка — тиаминдифосфаткиназы (КФ 2.7.4.15), обеспечивающего биосинтез некоферментной, наиболее лабильной и энергоемкой формы витамина — тиаминтрифосфата (ТТФ). В исследовательский процесс включились Валентин Станиславович Лучко и лаборант Татьяна Александровна Жуева. По сути, завершилось формирование состава лаборатории.

В результате кропотливой, многогранной работы к 1983 г. из пивных дрожжей и печени крыс были выделены гомогенные препараты тиаминкиназ и изучены их кинетические параметры. Показано, что белковые молекулы обладают четвертичной структурой и содержат пространственно разделенные центры связывания субстратов и аллостерических эффекторов. Представлены данные о механизмах реализации биологической активности фосфотрансфераз. Рассчитано количество центров связывания и значения кажущихся констант связывания для каждого из субстратов. С помощью метода количественного определения фосфорилированных аналогов тиамин установлена роль отдельных атомов и группировок молекулы витамина во взаимодействии с ферментом. Впервые в мировой практике выделена гомогенная тиаминдифосфаткиназа, проанализированы свойства белка. Учитывая противоречивость данных по этому ферменту результаты исследований нами публиковались в иностранных англоязычных изданиях, а через несколько лет первенство в очистке ТДФ-киназы было подтверждено и в диссертации финского исследователя — Н. Рентиненна (1983 г.). К этому времени относится и полученное мною приглашение от Швейцарского университета приехать в Берн для изучения структурной организации тиаминкиназ.

Сравнительная оценка молекулярно-кинетических параметров тиаминкиназы, пируватдегидрогеназы и транскетолазы, проведенная нами при изучении действия антикофермента В<sub>1</sub> — окситиамин на целостный организм показала, что только два первых фермента подчиняются закономерностям, установленным на очищенных препаратах в условиях *in vitro*, конкурентно взаимодействуя с витамином, антивитамином и дифосфорными эфирами. Антикоферментное действие окситиаминдифосфата в отношении транскетолазы не проявляется *in vivo* даже при максимальной концентрации ложного кофермента из-за его включения в белок, по мере синтеза

транскетолазы de novo. Таким образом, апоформа этого фермента при В<sub>1</sub> — авитаминозе не накапливается. А.И. Воскобоев и Э.А. Гриценко экспериментально доказали, что свободный кофермент в гиалоплазме способен включаться только в состав транскетолазы, а в митохондриях — исключительно в дегидрогеназы альфа-кетокислот. Анализ меченой транскетолазы позволил установить, что связь между коферментом и белком нековалентная, т.е. транскетолаза из печени не является исключением в ряду ТДФ-зависимых ферментов, а показатели ТДФ-эффекта, как теста на тиаминную недостаточность при обследовании населения в клинике, нельзя признать корректными. В качестве тест-системы на обеспеченность организма тиаминем рекомендовано измерение общего количества ТДФ или концентрации свободной кокарбоксилазы.

В опытах с двойными метками по углероду и фосфору выяснено, что основными продуктами при введении ТДФ в клетках являются тиаминмонофосфат и свободный тиамин. При инъекциях тиаминтрифосфата отщепление одной фосфатной группировки от ТТФ приводит к транспорту остальной части молекулы в виде ТДФ по схеме: ТТФ → ТДФ + Р. Введение этой формы (ТТФ) витамина вызывает быстрое накопление ТДФ в тканях и более длительное его удерживание. Поэтому в клинике целесообразнее применять ТТФ или очищенную смесь тиаминфосфатов, полученную при производственном синтезе ТДФ, а не чистый препарат кокарбоксилазы. Что касается использования в лабораторной практике трифосфорных антиметаболитов тиамин, то они способствуют созданию быстрых и удобных моделей В<sub>1</sub>-авитаминозов.

В.А. Авериным исследовались трансмембранные механизмы транспорта тиамин. Установлено, что этот процесс связан со специфическим белком-переносчиком, выделенным им из мембран митохондрий и эритроцитов. Определены его физико-химические свойства. Очистка белка осуществлена по разработанному автором только зарождающемуся методу аффинной хроматографии.

Теоретические исследования способствовали развитию такого нового направления как молекулярная витаминология. Но время требовало выхода в практику, и лаборатория энзимологии была переименована в лабораторию энзимологии и биотехнологии. В ее состав «влилась» группа Вадима Витальевича Котелева, занимавшаяся утилизацией отходов молочной промышленности.

В 1983 г. лабораторию оставляет А.И. Воскобоев. Утвержденный заведующим молодой защитившийся специалист Славомир Александрович Струмило, не будучи энзимологом, не смог увлечь, повести за собой коллектив и уехал работать в Польшу, в Белостокский университет. Лаборатория осталась без руководителя. Часть сотрудников ушла, но основной, творческий костяк, знающий свою работу, за планировавший ранее темы диссертаций продолжал исследования. Наконец, через полтора года после ухода А.И. Воскобоева я был переведен на должность заведующего. Было решено не оставлять теоретических изысканий, но, одновременно, думать о их практической направленности, как это требовалось исходя из названия лаборатории. Были интенсифицированы работы по переработке молочной сыворотки, что привело к созданию белково-минерального концентрата (БМК), — биологически полноценной кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птиц. Получены эффективные бактериальные закваски для косметологических кабинетов. По сути биотехнологическая основа была заложена в исследования вернувшейся в лабораторию И.М. Арцукевич в работе с алкогольоксидазой, предполагавшей создание биосенсоров на алкоголь. Разработано несколько тест-систем количественного определения ТДФ в крови человека, выделены стабилизированные формы тиаминкиназы и алкогольоксидазы. Начаты работы по выделению и очистке рибофлавина и флавинаденидинуклеотида из мицелия штамма-продуцента, представленного А.Г. Мойсеёнком. Заявлен и получен грант на 70 000 долларов для создания сенсоров на лактат и пируват совместно с Минским заводом радиодеталей.

Одновременно продолжались теоретические исследования тиаминкиназы и тиаминдифосфаткиназы. Показано, что в клетках дрожжей и мозга ферменты синтеза представлены ассоциирующе-диссоциирующими системами олигомеров, положение равновесия между которыми определяется микроокружением, концентрациями тиамин, субстратов дегидрогеназ альфа-кетокислот, дикарбоновых кислот цикла Кребса. Индуцируемые лигандами изменения носят

временный характер и являются регуляторным фактором скорости образования фосфатов витамина. Активный центр тиаминкиназы — гидрофобная полость, в которой тиамин и АТФ сорбируются пиримидиновым и адениновым циклами, а дифосфатный радикал субстрата-донора направлен в сторону субстрата-акцептора. Пируват имеет два центра связывания: ингибирующий (относительно гидрофобный) и активирующий (гидрофильный), расположенный вблизи места локализации тиаминкиназы и облегчающий отщепление продукта — ТДФ. Ионы двухвалентных металлов определяют оптимальную геометрию сорбции субстратов, активаторов и ингибиторов. Расшифрована модель организации активного центра тиаминкиназы.

В серии опытов с Э.А. Гриценко по исследованию функционирования ферментных систем биотрансформации витамина В<sub>1</sub> в норме, экстремальных ситуациях и патологии обнаружено, что в начальные сроки стрессорного состояния при голодании, выделяющаяся при окислении глюкозы энергия АТФ отчасти перенаправлена на синтез более лабильной энергопродукции клетки — тиаминтрифосфата. Механизм адаптационной активации энергетического обмена при помощи витамина опосредован и, очевидно, реализуется посредством усиления гормонообразовательной функции инсулоцитов. Защитное коферментное действие через ТДФ-зависимые ферменты в условиях стресса проявляется в поздние сроки эксперимента.

В теоретическом отношении очень удачным был переход в лабораторию молодого, многообещающего сотрудника — Александра Федоровича Макарчикова, которому было предложено изучение ферментных систем обратного анаболизма процесса — гидролиза фосфорных эфиров тиаминкиназы и, в первую очередь, тиаминтрифосфатазы мозга. В запланированные три года фермент впервые в практике был выделен в гомогенном состоянии, доказана его абсолютная специфичность к субстрату, цитозольная локализация. Обнаружено существование двух изомерных, кинетически различимых форм фосфатазы, равновесие между которыми определяется концентрацией ТДФ. Вероятные механизмы регуляции глобулы включают ингибирование АТФ, контроль за соотношением изоформ под влиянием концентрации субстрата и активацию свободными ионами магния. В образовании активного комплекса субстрат-фермент важная роль принадлежит гидрофобным силам, аминогруппе пиримидинового кольца, четвертичному азоту тиазола и фосфорнокислому радикалу молекулы ТДФ.

В 1999 г., не найдя поддержки и понимания нового директора Института биохимии Нефёдова Леонида Ивановича, я оставил лабораторию. Вероятно, мое решение было оправданным и своевременным. Это позволило быстро раскрыться творческому и организационному таланту Александра Федоровича. Пройдя хорошую научную школу в Бельгии и получив весомую методологическую подпитку он, привлекая сотрудников, развернул работу по всему фронту реакций гидролитического расщепления фосфатов В<sub>1</sub>. В течение 10 лет были получены ответы на вопросы, над которыми я с А.И. Воскобоевым долго «ломали» головы. Установлено, что ТДФ является компонентом клеток организмов различных уровней сложности — от бактерий до млекопитающих, концентрация которого возрастает в ответ на действие стрессорных факторов. Сформулирована и обоснована концепция фундаментальной роли ТДФ в биологии клетки, связанной с адаптацией к условиям среды. Выяснены первичная и вторичная структуры специфичной растворимой тиаминтрифосфатазы, значение отдельных аминокислотных остатков для активности фермента. Показано, что ТДФ-аза — эволюционно молодой фермент, который присутствует только в клетках млекопитающих, тогда как у организмов других классов гидролиз ТДФ осуществляется неспецифическими фосфатазами. В биологических объектах обнаружено и идентифицировано новое производное тиаминкиназы — аденилированный тиаминтрифосфат — и фермент его биосинтеза.

В настоящее время ведутся работы по изучению тиаминди- и монофосфатаз. Отрадно, что в энзимологии витамина В<sub>1</sub>, благодаря, в том числе, и нашим усилиям, остается все меньше белых пятен.

За время существования сотрудниками лаборатории опубликовано более 500 научных статей, защищено 9 кандидатских и 3 докторских диссертации.

# FORMATION AND DEVELOPMENT OF ENZYMOLOGICAL RESEARCH AT THE INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

---

*Chernikevich I.P.*

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

**Summary.** *The direction of research of the enzymology of thiamine metabolism (thiaminkinase, thiaminediphosphatekinase) in the early period of activity of the Department of Metabolic Regulation of the Academy of Sciences of BSSR and the formation of prerequisites for organizing of enzymology laboratory under the leadership of A.I. Voskoboeva. The multifaceted nature of the work of the department of biotransformation of thiamine and thiaminephosphates, the elucidation of the mechanisms of vitamin transport, and the obtaining of the molecular-kinetic characteristics of pyruvate dehydrogenase and transketolase are pointed out. These studies continued after 1983 and were expanded in biotechnological terms. In addition, studies of thiamine phosphate hydrolase enzymes (A.F. Makarchikov) began, which in the next decade were supplemented by the concept of the fundamental role of thiamine triphosphate in cell biology associated with adaptation to environmental conditions. A new thiamine derivative, adenylated thiaminetriphosphate, and an enzyme of its biosynthesis, have been identified.*

***Раздел II***  
***НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ***

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

Адамцевич Н.Ю.<sup>1</sup>, Шацких Ю.В.<sup>1</sup>, Болтовский В.С.<sup>1</sup>, Титок В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** Проведена сравнительная оценка антимикробной активности экстрактов соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного по отношению к грамположительным (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательным (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) патогенным бактериям. Экстракт соцветий бессмертника песчаного обладает антимикробным действием только по отношению к грамположительным бактериям. К экстракту листьев воробейника лекарственного все виды исследуемых микроорганизмов не чувствительны.

**Введение.** В современной терапии в качестве антимикробных средств особую роль занимают препараты растительного происхождения. Содержащиеся в растительном сырье биологически активные вещества (БАВ) сходны по структуре и действию с естественными компонентами организма человека, что обуславливает значительное снижение количества побочных эффектов от применения данных препаратов [1].

В последние годы среди перспективных соединений растительного происхождения выделяют класс флавоноидов. На изучение антимикробного, антиоксидантного, ранозаживляющего и других терапевтических эффектов флавоноидов направлено множество исследований [2–4]. Представители данного класса соединений обладают различной антибактериальной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных патогенов.

Одним из перспективных источников флавоноидов являются соцветия бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) — многолетнего травянистого растения, вид рода Цмин (*Helichrysum*) семейства Астровые (*Asteraceae*).

В цветках бессмертника песчаного встречаются флавоноиды: нарингенин, салипурпозид, прунин, апигенин, лютеолин, кемпферол, кверцетин и их гликозиды, халкон изосалипурпозид, а также полисахариды, кумарины, гидроксикоричные кислоты (кофейная, феруловая, хлорогеновая), производные фталевого ангидрида, дубильные вещества [5, 6].

Известным в народной медицине в качестве бактерицидного и ранозаживляющего средства является воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.) — вид двудольных растений рода Воробейник (*Lithospermum*) семейства Бурачниковые (*Boraginaceae*).

В листьях воробейника лекарственного встречаются гидроксикоричные кислоты (розмариновая, кофейная, феруловая), флавоноиды, которые представлены гликозидами кверцитина (рутин и изокверцитрин), хлорофилл и дубильные вещества [7–9].

Цель работы — изучение антимикробной активности экстрактов соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного.

**Материалы и методы исследования.** Объектами исследования являлись экстракты соцветий бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) и листьев воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.).

Экстрагирование сухого измельченного растительного сырья проводили 50%-м этиловым спиртом при температуре  $65 \pm 5^\circ\text{C}$  в течение 40 мин. Соотношение массы сырья к объему экстрагента для соцветий бессмертника песчаного составляло 1 : 50, для листьев воробейника лекарственного — 1 : 20.

Антимикробную активность экстрактов определяли с использованием грамположительных (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) патогенных бактерий из коллекции кафедры биотехнологии Белорусского государственного технологического университета.

Для определения антимикробной активности суточные культуры тест-штаммов микроорганизмов равномерно распределяли по поверхности агаризованной питательной среды в чашках Петри. В асептических условиях в засеянной чашке вырезали 4 лунки диаметром 8 мм. В лунки № 1 и № 2 вносили по 80 мкл экстракта листьев воробейника лекарственного и цветков бессмертника песчаного, в лунку № 3 — по 40 мкл каждого экстракта, в лунку № 4 — 80 мкл контроля (50%-ный этиловый спирт). Чашки помещали в холодильник на 2–3 ч при температуре 6–9°C для диффузии экстрактов в слой агара, после чего инкубировали в течение 24 ч в термостате при температуре 30°C.

Степень проявления антимикробной активности экстрактов оценивали по наличию зон подавления (бактерицидное действие) и зон ослабления роста микроорганизмов (бактериостатическое действие), выраженных в миллиметрах. Эксперимент выполняли в трехкратной повторности. Для статистической обработки полученных результатов использовали программу Microsoft Office Excel 2007. Результаты представлены как среднее значение выборки  $\pm$  полуширина доверительного интервала при  $P = 95\%$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** В таблице представлены результаты изучения антимикробной активности экстрактов соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного.

Оценку антибактериальных свойств осуществляли по величине зоны отсутствия роста микроорганизмов. Диаметр зоны менее 10 мм указывает на то, что микроорганизмы не чувствительны к внесенному в лунку образцу; диаметр 10–15 мм указывает на низкую антимикробную активность; диаметр 15–25 мм — на среднюю антимикробную активность; диаметр более 25 мм свидетельствует о высокой чувствительности микроорганизмов к исследуемому образцу.

**Таблица — Оценка антимикробной активности экстрактов соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного**

Тест-штамм	Зона угнетения и зона ослабления роста микроорганизмов, мм					
	Экстракт соцветий бессмертника песчаного		Экстракт листьев воробейника лекарственного		Экстракт соцветий бессмертника песчаного : экстракт листьев воробейника лекарственного (1 : 1)	
	Зона угнетения	Зона ослабления роста	Зона угнетения	Зона ослабления роста	Зона угнетения	Зона ослабления роста
<i>Staphylococcus aureus</i>	15 $\pm$ 2	21 $\pm$ 1	<10	<10	12 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2
<i>Bacillus subtilis</i>	16 $\pm$ 1	23 $\pm$ 3	<10	<10	12 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Полученные результаты исследования показали, что экстракт цветков бессмертника песчаного обладает антимикробной активностью только по отношению к грамположительным бактериям. Зона отсутствия роста *S. aureus* составляла  $15 \pm 2$  мм, *B. subtilis* —  $16 \pm 1$  мм. Вокруг зоны угнетения наблюдалась зона задержки роста *S. aureus* и *B. subtilis*, диаметр которой достигал  $21 \pm 1$  мм и  $23 \pm 3$  мм соответственно.

Вокруг лунок с экстрактом листьев воробейника зона отсутствия роста бактерий составляла менее 10 мм, следовательно, *S. aureus* и *B. subtilis* не чувствительны к данному экстракту.

При введении в лунку двух экстрактов, зона отсутствия роста *S. aureus* и *B. subtilis* составляла  $12 \pm 1$  мм и  $12 \pm 2$  мм соответственно, зона задержки роста бактерий —  $18 \pm 2$  мм и  $17 \pm 2$  мм соответственно.

По отношению к грамотрицательным бактериям (*E. coli*, *P. aeruginosa*) экстракты соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного не проявляли антимикробного действия.

Таким образом, экстракт соцветий бессмертника песчаного обладает средней антимикробной активностью только по отношению к грамположительным бактериям.

**Заключение.** Проведена сравнительная оценка антимикробного действия экстрактов соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного к грамположительным (*B. subtilis*, *S. aureus*) и грамотрицательным (*E. coli*, *P. aeruginosa*) патогенным бактериям. Результаты исследования показали, что экстракт соцветий бессмертника песчаного обладает антимикробным эффектом только по отношению к аэробным грамположительным спорообразующим палочкам *B. subtilis* и факультативно-анаэробным грамположительным коккам *S. aureus*. Экстракт листьев воробейника лекарственного не обладает противомикробными свойствами по отношению ко всем исследуемым микроорганизмам.

### Список литературы

1. Пластун, В.О. Изучение антимикробной активности экстрактов очитков (*Sedum maximum* (L.) Hoffm., *S. telephium* L.) / В.О. Пластун, С.В. Райкова, Н.А. Дурнова, Г. М. Шуб, Е.Э. Комарова // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2013. — Т. 9. — № 4. — С. 640–643.
2. Солёнова, Е.А. Флавоноиды. Перспективы применения в антимикробной терапии / Е. А. Солёнова, Л.Н. Величковска // Медицинский вестник Евразии. — 2017. — № 3. — 50–57.
3. Зверев, Я.Ф. Флавоноиды глазами фармаколога. Особенности и проблемы фармакокинетики / Я.Ф. Зверев // Обзоры по клинической и лекарственной терапии. — 2017. — № 15/2. — С. 4–11.
4. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский [и др.]. — Пушино: Synchronobook, 2013. — 310 с.
5. Sandy Everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench): Botanical, Chemical and Biological Properties / D. Pljevljakusi [et al.] // Frontiers in Plant Science. — 2018. — Vol. 9. — P. 1123–1135.
6. Полифенольные соединения новой биологически активной композиции из цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.) / В.С. Гринёв [и др.] // Химия растительного сырья. — 2015. — № 2. — С. 177–185.
7. Содержание кофейной, розмариновой и хлорогеновой кислот в листьях некоторых видов семейства бурачниковые (*Boraginaceae*) / Н.В. Петрова [и др.] // Химия растительного сырья. — 2015. — № 1. — С. 211–215.
8. Условия экстракции и идентификации флавоноидов, стимулирующих регенерацию тканей / Е.В. Феськова [и др.] // Труды БГТУ. Сер. 2. Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. — 2019. № 1. — С. 49–53.

9. Baczyńska, B. Application of *Lithospermum officinale* L. in early Bronze Age medicine / B. Baczyńska, M. Lityńska-Zajac // Vegetation History and Archaeobotany. — 2005. — No.14. — P. 77–80.

## COMPARATIVE ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS

---

*Adamtsevich N.Yu.<sup>1</sup>, Shatskikh Yu.V.<sup>1</sup>, Boltovskiy V.S.<sup>1</sup>, Titok V.V.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>State Scientific Institution «Central Botanical Garden NAS of Belarus»,  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *A comparative assessment of the antimicrobial activity of the extracts of the inflorescences of the everlasting and the leaves of the littlewale in relation to gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) pathogenic bacteria was carried out. The extract of the inflorescences of the everlasting has an antimicrobial effect against gram-positive bacteria. All types of the studied microorganisms are not sensitive to the extract of the leaves of the littlewale.*

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ТЕРАПИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

*Акулич Н.В.<sup>1</sup>, Сяхович В.Э.<sup>1</sup>, Сорока А.В.<sup>2</sup>, Зинчук В.В.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Национальная антидопинговая лаборатория, а/г Лесной, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный экономический университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

**Резюме.** Выбор лучшего метода мониторинга состояния крови у пациентов с сахарным диабетом во время терапии является дискуссионным. Нами предлагается новый способ оценки уровня гликогемоглобина эритроцитов при помощи проточной цитометрии. Содержание гликогемоглобина в эритроцитах может использоваться как чувствительный и специфический индикатор злоупотребления глюкозой в клинических ситуациях.

**Введение.** Гемоглобин A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) — один из специфических подтипов гликированного гемоглобина. У здорового человека доля HbA<sub>1c</sub> составляет от 3 до 6% от общего гемоглобина, повышаясь до 20% и более при сахарном диабете [3, 7–8]. Во всем мире диагностировано более 220 миллионов человек с диабетом, хотя фактическое число людей с диабетом, вероятно, будет выше, поскольку оно не учитывает довольно большое количество людей с нарушенной толерантностью к глюкозе [6]. Определение концентрации HbA<sub>1c</sub> в сочетании с оценкой глюкозы крови является золотым стандартом при диагностике сахарного диабета и мониторинга его течения [9].

Стандартные методы анализа HbA<sub>1c</sub> в большинстве лабораторий — высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и иммунотурбидиметрия [4]. Их существенным недостатком, на наш взгляд, является то, что оценка HbA<sub>1c</sub> осуществляется в пробе гемолизата, полученного из эритроцитов периферической крови, без учета их зрелости [4, 7]. Поскольку срок жизни красных кровяных телец составляет около 120 дней, то уровень HbA<sub>1c</sub> можно использовать только в качестве показателя средней концентрации глюкозы в крови за предыдущие 2–3 месяца. Важнейшую информацию о содержании HbA<sub>1c</sub> в клетках, имеющих различную продолжительность нахождения в кровотоке, существующие на сегодня методы не предоставляют, что снижает ценность диагностики и не дает своевременной информации о реакции пациента на лечение. Следовательно, необходима методика, позволяющая оценить содержание гликогемоглобина в эритроцитах, учитывающая продолжительность времени циркуляции эритроцитов. На наш взгляд наиболее предпочтительной является технология проточной цитометрии, которая позволит оценить уровень HbA<sub>1c</sub> в каждой анализируемой клетке.

Таким образом, целью исследования является разработка метода оценки содержания гликогемоглобина в эритроцитах методом проточной цитометрии.

**Материалы и методы исследования.** Для разработки методики определения гликогемоглобина при хранении крови эритроцитов требуется подбор красителя, способного выявлять

HbA<sub>1c</sub>, а, учитывая наличие цитоплазматической мембраны, преаналитических методов, увеличивающих ее проницаемость.

В нашем исследовании для фиксации и пермеабилзации использовались растворы на основе 6,67М параформальдегида (Molecular Probes, USA) и 0,001М додецилсульфата натрия (Molecular Probes, USA). Гликогемоглобин оценивался при помощи мышинных первичных антител к HbA<sub>1c</sub> (Biorbyt, United Kingdom), которые затем связывались с козьими антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA). Все использованные в эксперименте антитела служили в качестве внутреннего контроля для настройки цитометра.

В исследовании эритроциты хранили с использованием консервирующего раствора SAGM в течение 28 дней. Для моделирования сахарного диабета не было необходимости дополнительно вносить глюкозу, поскольку в надосадочной жидкости контейнеров с SAGM концентрация глюкозы выше, чем у пациентов с диабетом [5]. Следует отметить, что нарушение толерантности к глюкозе не является противопоказанием для доноров крови. Тем не менее, в одной из серий исследования, для возможности оценки краткосрочных колебаний концентрации глюкозы дополнительно менялся ее уровень в консервирующем растворе (от 100 до 260 мг/дл). Контролем служила кровь практически здорового добровольца, в анамнезе которого не был зафиксирован сахарный диабет и нарушение толерантности к глюкозе.

Забор крови производили у добровольцев, антикоагулянт — ЭДТА К<sub>2</sub>. Пробы крови окрашивали моноклональными антителами к гликофору А (CD 235 а, конъюгированные с APC (Invitrogen, USA), фиксировали, проводили пермеабилзацию эритроцитарной мембраны глютаровым альдегидом, затем вносили первичные моноклональные антитела к HbA<sub>1c</sub>, к которым добавляли вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом.

Определяли параметры прямого и бокового светорассеяния, интенсивность флуоресценции CD 235 а и HbA<sub>1c</sub> на приборе FACS ARIA, (BD Bioscience, USA). Для пробоподготовки использовали фосфатный буфер, эритроциты на гистограммах гейтировали по CD 235а. Для статистического анализа использовались непараметрические методы. Изменения считались значимыми при  $p < 0.05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** При использовании функций логического ограничения, в пределах области регистрации клеток проточного цитометра [рис. 1а] контрольная и основная популяции не различались по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, что указывает на то, преаналитический этап подготовки не оказывает существенного влияния на морфологические параметры эритроцитов.

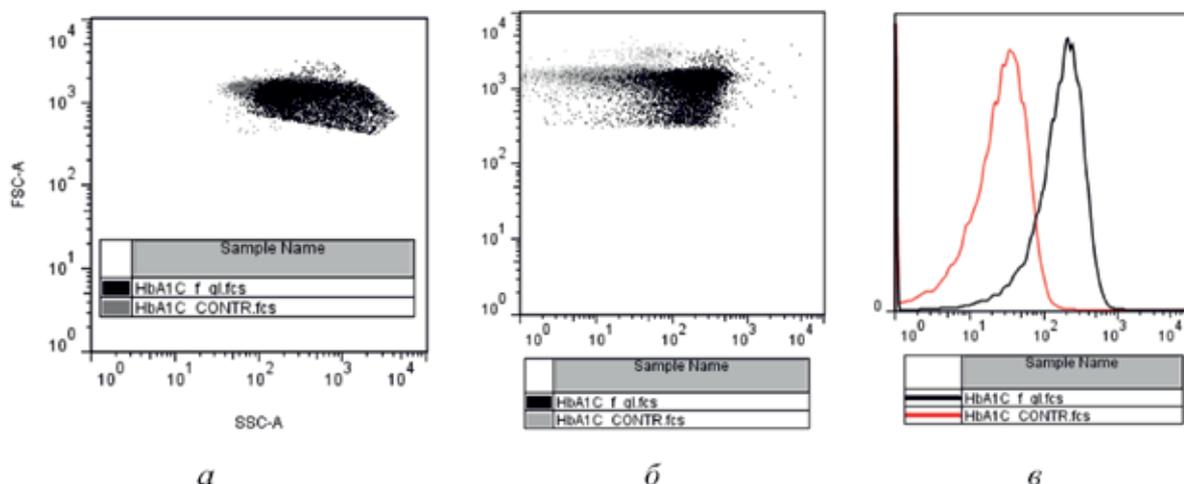
Далее, проводили анализ клеток, различающихся по уровню содержания глюкозы на этапе хранения крови [рис. 2]. Известно, что эритроцит человека свободно проницаем для глюкозы. В каждом эритроците гликированный гемоглобин образуется со скоростью, которая прямо пропорциональна окружающей концентрации глюкозы [5].

Значение флуоресценции HbA<sub>1c</sub>, измеренное при хранении крови (срок хранения в пробах не различался) с использованием раствора для консервирования эритроцитов и добавлением глюкозы до уровня, превышающего значения, соответствующие уровню пациентов с сахарным диабетом показало прямо пропорциональную зависимость между уровнем глюкозы крови и интенсивностью флуоресценции HbA<sub>1c</sub>. Следовательно, предлагаемая нами методика обладает способностью не только выявлять факт наличия глюкозы в среде, но и оценивать ее уровень.

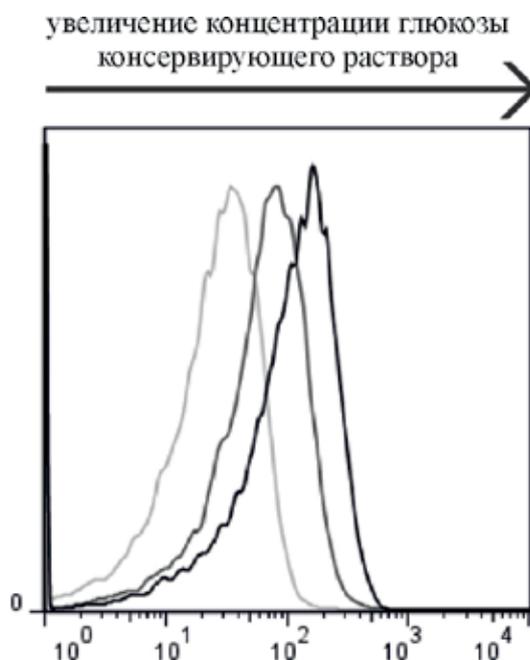
На заключительном этапе исследования была исследована возможность использования метода проточной цитометрии для оценки эритроцитов, которые находились в условиях пост-

янной, или меняющейся концентрации глюкозы [рис. 3]. Необходимость моделирования разного содержания глюкозы в растворе для консервирования эритроцитов связана с приближением этой модели к физиологическим колебаниям уровня глюкозы крови.

Нами были выбраны три концентрации, одна из которых — 100 мг/дл — соответствовала нормальному уровню глюкозы крови при ее проверке натощак. 260 мг/дл — высокий уровень, превышающий концентрацию у пациентов с сахарным диабетом и соответствующий содержанию глюкозы консервирующих растворов.



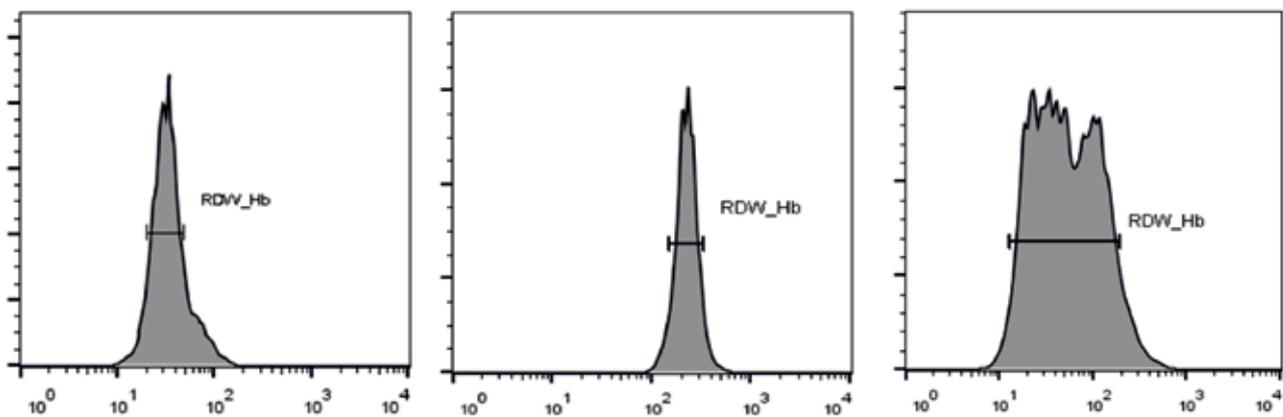
**Рисунок 1 — Подбор условий окрашивания эритроцитов антителами к HbA1c, а — распределение клеток контрольной и основной группы по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; б — распределение клеток по содержанию гемоглобина в эритроцитах (ось Y) и содержанию HbA1c в красных кровяных тельцах; в — интенсивность флуоресценции HbA1c в контрольной и основной группах. (HbA1C Contr — контроль, HbA1C F\_gl — опытная группа)**



**Рисунок 2 — Интенсивность флуоресценции HbA1c в основной группе при повышении содержания глюкозы крови, направление стрелки показывает графики с возрастающей концентрацией глюкозы (110/140/170 мг/дл)**

В третьей группе наблюдения нами создавались условия, характеризующиеся высоким (260 мг/дл) уровнем глюкозы на начальном этапе эксперимента, а затем (на 3-4 неделях) он был снижен до 120 мг/дл.

В качестве метода оценки содержания гемоглобина в эритроците, напрямую влияющего на количество гликированного гемоглобина, использовали величину прямого светорассеяния, которая тесно коррелирует со средним содержанием гемоглобина в эритроцитах (МСН), отражая степень насыщения эритроцита гемоглобином. МСН является вариабельным параметром, зависящим от размера эритроцита. Конструктивной особенностью проточного цитометра является измерение любого параметра, в том числе, содержание гемоглобина в каждой клетке, что позволяет предоставить важную диагностическую информацию.



Распределение эритроцитов по интенсивности и флуоресценции HbA<sub>1c</sub> при хранении крови с содержанием глюкозы:

1) 100 мг/дл 1–28 день

2) 260 мг/дл 1–28 день

3) 260 мг/дл 1–14 день  
и 120 мг/дл 15–28 день

**Рисунок 3 — Интенсивность флуоресценции HbA<sub>1c</sub> при разных условиях хранения крови**

Как следует из рисунка 3 самая низкая концентрация глюкозы крови консервирующего раствора вызывала наименьший рост (39 о.е.) интенсивности флуоресценции HbA<sub>1c</sub>, при этом ширина полувысоты пика составила 83 о.е.

Максимальная концентрация глюкозы крови консервирующего раствора, используемая в этой серии исследований, приводила к значительному росту интенсивности флуоресценции HbA<sub>1c</sub> эритроцитов ( $p < 0,02$ ), достигая 227 о.е., при этом ширина полувысоты пика была наименьшей — 74 о.е.

Переменный уровень глюкозы консервирующего раствора сопровождался наибольшими различиями в содержании гликогемоглобина эритроцитов, значение RDW\_Hb составляло 115 о.е. Этот параметр эквивалентен параметру анизоцитоза, используемый в гематологии при оценке красных кровяных телец. При этом среднее значение интенсивности флуоресценции HbA<sub>1c</sub> эритроцитов не превышало 82 о.е., что было достоверно ( $p < 0,05$ ) выше, чем в условиях инкубации крови с нормальным уровнем глюкозы.

С использованием сигнала прямого светорассеяния проточного цитометра мы определяли его среднее значение (Mean\_FSc), которое тесно коррелирует со средним содержанием гемоглобина эритроцитов [2].

Нами проведен сравнительный анализ содержания гликогемоглобина эритроцитов от значения с Mean\_FSc. Установлено, что наиболее тесная корреляционная связь между этими параметрами ( $r = 0,94$ ) получена образцах с поздними сроками хранения и менее тесная: 0,84 — с пробами свежей крови.

Минорная форма гемоглобина человека  $A_{1c}$  является продуктом посттрансляционной модификации гемоглобина A1 глюкозой по  $\beta$  и  $\alpha$ -цепям, а также по  $\epsilon$ -аминогруппам боковых цепей аминокислот. Данную модификацию можно рассматривать в качестве белка-маркера сахарного диабета. В настоящее время  $HbA_{1c}$  используется как общепринятый показатель оценки состояния и степени компенсации углеводного обмена, поскольку позволяет проследивать уровень гликемии в широком временном диапазоне. Углеводная модификация  $HbA_{1c}$  изменяет способность гемоглобина связывать аллостерические эффекторы, и оказывает существенное влияние на кислород-транспортную функцию крови.

В последние несколько лет увеличилось количество запросов на измерение  $HbA_{1c}$ . Во многом это связано с публикацией результатов двух крупных клинических испытаний [1]. Результаты, полученные в этой работе, обосновывают тезис, согласно которому улучшенный гликемический контроль полезен для пациентов и уменьшает осложнения, связанные с диабетом. В Республике Беларусь среди критериев диагностики сахарного диабета у детей (Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь 23.08.2019 №90) содержится и определение  $HbA_{1c}$ ; особенно важно определение гликированного гемоглобина при сахарном диабете 2 типа, что также нашло отражение в Приказе Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 2011 года.

Установленные в нашем исследовании закономерности увеличения  $HbA_{1c}$  при хранении крови в условиях гипергликемии позволяет использовать нашу методику не только для мониторинга долгосрочных уровней глюкозы в крови, но и оценивать колебания ее уровня в течение предшествующих 15-30 дней. Это существенно меньше, чем при использовании традиционных методик, что особенно важно при оценке гликемического контроля у пациентов с сахарным диабетом [6, 8].

#### **Заключение.**

1. Разработан метод определения гликогемоглобина эритроцитов методом проточной цитометрии с использованием антител.

2. Выявлена взаимосвязь между уровнем гипергликемии и внутриклеточной концентрацией  $HbA_{1c}$ . Переменный уровень глюкозы консервирующего раствора приводит к росту ширины распределения эритроцитов по содержанию гликогемоглобина.

3. Определение уровня  $HbA_{1c}$  методом проточной цитометрии является важным дополнением к определению глюкозы в крови при оценке контроля гликемии, для наблюдения за больными диабетом, предоставляя более достоверную информацию, чем концентрация глюкозы. Предложенная нами методика позволит снизить количество осложнений, связанных с невозможностью точного контроля содержания глюкозы в крови у пациентов с диабетом.

#### **Список литературы**

1. Современные подходы к исследованию гликированного гемоглобина в клинической практике / А. П. Шепелькевич [и др.] — Здравоохранение. — 2014. — № 11. — С. 11–14.
2. Briggs, C. New Red Cell Parameters on the Sysmex XE-2100 as Potential Markers of functional Iron Deficiency / C. Briggs, R. Rogers, B. Tompson, S. J. Machin // Sysmex Journal International. — Vol. 11. — No. 2. — P. 63–68.

3. Candidate reference methods for hemoglobin Alc based on peptide mapping / U. Kobold [et al.] // Clin Chem. — 1997. — Vol. 43. — P. 1944–1951.
4. Correlation of glucose regulation and hemoglobin Alc in diabetes mellitus / R. Koenig [et al.] // N Engl J Med. — 1976 — Vol. 295. №8. — P. 417–420.
5. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association / S. M. Grundy [et al.] // Circulation. — 1999. — Vol. 100. — №10. — P. 1134–1146.
6. Luthra, M., Balasubramanian D. Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins / M. Luthra, D. Balasubramanian // J Biol Chem. — 1993. — Vol. 268. — №24. — P. 18119-18127.
7. Miedema, K. Standardization of HbA1c and Optimal Range of Monitoring / K. Miedema // Clin Lab Invest Scand. — 2005. Vol. — 240. — P. 61-72.
8. Reynolds, T., Smellie W., Twomey P. Glycated haemoglobin (HbA1c) monitoring / T. Reynolds, W. Smellie, P. Twomey // BM. — 2006. — Vol. 333. — №7568. — P. 586–588.
9. Zannad, F. Diabetes clinical trials: helped or hindered by the current shift in regulatory requirements? / F. Zannad [et al.] // Eur. Heart J. — 2012. — Vol. 33. — P. 1049–1057.

## **POSSIBILITY OF USING FLOW CYTOMETRY FOR DIAGNOSIS AND MONITORING THERAPY OF DIABETES MELLITUS**

---

*Akulich N.V.<sup>1</sup>, Syakhovich V.E.<sup>1</sup>, Soroka A.V.<sup>2</sup>, Zinchuk V.V.<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>National Antidoping Laboratory, Ljasny, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>Belarusian State Economic University, Minsk, Republic of Belarus*

*<sup>3</sup>Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *The good approach to monitor the haematological response of patients with diabetes mellitus during therapy is controversial. We propose to extend the new flow cytometric method for the detection glycohaemoglobin. The erythrocyte glycohaemoglobin content may be used as sensitive and specific indicators of glycosuria in clinical situations.*

## ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ВОСПАЛЕНИЯ В КРОВИ ПРИ СОЧЕТАНИИ ОСТРЫХ КОРОНАРНЫХ СИНДРОМОВ И САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА У ПАЦИЕНТОВ В ИРАКЕ

*Аль Фаххам С.М.А.<sup>1,2</sup>, Канунникова Н.П.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Я.Купалы», г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Al Iskandarona Lab., Baghdad, Iraq

**Резюме.** Изучение показателей окислительного стресса и воспаления в крови пациентов с острой коронарной патологией (ОКС) и сахарном диабете 2 типа (СД2) показало, что при сочетании ОКС+СД2 наблюдается развитие проявлений окислительного стресса. Воспалительная реакция наблюдается при ОКС, но не при СД2, однако при сочетании ОКС+СД2 реакции воспаления усиливаются, что необходимо учитывать при определении риска развития осложнений при сочетанной патологии.

**Введение.** Окислительный стресс является патофизиологическим механизмом воздействия на все аспекты развития многих патологических состояний, как для сердечно-сосудистых, так и заболеваний, связанных с гормональными нарушениями, ишемическими повреждениями и др. [1, 2, 5]. Образовавшиеся в клетках активные формы кислорода могут приводить к повреждению клеточных элементов сосудистой стенки и периферической крови, приводя к нарушению их функциональной активности [4]. В ответ на повышение плазменных индукторов нейтрофилы приобретают готовность к участию в воспалении, которому предшествует активация клеток, выработка медиаторов воспаления и кислородных радикалов [3]. Наличие воспаления является важным фактором, определяющим угрозу сердечно-сосудистого риска и повышение частоты летальных исходов [7, 8]. В развитии метаболических нарушений при сахарном диабете важную роль также играет активация образования свободнорадикальных продуктов и связанная с этим инициация воспаления [6]. Сахарный диабет второго типа (СД2) достаточно часто сочетается с коронарной патологией, например, с острыми коронарными синдромами (ОКС), поэтому нами было проведено изучение особенностей развития окислительного стресса и воспаления при сочетании данных заболеваний.

**Материалы и методы исследования.** Были проанализированы показатели окислительного стресса и воспаления в крови пациентов с ОКС в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующего СД2. Образцы крови были получены в специализированной лаборатории «Al-Iskandarona» (Багдад, Ирак). Были исследованы образцы крови 42 пациентов с ОКС ( $55,6 \pm 0,6$  лет). В группу лиц с СД2 без коронарной патологии входило 48 человек ( $54,3 \pm 0,8$  лет). В группе пациентов с ОКС, осложненной сопутствующим СД2, было 43 человека ( $54,7 \pm 0,7$  лет). Контрольную группу составили 46 практически здоровых человека ( $51,9 \pm 0,9$  лет).

С целью характеристики выраженности окислительного стресса в крови измеряли содержание тиобарбитурат-реагирующих соединений (ТБКРС) колориметрическим методом с использованием наборов AssayKit (TCA Method) Cayman Chemical Company, США, на анализаторе Form Plus 3000 Callegari (Италия), общую антиоксидантную активность (ОАОА) — с использованием наборов Elisa Kit T-AOC (Bioassay Technology Lab, США) и активность основного

фермента антиоксидантной защиты в крови супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реагентов фирмы BioScience (BenderMedsys, США) на анализаторе Form Plus 3000 Callegari (Италия).

Наличие воспалительной реакции оценивали по количеству лейкоцитов (измеряли на гематологическом анализаторе UniCell DxH800 (Швейцария), уровню С-реактивного белка (СРБ, метод иммунотурбидиметрии с использованием коммерческих наборов реагентов на биохимическом анализаторе SYNCHRON® UniCel® 800 (Швейцария), а также содержанию провоспалительных лейкинов интерлейкина 6 (ИЛ-6) и интерлейкина 8 (ИЛ-8), которые определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реагентов фирмы BioScience (BenderMedsys) (США) на анализаторе Form Plus 3000 Callegari (Италия).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программ Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 6.0. Данные представляли в виде  $M \pm SEM$ , где  $M$  — среднее значение,  $SEM$  — стандартная ошибка среднего. Достоверность межгрупповых различий оценивали, используя тест Краскелла-Уоллиса с попарным сравнением критерия Стила-Двасса. Во всех случаях статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Результаты исследований показателей окислительного стресса и воспаления в периферической крови показали существенные их отличия в группах пациентов с острой коронарной патологией и СД2 по сравнению с контрольной группой. Как следует из таблицы 1, активность СОД у пациентов с ОКС оказалась на 10% ( $p < 0,05$ ) ниже, чем в контрольной группе, тогда как в группе СД2 и ОКС+СД2 она ниже на 15% ( $p < 0,05$ ). Антиоксидантная активность во всех исследованных группах на 14% ниже ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе. В то же время содержание ТБКРС во всех группах практически в 2 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе.

**Таблица 1 — Показатели окислительного стресса в крови пациентов с ОКС, СД2 и комбинации ОКС + СД2**

Показатель	ОКС	СД2	ОКС+СД2	Контроль
СОД, усл. ед./мл	86,4* (79,6; 93,1)	81,5* (79,3; 86,4)	81,5* (79,3; 86,4)	95,7 (88,0; 103,5)
АОА, ммоль/л	1,23* (1,18; 1,34)	1,22* (1,11; 1,32)	1,20* (1,06; 1,29)	1,58 (1,40; 1,75)
ТБКРС, нмоль/мл	0,039* (0,033; 0,044)	0,040* (0,036; 0,044)	0,043* (0,039; 0,050)	0,020 (0,016; 0,030)

*Примечания:*  $p^*$  —  $p < 0,05$  — по сравнению с контрольной группой; # — по сравнению с СД2; @ — по сравнению с ОКС

Что касается показателей воспаления, то их отклонения от значений в контроле наблюдались при наличии острой коронарной патологии (таблица 2). Так, при СД2 явлений воспаления практически не отмечалось, тогда как при инфаркте миокарда содержание лейкоцитов хоть и незначительно, но было выше уровня лейкоцитов у здоровых людей ( $p < 0,05$ ). При этом уровень СРБ был в 7 раз выше ( $p < 0,05$ ) контроля, содержание ИЛ-6 оказалось выше значений в контрольной группе в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), а ИЛ-8 на 18% ( $p < 0,05$ ).

При сочетании ОКС и СД2 было отмечено усиление воспалительной реакции. Хотя содержание лейкоцитов осталось на том же уровне, как и при ОКС без гормональных нарушений, но уровень ИЛ-6 оказался выше значений в контрольной группе в 2 раза ( $p < 0,05$ ) и даже выше значения в группе ОКС на 34% ( $p < 0,05$ ). Более высоким оказалось также содержание ИЛ-8: на

83% по сравнению с контролем, на 77% по сравнению с СД2 и даже на 19% выше, чем в группе с коронарной патологией без гормональных нарушений.

**Таблица 2 — Показатели воспаления в крови пациентов с ОКС, СД2 и комбинации ОКС + СД2**

Показатель	ОКС	СД2	ОКС+СД2	Контроль
Лейкоциты, $10^9$ /л	9,1* (7,8; 11,2)	6,8 (5,6; 7,8)	9,0*# (7,2; 10,0)	6,3 (5,2; 7,2)
ИЛ-6, пг/мл	6,87* (5,18; 8,30)	4,99 (3,65; 6,19)	9,20*# (7,23; 10,99)	4,39 (3,12; 5,00)
ИЛ-8, пг/мл	58,03* (43,87; 66,60)	39,18 (29,84; 44,44)	69,30*#@ (58,30; 79,00)	31,76 (20,15; 38,73)
СРБ (M±SEM), мг/мл	3,54±0,55*	0,64±0,15	4,34±0,57*#	0,73±0,21

Примечания: р\* —  $p < 0,05$  — по сравнению с контрольной группой; # — по сравнению с СД2; @ — по сравнению с ОКС

Из полученных нами данных следует, что при острой коронарной патологии, как и при метаболических сдвигах, связанных с нарушениями углеводного обмена, происходит развитие окислительного стресса, однако механизмы происходящих при этом нарушений могут несколько различаться, в результате чего сочетание острой сердечной недостаточности с сахарным диабетом сопровождается некоторым усилением перекисного окисления липидов. Для сахарного диабета не характерны проявления воспаления, тогда как инфаркт миокарда сопровождается развитием острой воспалительной реакции. В случае же сочетания нарушений углеводного обмена (диабет) и ОКС явления воспаления значительно усиливаются по сравнению с неосложненной коронарной патологией, что приводит к более выраженным проявлениям воспалительных реакций.

**Выводы.** При острой коронарной патологии и сахарном диабете 2 типа так же, как и при сочетании ОКС+СД2 наблюдается развитие достаточно однотипных проявлений окислительного стресса с активацией образования свободных радикалов и снижением систем антиоксидантной защиты. Воспалительная реакция наблюдается при ОКС, но не при СД2, однако при сочетании ОКС+СД2 реакции воспаления усиливаются, что необходимо учитывать при определении риска развития осложнений при сочетанной патологии.

### Список литературы

1. Медведева, Е. Окислительный стресс и воспаление у больных атеросклерозом / Е. Медведева, Ю. Щукин, Е. Селезнев. — Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing — 2013. — 65 с.
2. Окислительный стресс. Патологические состояния / Е.Б. Меньщикова [и др.]. — Новосибирск: АРТА, 2008. — 284 с.
3. Elahi, M.M. Free radicals in blood: Evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease / M.M. Elahi, B.M. Matata // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 2006. — Vol. 450. — P. 78–88.
4. Ikeda, U. Inflammation and coronary artery disease / U. Ikeda // Curr Vase Pharmacol. — 2003. — Vol. 1 (1). — P. 65–70.
5. Jones, D.P. Radical-free biology of oxidative stress / D.P. Jones // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2008. — Vol. 295. — P. 849–868.
6. Oxidative stress in diabetes mellitus / S.A. Moussa [et al.] // Romanian J. Biophys. — 2008. — Vol. 18, N. 3. — P. 225–236.

7. Schulze, P.C. Oxidative stress and atherosclerosis / P.C. Schulze, R.T. Lee // Current Atherosclerosis Reports. — 2005. — Vol. 7. — P. 242–248.

8. Yokoyama, M. Oxidant stress and atherosclerosis / M.Yokoyama // Current Opinion in Pharmacology. – 2004. — Vol. 4, Issue 2. — P. 110–115.

## **INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION AT THE COMBINATION OF ACUTE CORONARY SYNDROMES AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN PATIENTS IN IRAQ**

---

*Al Fahham S.M.A.<sup>1,2</sup>, Kanunnikova N.P.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Al Iskandarona Lab., Baghdad, Iraq*

**Summary.** *The study of indicators of oxidative stress and inflammation in the blood of patients with acute coronary pathology (ACS) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) showed that when ACS + T2DM is combined, the development of manifestations of oxidative stress is observed. An inflammatory reaction is observed in ACS, but not in T2DM, however, with a combination of ACS + T2DM, the inflammatory reactions intensify, which must be taken into account when determining the risk of complications in combined pathology.*

## ЛАБАРАТОРНЫЯ МАДЭЛІ ЗАГОЙВАННЯ ПАЎНАСЛОЙНЫХ СКУРНЫХ РАН ДЛЯ ВЫЯЎЛЕННЯ АСНОЎНЫХ УЛАСЦІВАСЦЯЎ СУЧАСНЫХ ПЕРАВЯЗАЧНЫХ МАТЕРЫЯЛАЎ

*Астроўскі А.А., Бакуновіч А.А., Ярашэнка Ю.У.*

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

**Рэзюмэ.** На пацуках пароды Вістар былі выкананы папярэднія даследаванні з мэтай апрабацыі новых мадэляў, прызначаных для выяўлення асноўных уласцівасцяў сучасных перавязачных матэрыялаў для ран. У якасці апошніх выкарыстаны павязкі Branolind і HydroTas, уласцівасці якіх параўноўвалі з класічнымі марлевымі перавязачнымі матэрыяламі. Паказана, што выкарыстанне даных мадэляў дазваляе высветліць уплыў перавязачных матэрыялаў на працэс загойвання ран, каевую эпідэрмізацыю, падрыхтаванасць ранавай паверхні для прыняцця скурных трансплантатаў і на эфектыўнасць іх прыжыўлення.

**Уводзіны.** У апошнія гады ў медыцынскай практыцы ўсё больш шырокае выкарыстанне знаходзяць новыя перавязачныя матэрыялы для закрыцця скурных ран, якія могуць утрымліваць розныя біялагічна актыўныя рэчывы. Такія матэрыялы могуць пераўзыходзіць некаторымі сваімі карыснымі характарыстыкамі класічныя перавязачныя матэрыялы, заснаваныя на марлі [1, 2, 3, 4]. Па-сутнасці, адкрылася новае поле для навуковай дзейнасці, звязанай з распрацоўкай перспектывных перавязачных матэрыялаў з палепшанымі ўласцівасцямі.

Аднак практычная рэалізацыя адзначанай магчымасці ў пэўнай ступені абмежавана добрымі лабараторнымі мадэлямі, якія б маглі выразна дэманстраваць тыя ці іншыя перавагі новых, патэнцыйна карысных матэрыялаў на фоне класічных марлевых павязак [5, 6, 7].

У сувязі з адзначаным, мэтай праведзенага даследавання стала папярэдняя апрабацыя распрацаваных намі мадэляў, накіраваная на ацэнку іх здольнасці выяўляць асноўныя ўласцівасці новых перавязачных матэрыялаў.

**Матэрыялы і метады даследавання.** У даследаванні выкарыстоўвалі пацукоў-самак пароды Вістар масай 200-250 г. Усе яны ў час, калі на іх спінах былі ахоўныя камеры з ранами і аўтатрансплантатамі (АТ), знаходзіліся ў індывідуальных клетках

У якасці перавязачных матэрыялаў, для параўнання іх уласцівасцяў, былі абраны:

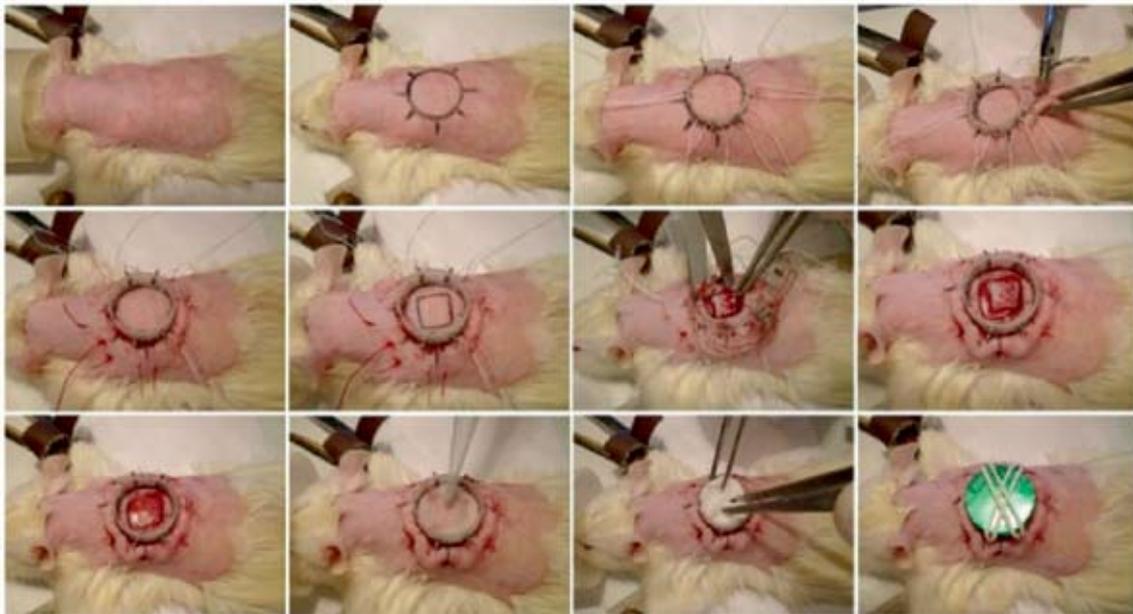
- марлевыя дыскі і тампоны (варыянт вядзення ранавых паверхняў (РП) і АТ на іх з дапамогай даных матэрыялаў далей называецца класічным), выкарыстоўвалася марля х/б медыцынская адбеленая Благіт («Баранавіцскае вытворчае аб'яднанне»);

- атраўматычная сеткавая павязка Branolind («Паўль Хартманн», Германія);

- гідрагелевая стэрыльная павязка Hydrotac transparent («Паўль Хартманн», Германія);

Для выяўлення асаблівасцяў загойвання паўнаслойных скурных ран (ПСР) і прыжыўлення АТ пад названымі вышэй відамі перавязачных матэрыялаў было выкарыстана 4 мадэлі:

- мадэль 1; для ацэнкі загойвання паўнаслойнага скурнага дэфекту (ПСД), рэгенерацыя якога адбываецца найперш за кошт механізмаў раневой кантракцыі і краевой эпідэрмізацыі (для выканання дадзенай мадэлі на скуры міжлапаткавай вобласці пацукоў, пазбаўленай поўсці, падшывалі ахоўную камеру, унутры якой стваралі ПСР, плошчай 1,2–1,5 см<sup>2</sup>; гл. мал. 1);



**Малюнак 1 — Асноўныя этапы фіксацыі ахоўнай камеры і стварэння ПСД на скуры лабараторнага пацука**

- мадэль 2; для ацэнкі прыжыўлення скурных АТ на РП, на якой некалькі дзён да трансплантацыі (Т) знаходзіліся розныя раневыя пакрыцці (для Т выкарыстоўвалі вушныя скурналіпахандрацытарныя АТ — 9 штук плошчай па 11 мм<sup>2</sup> кожны, якія атрымлівалі з вушных ракавін тых жа пацукоў; ацэнка эфектыўнасці прыжыўлення АТ адбывалася па ступені інгібіравання імі раневой кантракцыі);

- мадэль 3; для ацэнкі ўплыву таго ці іншага пакрыцця, размешчанага на паверхні скурных АТ пасля іх пераносу на РП, на прыжыўляльнасць даных АТ (ацэнка ўплыву перавязачнага матэрыялу на прыжыўляльнасць АТ адбывалася па вышэй названым крытэры);

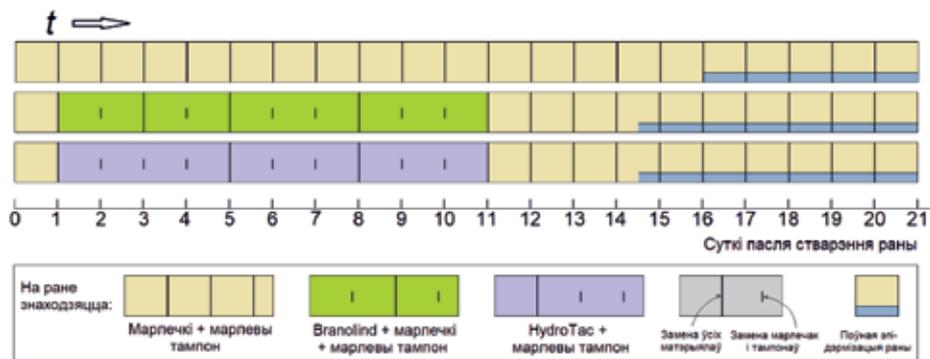
- мадэль 4; для ацэнкі ўплыву таго ці іншага ранавага пакрыцця на краевую эпідэрмізацыю, калі такая мусіць адбывацца ва ўмовах вялікай ПСР з абільнай эксудацыяй.

У час падшывання ахоўнай камеры, стварэння ПСД, выканання Т, а таксама ў час штодзённых перавязак і фатаграфавання жывёлы знаходзіліся пад эфірным наркозам. Усе маніпуляцыі з імі выконваліся ў адпаведнасці з ДАСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 а таксама ТКП 125-2008 (02040) «Належная лабараторная практыка».

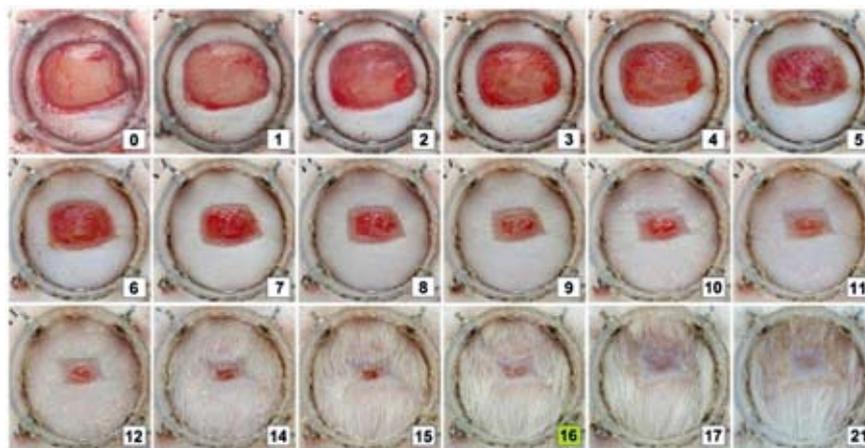
**Вынікі даследавання і іх абмеркаванне.** Апрабацыя мадэлі 1. На мал. 2 схематычна паказана, якія пакрыцці і колькі часу знаходзіліся на РП у жывёл з мэтай выяўлення іх уплыву на загойванне ПСД.

Прыклады загойвання ПСД ва ўмовах вядзення ран пад абранымі пакрыццямі паказаны на мал. 3-5. Параўнанне зыходнай ступені пашкоджання скуры і канчатковага выніку загойвання раны (на момант завяршэння яе эпідэрмізацыі) — на мал. 6.

Выкарыстанне дадзенай мадэлі дазваляе вымяраць плошчу РП, абмежаваную як краем інтактнай скуры, так і краем эпідэрміса, які нарастае на РП. Прычым, ёсць магчымасць рабіць гэта на ўсіх этапах загойвання ПСД. Таксама, магчыма дакладна фіксаваць момант наступлення поўнай эпідэрмізацыі. Адзначанае дазваляе разлічваць такія параметры рэгенерацыі ПСР, як працягласць яе загойвання, тэмпы апошняга, вывучаць дынаміку данага працэса (напрыклад, як паказана на мал. 7), характарызаваць асаблівасці рэгенерата на момант завяршэння эпідэрмізацыі.

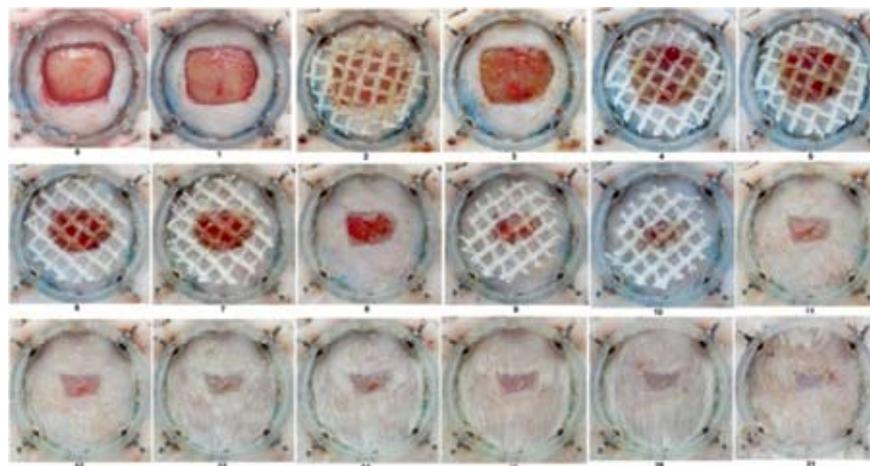


**Малюнок 2 — Схематична пазначаны матэрыялы, якія выкарыстоўваліся для пакрыцця ПСД у жывёл першай серыі, і час іх знаходжання на ранавай паверхні. Пасля 11 сут. на ўсе РП клалі толькі марлечкі і тампоны таму, што плошча раны, не пакрытай эпідэрмісам, складала каля 1-2 мм<sup>2</sup>**



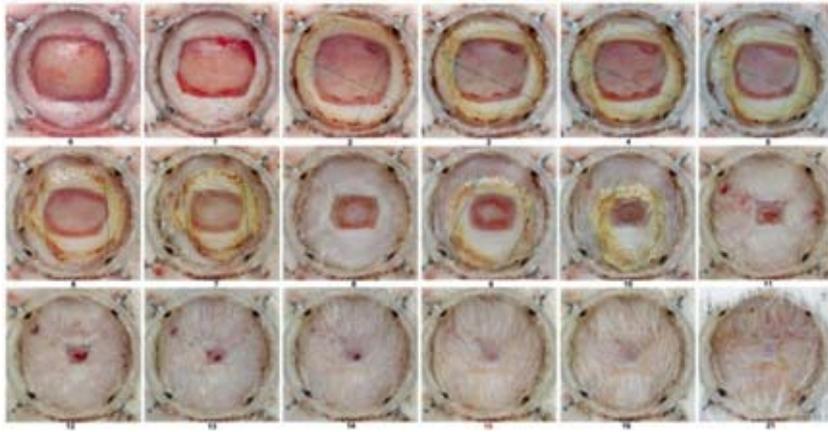
Тут і далей лічбамі пазначана колькасць сутак, якія прайшлі пасля стварэння ПСД. Поўная эпідэрмізацыя адбылася праз 16 сутак.

**Малюнок 3 — Пасуткавая дынаміка загойвання ПСР у пацука пад марлечкамі і тампонамі ва ўмовах іх штосуткавай замены**



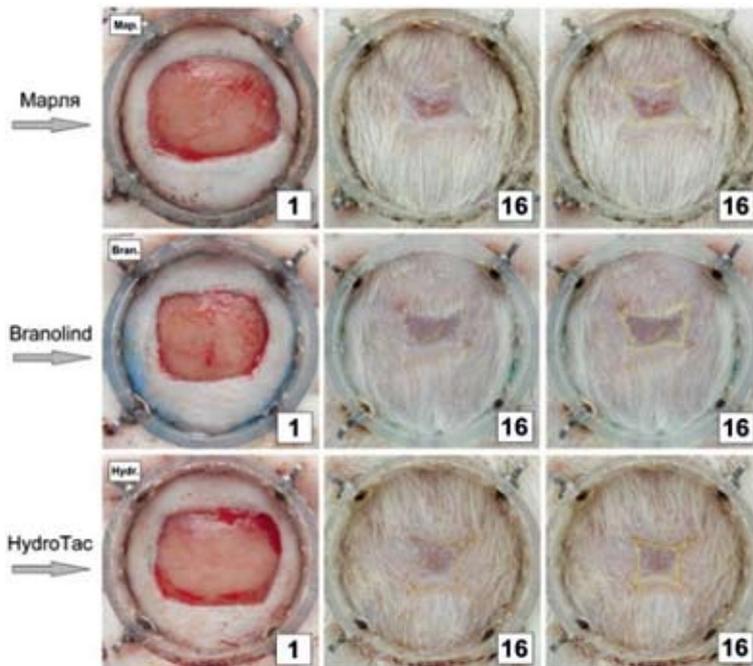
Поўнае загойванне адбылося праз 14,5 сутак.

**Малюнок 4 — Пасуткавая дынаміка загойвання ПСР пад пакрыццём Branolind, а таксама марлечкамі і тампонамі ва ўмовах штосуткавай замены апошніх**



Поўная эпідэрмізацыя адбылася праз 14,5 сутак.

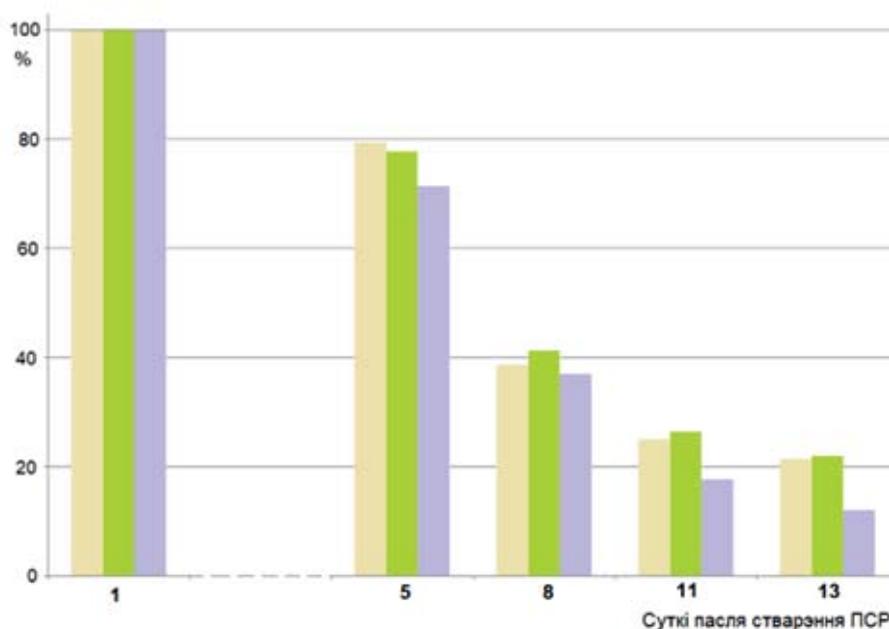
**Малюнак 5 — Пасуткавая дынаміка загойвання ПСР пад пакрыццём HydroTac, а таксама тампонамі ва ўмовах штосуткавай замены апошніх**



На правым слупку фота жоўтай лініяй пазначана мяжа паміж былой ранай і краем інтактнай скуры. Знутры ад гэтай лініі знаходзіцца грануляцыйная тканка, пакрытая эпідэрмісам.

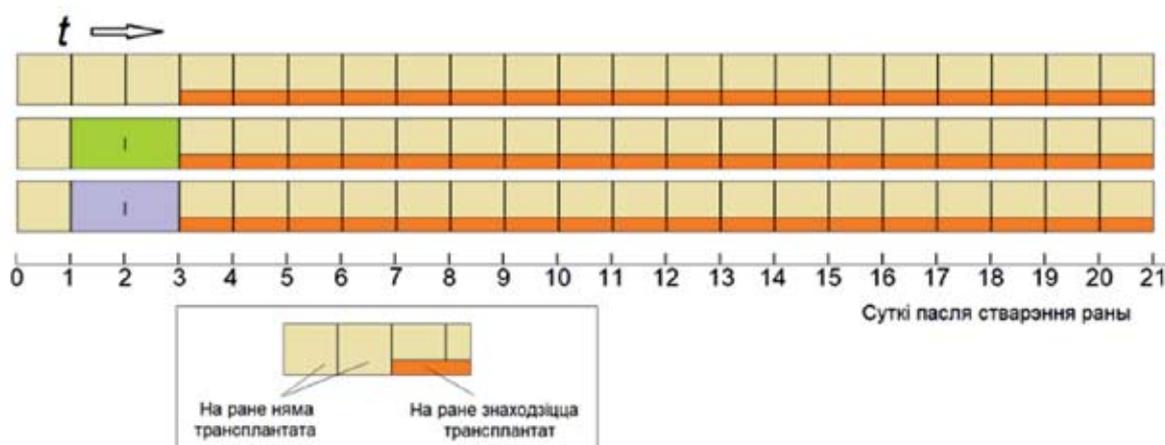
**Малюнак 6 — Параўнанне зыходнага выгляду ПСД у пацукоў (сфатаграфавана праз 1 сут. пасля пашкоджання) і іх выгляду пасля наступлення поўнай эпідэрмізацыі (праз 16 сут.)**

Папярэдняя апрабаваная дадзенай мадэлі для выяўлення асаблівасцяў адзначаных вышэй перавязачных матэрыялаў дазваляе выказаць меркаванне, што гідрагелевае пакрыццё *HydroTac*, якое выкарыстоўваецца для забеспячэння загойвання адносна невялікіх ран, вядзе (у параўнанні з класічнымі марлевымі павязкамі) да змяншэння аб'ёму грануляцыйнай тканкі, якая развіваецца на месцы ПСД, і да павелічэння тэмпаў рэгенерацыі. Гэтыя феномены могуць быць абумоўлены тым, што пры выкарыстанні данага пакрыцця грануляцыйная тканка ў цэнтры раны развіваецца слаба (гл. мал. 5, суткі 4-9), а кантракцыя забяспечваецца грануляцыйнай тканкай, якая ўтвараецца каля края скуры.



**Малюнак 7 — Графічная ілюстрацыя дынамікі змены плошчы ПСР (участка без дэрмы; выкарыстана колерная сімволіка мал. 2)**

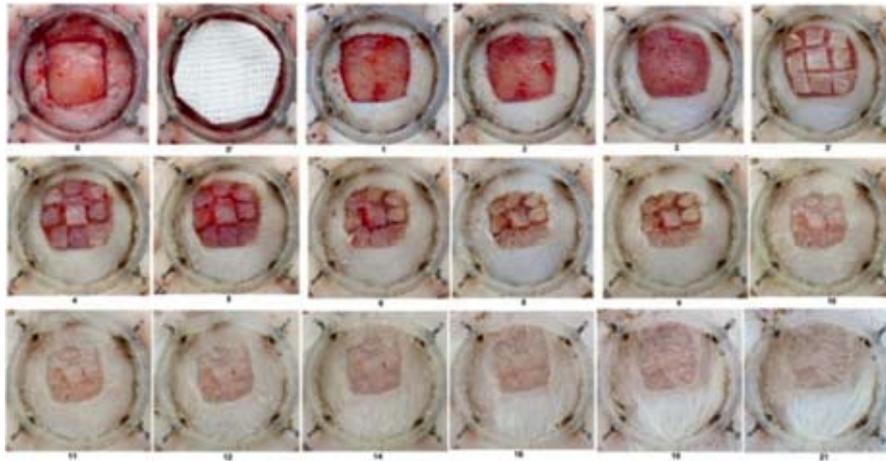
Апрабацыя мадэлі 2. На мал. 8 схематычна паказана, якія матэрыялы і колькі часу знаходзіліся на РП пацукоў да таго, як на іх былі перанесены скурныя трансплантаты.



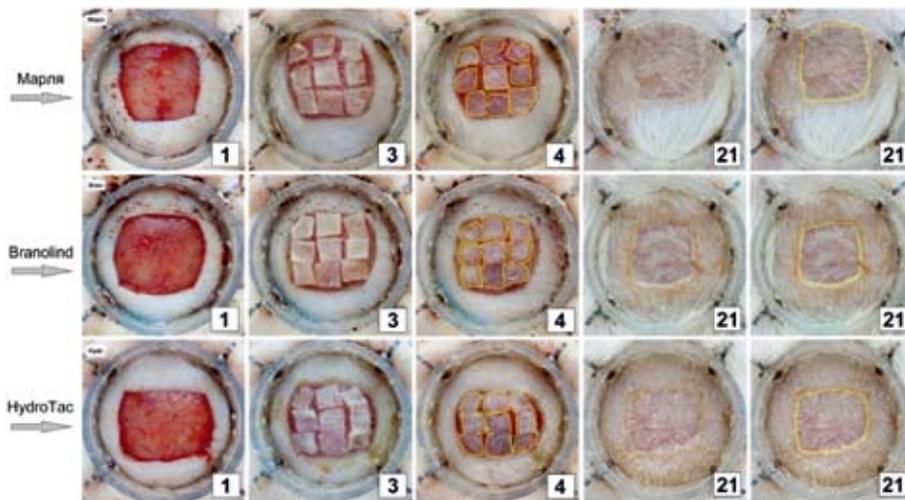
**Малюнак 8 — Час знаходжання розных матэрыялаў на паверхні ПСД і АТ на ёй у жывёл 2-й групы (дадатковыя пазначэнні як на мал. 2)**

Пасуткавая дынаміка прыжыўлення скурных АТ на РП, якая перад і пасля Т знаходзілася пад марлевым пакрыццём, паказана на мал. 9. Параўнанне зыходнага выгляду ПР у трох жывёл ва ўмовах дадзенай мадэлі, яе ж непасрэдна і праз суткі пасля трансплантацыі, а таксама яе выгляду праз 21 суткі пасля пашкоджання — на мал. 10.

Выкарыстанне 2-й мадэлі дазваляе вымяраць плошчу РП перад Т, плошчу АТ, размешчаных на паверхні ПСД, плошчу былой раны пасля поўнага прыжыўлення АТ. Шляхам суаднясення апошняй з плошчай створанага ПСД і плошчай АТ, перанесеных на рану, можна выявіць, у якой ступені АТ тармазілі кантранкцыю раны. Гэты паказчык у дадзенай мадэлі сведчыць пра ступень падрыхтаванасці РП (якая можа мець розныя ўласцівасці пасля знаходжання на ёй тых ці іншых перавязачных матэрыялаў) для прыняцця АТ.



**Малюнак 9 — Выгляд ПСД, які першыя 3 сутак знаходзіўся пад марлечкамі ды тампонамі і на які затым перасадзілі скурныя АТ**



На 3-м і 5-м слупках фота жоўтай лініяй адпаведна: краі скурных трансплантатаў і край інтактнай скуры. Знутры ад апошняй знаходзіцца тэрыторыя, занятая АТ.

**Малюнак 10 — Параўнанне зыходнага выгляду ПСД (паказаны праз 1 сут. пасля пашкоджання), яго ж пасля Т (паказана праз 3 і 4 сут. пасля стварэння раны) і яго выгляду праз 21 суткі пасля пашкоджання**

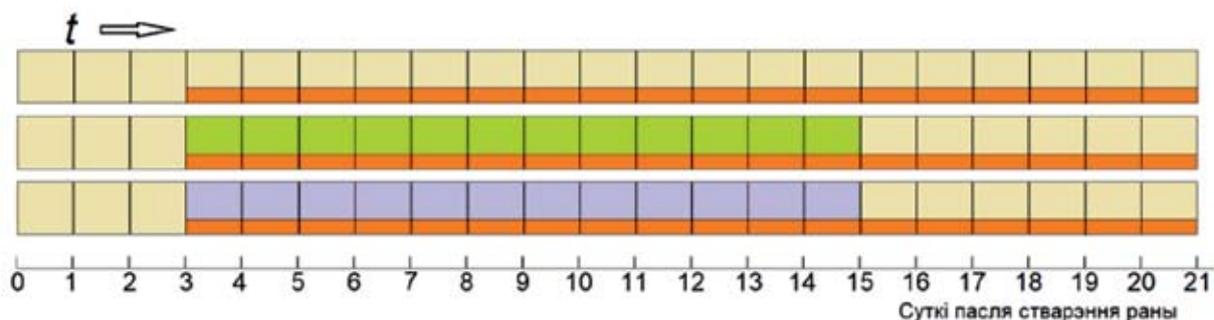
Папярэдняя апрабацыя дадзенай мадэлі дазваляе выказаць меркаванне, што выкарыстанне пакрыцця *Branolind* пагаршае ўмовы на РП для наступнага закрацця яе скурнымі АТ.

Апрабацыя мадэлі 3. На мал. 11 схематычна паказана, якія матэрыялы і колькі часу знаходзіліся на РП з АТ.

Параўнанне зыходнага выгляду раны ў гэтых жывёл, выгляду раны непасрэдна пасля Т кавалкаў скуры і канчатковага яе выгляду праз 21 суткі пасля пашкоджання паказана на мал. 12.

Выкарыстанне гэтай (3-й) мадэлі дазваляе знаходзіць тыя ж паказчыкі, што і ў мадэлі 2. Аднак ва ўмовах дадзенай мадэлі ацэньваецца на колькі пакрыцці, выкарыстаныя для прытрымання АТ на РП, адносна спрыяюць альбо перашкаджаюць іх прыжыўленню.

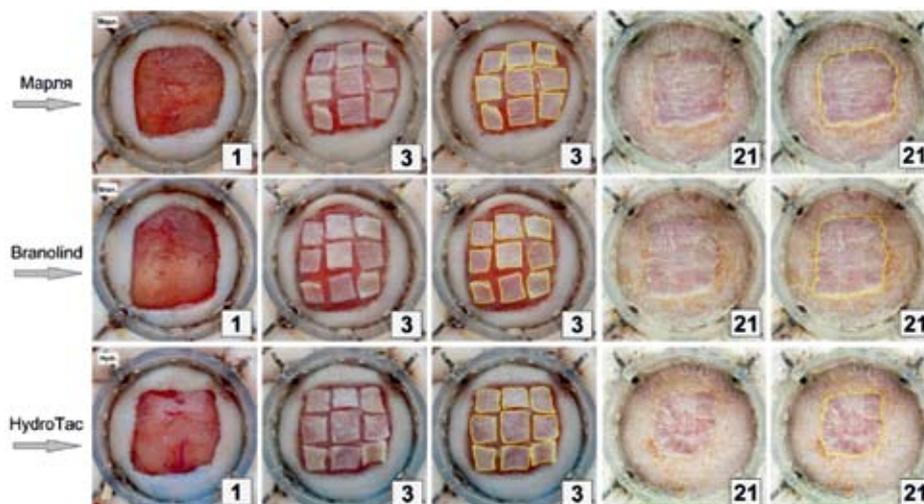
Папярэдняя апрабацыя дадзенай мадэлі дазваляе выказаць меркаванне, што выкарыстанне пакрыцця *HydroTac* для закрыцця перасаджаных на рану скурных АТ, можа пагаршаць умовы для паспяховага прыжыўлення апошніх.



**Малюнак 11 — Час знаходжання розных матэрыялаў на паверхні ПСД і АТ на ёй у жывёл 3-й групы (дадатковыя пазначэнні як на мал. 2)**

Апрабацыя мадэлі 4. Даная мадэль адрознівалася ад папярэдніх найперш тым, што ў пацую ў міжлапатакавай вобласці стваралі ПСД плошчай каля 3 см<sup>2</sup> і на яго паверхню размяшчалі толькі тры АТ.

На мал. 13 схематычна паказана, якія матэрыялы і колькі часу знаходзіліся на РП, спачатку без, а затым з АТ.



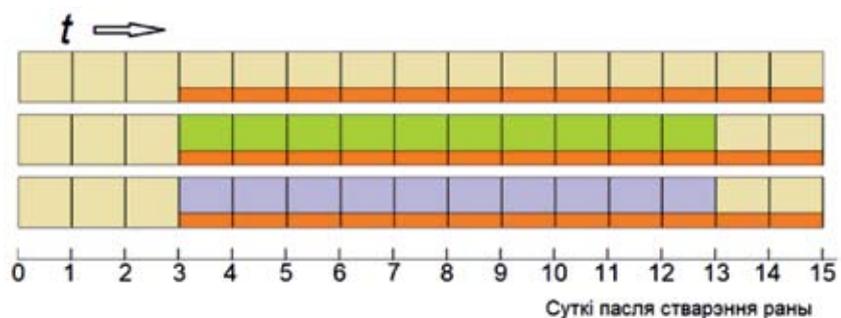
На 3-м і 5-м слупках фота жоўтай лініяй памечаны краі скурных трансплантатаў і край інтактнай скуры адпаведна.

**Малюнак 12 — Параўнанне зыходнага выгляду ПСД (паказаны праз 1 сут. пасля пашкоджання), яго выгляду непасрэдна пасля трансплантацыі скуры (3 сут. пасля стварэння раны) і яго ж выгляду праз 21 суткі пасля пашкоджання**

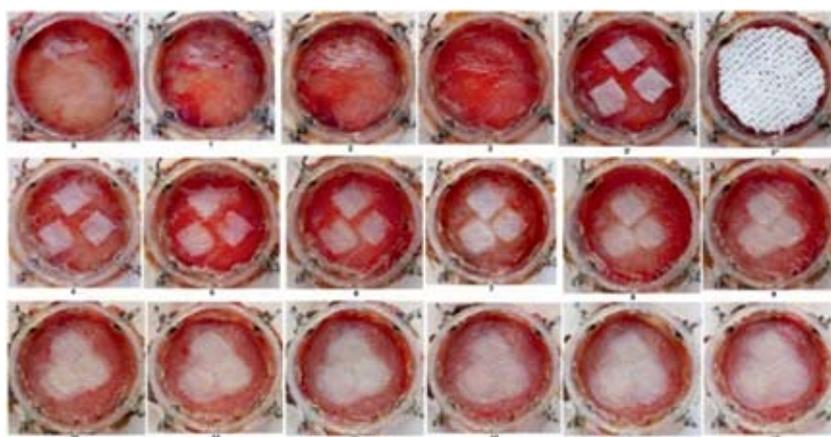
Пасуткавая дынаміка прыжыўлення і разрастання скурных АТ на такой РП у аднаго з жывёл з класічным марлевым пакрыццём паказана на мал. 14. Параўнанне выгляду раны ў жывёл дадзенай мадэлі непасрэдна пасля АТ, а таксама канчатковага яе выгляду праз 14 сутак пасля пашкоджання — на мал. 15.

Выкарыстанне 4-й мадэлі дазваляе знаходзіць такія паказчыкі, як плошча АТ адразу пасля Т і плошча АТ праз 2 тыдні пасля яе. Розніца паміж імі — аб'ектыўны паказчык інтэнсіўнасці разрастання эпідэрміса пад адпаведнымі перавязачнымі матэрыяламі, размешчанымі на ране з абільнай эксудацыяй.

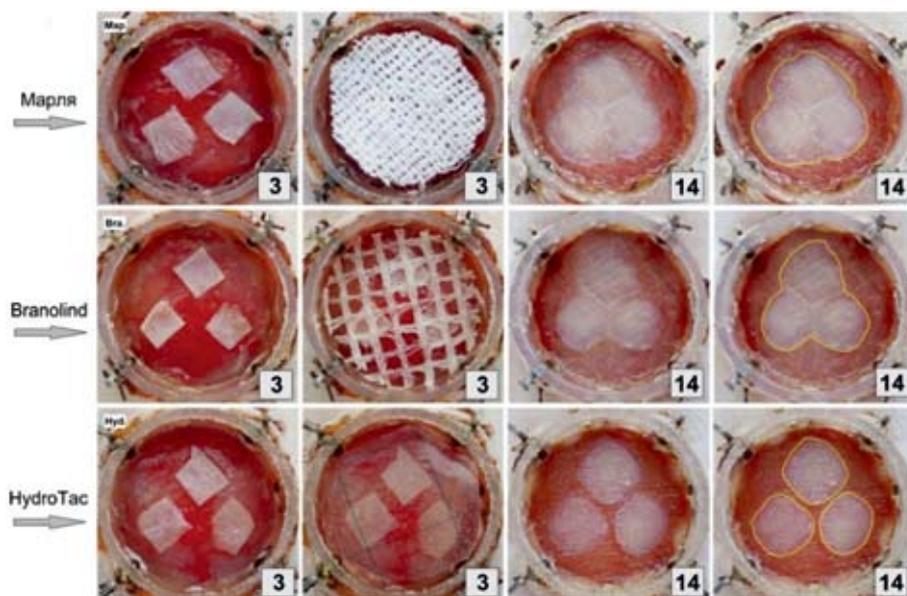
Папярэдняя апрабацыя дазваляе меркаваць, што пакрыццё *HydroTac* можа пагаршаць умовы для разрастання эпідэрміса ў такіх умовах.



Малюнак 13 — Час знаходжання розных матэрыялаў на паверхні ПСД і АТ ёй у жывёл 4-й групы (дадатковыя пазначэнні як на мал. 2)



Малюнак 14 — Змена выгляду ПСР вялікага памеру, на якую праз 3 сутак пасля яе стварэння перасадзілі 3 скурных трансплантаты, якія затым да 13 сутак знаходзіліся пад марлевымі «павязкамі» і тампонамі.



На 4-м слупку фота жоўтай лініяй пачэчаны край эпідэрміса, які нарос на ПСД з АТ.  
 Малюнак 15 — Параўнанне выгляду ПСД вялікага памеру праз 3 сут. пасля пашкоджання, непасрэдна пасля Т трох кавалкаў скуры і яго выгляду праз 14 суткі пасля пашкоджання ў пацукоў дадзенай мадэлі.

**Заклучэнне.** Такім чынам, выкананая намі папярэдняя апрабацыя запрапанаваных мадэляў паказала, што яны сапраўды дазваляюць высветляць уплыў перавязачных матэрыялаў на працэс загойвання ран, краевую эпідэрмізацыю, падрыхтаванасць ранавай паверхні для прыняцця скурных трансплантатаў і на эфектыўнасць іх прыжыўлення пасля трансплантацыі.

### Спіс літаратуры

1. Винник, Ю. С. К вопросу о выборе раневых покрытий в лечении гнойных ран / Ю. С. Винник, Н. М. Маркелова, Е. И. Шишацкая, М. Н. Кузнецов, Н. С. Соловьева, А. П. Зубев // *Фундаментальные исследования*. — 2015. — Т.5, №1. — С. 88–91.
2. Каскаев, А. В. Перспективы применения современных раневых покрытий у ожоговых больных / А. В. Каскаев, Д. В. Черданцев, И. Н. Большаков // *Сиб. Мед. Обозрение*. — 2011. — Т. 68, №2. — С. 3–6.
3. Макаренко, М. В. Современные подходы к разработке раневых покрытий / М. В. Макаренко, В. П. Курченко, С. А. Усанов // *Труды Белорусского государственного университета*. — 2016. — Т. 11, №1. — С. 273–279.
4. Юданова, Т. Н. Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) / Т. Н. Юданова, И. В. Решетов // *Химико-фармацевтический журнал*. — 2006. — Т. 50, №2. — С. 24–31.
5. Goonoo, N. Analyzing polymeric nanofibrous scaffold performances in diabetic animal models for translational chronic wound healing research / N. Goonoo, A. Bhaw-Luximon // *Nanotechnology Reviews*. — 2017. — Vol. 6, №6. — P. 583.
6. Grada, A. Research techniques made simple: animal models of wound healing / A. Grada, J. Mervis, V. Falanga // *J. Invest. Dermatol.* — 2018. — Vol. 138, №10. — P. 2095.
7. Shi, C. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds / C. Shi, C. Wang, H. Liu, Q. Li, R. Li, Y. Zhang, Y. Liu, Y. Shao, J. Wang // *Front. Bioeng. Biotechnol.* — 2020. — №8. — P. 182.

## LABORATORY MODELS OF HEALING OF FULL-THICKNESS SKIN WOUNDS TO IDENTIFY THE MAIN PROPERTIES OF MODERN DRESSINGS

---

*Astrowski A.A., Bakunovich A.A., Yarashenka Y.V.*

*Republican Scientific Research Unitary Enterprise  
«Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy  
of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** Preliminary studies were performed on Wistar rats to test new models designed to identify the basic properties of modern wound dressings. Branolind and HydroTac bandages were used as the latter, the properties of which were compared with classic gauze dressings. It is shown that the use of these models allows us to determine the effect of dressings on the healing process of wounds, epidermalization, the readiness of the wound surface for the adoption of skin grafts and the effectiveness of their engraftment.

## АСАБЛІВАСЦІ ГІСТАЛАГІЧНАГА Вывучэння ЛёГКІХ ЛАБАРАТОРНЫХ ЖЫВЁЛ ВА ўМОВАХ ПРЫЯРЫТЭТУ БІАХІМІЧНЫХ ДАСЛЕДВАННЯЎ

*Астроўскі А.А., Туманаў А.В., Палубок В.Ч.,  
Марчык А.І., Барадзіна Т.А., Шляхтун А.Г.*

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

**Рэзюмэ.** У артыкуле паказана, што некаторыя негатыўныя наступствы такога варыянту ўзяцця тканкі лёгкіх пацукоў для гісталагічнага даследвання, які адаптаваны да вырашэння прыярытэтных задач біяхімічнага даследвання, могуць быць часткова кампенсаваны атрыманнем дадатковых паказчыкаў морфа-функцыянальнага стану лёгкіх.

**Уводзіны.** Праблема вывучэння рэакцыі лёгкіх людзей на ўздзеянне разнастайных чыннікаў вонкавага асяроддзя заўсёды было актуальнай. Набыла дадатковае значэнне ў сувязі з кавіднай пандэміяй, якая ахапіла летась усё чалавецтва, працягваецца і сёння. Прычына ў тым, што лёгкія пры данай інфекцыі, як правіла, з'яўляюцца прыярытэтным органаў-мішэнню для галоўнага этыялагічнага чынніка - віруса *SARS-CoV-2* [4]. У лёгкіх хворых людзей можа развіцца т. зв. цытакінавы шторм, трамбозы дробных крывяносных сасудаў, што выклікае дыхальную недастатковасць, якая, у сваю чаргу, можа стаць прычынай смерці [7]. Даная сітуацыя істотна актуалізавала задачу пошуку дадатковых біялагічна актыўных рэчываў, здольных карэгаваць рэакцыю арганізма чалавека на інфекцыю ў кірунку максімальнай перспектывы паспяховага ачуньвання. Вядома, даны пошук варта рабіць, выкарыстоўваючы на першым этапе лабараторных жывёл — напрыклад, пацукоў [6, 3, 8]. Акрамя таго, адпаведныя даследванні часта пажадана выконваць комплексна — з выкарыстаннем біяхімічных, імуналагічных і марфалагічных метадаў.

Аднак, тут паўстае адна праблема, абумоўленая найперш морфа-функцыянальнай арганізацыяй саміх лёгкіх. Так, пры ўзяцці лёгкіх лабараторных жывёл для гісталагічнага даследвання лепшай лічыцца наступная працэдура [2]: пасля забой жывёлы (напрыклад, лабараторнага пацука шляхам перадазіроўкі эфірнага наркозу) спачатку робіцца перавязка трахеі (каб лёгкія не спаліся), ускрываецца грудная поласць, выдзяляюцца лёгкія, да трахеі падвязваецца груз і орган пагружаецца ў фіксатар (гл. *мал. 1*). Затым з лёгкіх выразаецца патрэбны кавалак, які далей заліваецца ў парафін.

Аднак, для біяхімічных даследванняў найчасцей забой пачынаецца з дэкапітацыі, адразу пасля якой за-



**Малюнак 1 — Фіксацыя тканак лёгкага (ілюстрацыя ўзята з [6], подпісы даданы)**

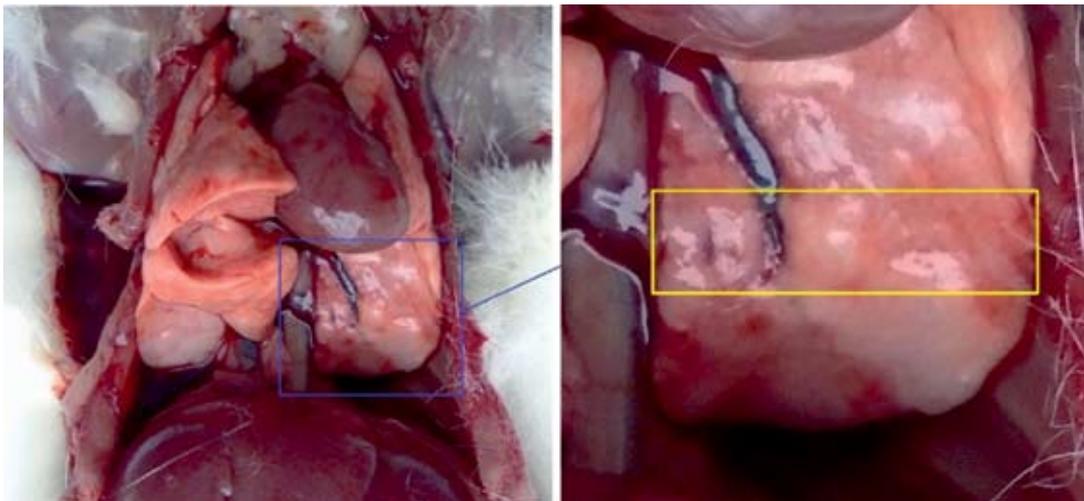
біраецца крывя. Затым ускрываюцца брушная поласць і грудная клетка, з якіх бяруцца органы для далейшага даследвання.

Такім чынам, ва ўмовах неабходнасці правядзення комплекснага біяхімічна-марфалагічнага даследвання ўплыву розных чыннікаў на лёгкія лабараторных жывёл і іх арганізм у цэлым паўстае супярэчнаць паміж пажаданымі для розных даследванняў метадыкамі забою.

Мэта данага даследвання заключалася ў выяўленні асаблівасцяў гісталагічнага вывучэння лёгкіх лабараторных пацукоў ва ўмовах спосабу забою жывёл, які адпавядае мэтам біяхімічных і імуналагічных даследванняў.

**Матэрыялы і метады даследвання.** У даследванні было выкарыстанана 20 пацукоў-самак пароды Вістар, масай 190-220 г, якія былі падзелены на дзве групы па 10 жывёл у кожнай. Адным жывёлам інтратрахеальна ўводзілі распушчаны ў фізіялагічным раствору NaCl ліпаполіцукарыд (*E. Coli* O55:B5) у дозе 1 мг/кг [5]. Іншыя пацукі заставаліся інтактнымі — кантрольная група.

• Праз 7 дзён усіх жывёл узважвалі і забівалі шляхам хуткай дэкапітацыі. Забіралі кроў для біяхімічнага і імуналагічнага даследванняў (у т.л. для падліку лейкацытарнай формулы крыві). Таксама забіралі і ўзважвалі тымус, селязёнку, лёгкія. Для гісталагічнага даследвання забіралі заднюю частку левага лёгкага (так, як паказана на *мал. 2*). Атрыманы кавалак органа фіксавалі ў сумесі фармалін-спірт-воцатная кіслата, прамывалі вадой і залівалі ў парафін па традыцыйнай метадыцы.

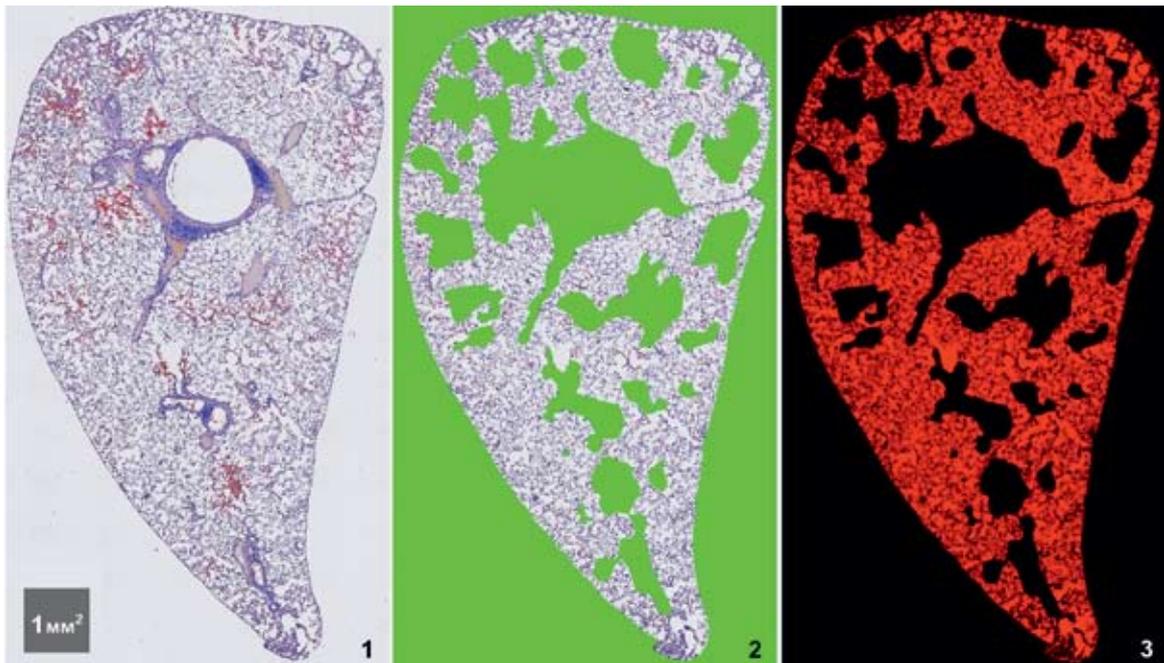


**Малюнак 2** — На левым фота пацук з выдаленай ніжняй часткай грудной клеткі. У паслядоўнасці зверху ўніз бачныя: тымус, сэрца, правае і левае лёгкія, долі печані, па цэнтры — хрыбет, прыкрыты цягліцамі. Фрагмент левага фота ў сіняй рамцы паказаны справа пры большым павелічэнні. Жоўтай рамкай паказаны кавалак лёгкага, які выразаўся для гісталагічнага даследвання

На мікратоме *Kedee KD-3398* атрымлівалі зрэзы ташчынёй 4,5 мкм, якія праходзілі ў франтальнай плоскасці (адносна цела пацука). Іх афарбоўвалі гематаксілінам ды эазінам і фатаграфавалі ў мікраскопе *Leica DM6 B*, выкарыстоўваючы аб'ектыў 10<sup>x</sup>. З некалькі дзясяткаў асобных фота атрымліваць адзіную панарамную выяву зрэза абранага кавалка органа.

З мэтай высветліць, у якой ступені памер плошчы зрэза лёгкіх мог быць абумоўлены спадзеннем лёгкіх, які адбываўся пасля ўскрыцця грудной клеткі жывёл, на атрыманых фотаздымках спачатку з дапамогай праграмы *Image-J* вымяралі агульную плошчу кожнага фота (гл. *мал. 3*, фота 1). Затым на фота выдалялі ўсе структуры, якія не датычылі чыстых альвеал — па вон-

кавым контуры выдалялі выявы бронхаў, крывяносных сасудаў, лімфоіднай і тлушчавай тканкі, групы альвеал, запоўненыя крывёй. Гэтыя ўчасткі, а таксама тэрыторыю фота за межамі вісцэральнай плеўры, запаўнялі зялёным колерам (мал. 3, фота 2) і затым вымяралі плошчу, занятую «зялёнымі пікселямі». Адняўшы ад першага паказчыка другі, атрымлівалі плошчу чыстых альвеал, прысутных на фота. Далей з дапамогай усё той жа праграмы *Image-J* ужо прасьветы альвеал на гэтай плошчы, запоўненыя паветрам, залівалі чырвоным колерам (мал. 3, фота 3) і вымяралі плошчу, занятую «чырвонымі пікселямі». Гэты паказчык супастаўлялі з папярэднім, каб атрымаць ключавы паказчык - адносную напоўненасць паветрам (у %) альвеалярнай часткі лёгкіх.



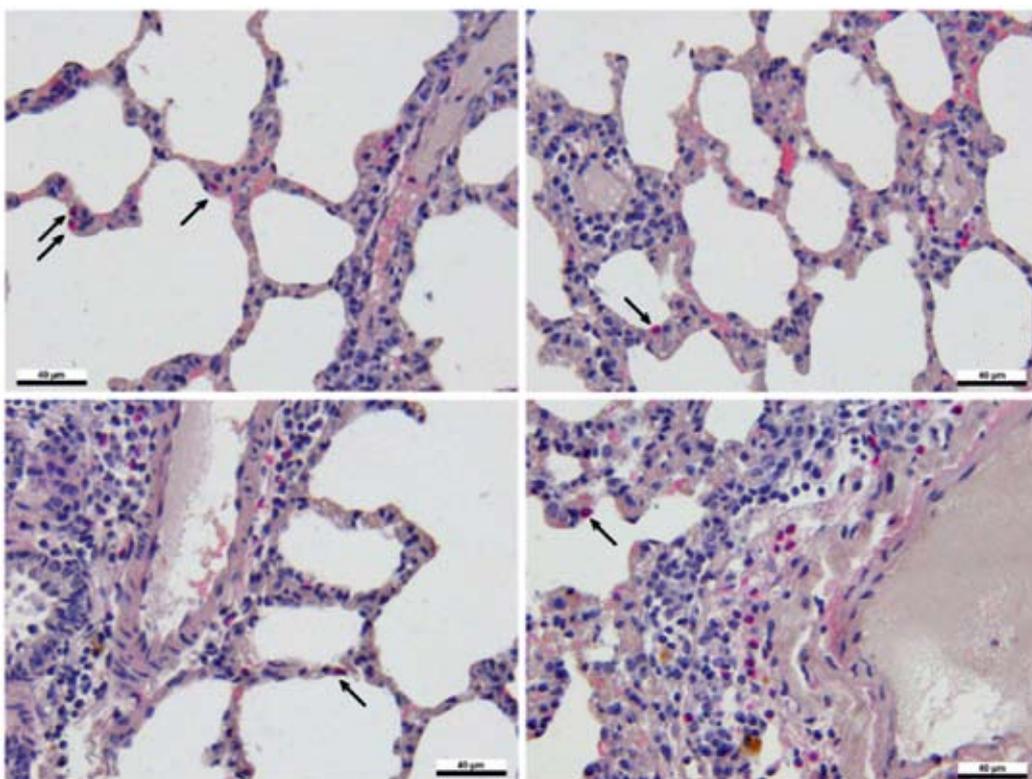
**Малюнак 3 — Стадыі апрацоўкі панарамнага фотаздымка зрэза лёгкага для колькаснай ацэнкі напоўненасці паветрам альвеалярнай часткі органа (дадатковыя тлумачэнні ў тэксце). Злева для маштабу размешчаны шэры квадрат плошчай 1 мм<sup>2</sup>**

На атрыманых панарамных фота з дапамогай праграмы *Image-Pro Plus* дадаткова вымяралі: плошчу тэрыторый на зрэзе органа з прыкметамі кровазліцця; плошчу прасвета галоўнага бронха і сумарную плошчу прасветаў 6 найбольшых бронхаў; плошчу, якую займалі лімфоідная і тлушчавая тканкі. З атрыманых абсалютных значэнняў дадаткова выводзілі адносныя - адносна плошчы зрэза ўзятага кавалка лёгкага.

У даным даследванні таксама была пастаўлена задача выявіць ступень напоўненасці лёгкіх гранулацытамі. Аднак першае ж вывучэнне прэпаратаў паказала, што ў лёгчай тканцы пацукоў, якія выкарыстоўваліся ў даным даследванні, колькасна пераважаюць эазінафільныя лейкоцыты. Даныя клеткавыя формы прысутнічалі як на тэрыторыі альвеал (там яны апыналіся пасля адносна нядаўняга выхаду з прасвету капіляраў і посткапілярных венул), так і звонку ад сценак адносна буйных крывяносных сасудаў ды бронхаў (гл. мал. 4). Для падліку «альвеалярнай» групы эазінафілаў выкарыстоўвалі аб'ектыў па лініі, якая праходзіла па доўгай восі зрэза лёгкіх, падлічвалі ўсе эазінафілы, якія знаходзіліся ў сценах альвеал. Для большай надзейнасці выяўлення даных клеткавых форм выкарыстоўвалі экран далучанага да мікраскопа кампутара, на якім падбіралі аптымальную яркасць, кантрастнасць і колерную насычанасць выявы аналізуемага зрэза.

Каб ацаніць колькасць эзінафілаў, якія знаходзіліся вакол сценак буйных крывяносных сасудаў, выкарыстоўвалі наступны морфаметрычны падыход: спачатку, выкарыстоўваючы аб.10х, фатаграфавалі 3-5 самых буйных сасудаў і з дапамогай праграмы *Image-J* вымяралі па вонкавым контуры іх сумарную плошчу (апошняя звычайна была ў межах 0,3 — 0,9 мм<sup>2</sup>); затым падлічвалі ўсе эзінафілы, якія знаходзіліся вакол сценак крывяносных сасудаў; а затым лічбы апошніх ператваралі так, каб яна адпавядала 1 мм<sup>2</sup> плошчы зрэза сасуда.

Усе колькасныя даныя апрацоўвалі (знаходзілі карэляцыйныя сувязі, вызначалі адрозненні паміж сярэднімі) з дапамогай статыстычнай праграмы *GraphPad Prism (Version 5.00)*. Вынікі падавалі ў выглядзе каэфіцыента карэляцыі ( $r$ ), а таксама як сярэдняе арыфметычнае  $\pm$  памылка сярэдняй ( $M \pm m$ ). Для ацэнкі даставернасці адрозненняў паміж сярэднімі выкарыстоўвалі няпарны  $t$ -тэст і тэст Мана-Уітні. Даставернымі лічылі адрозненні пры  $p < 0,05$ , атрыманыя па абодвух тэстах.



**Малюнак 4 — Эзінафільныя лейкоцыты двух лакалізацый — на тэрыторыі альвеол (пазначаны чорнымі стрэлкамі) і побач з крывяноснымі сасудамі розных памераў (без стрэлак). Для ўсіх фота, аб. 40<sup>x</sup>**

**Вынікі даследавання і іх абмеркаванне.** Першы феномен, які прымусіў звярнуць на сябе ўвагу, заключаўся ў істотнай розніцы цёмнасці/светласці тканак лёгкіх, залітых у парафін. Супастаўленне гэтай адзнакі са ступенню насычанасці лёгкіх крывёй, якая была бачна на гісталагічных зрэзах, прадэманстравала прапарцыйнасць паміж цёмнасцю тканак лёгкіх, залітых у парафін, і памерам кровазліцця ў іх (гл. *мал. 5*).

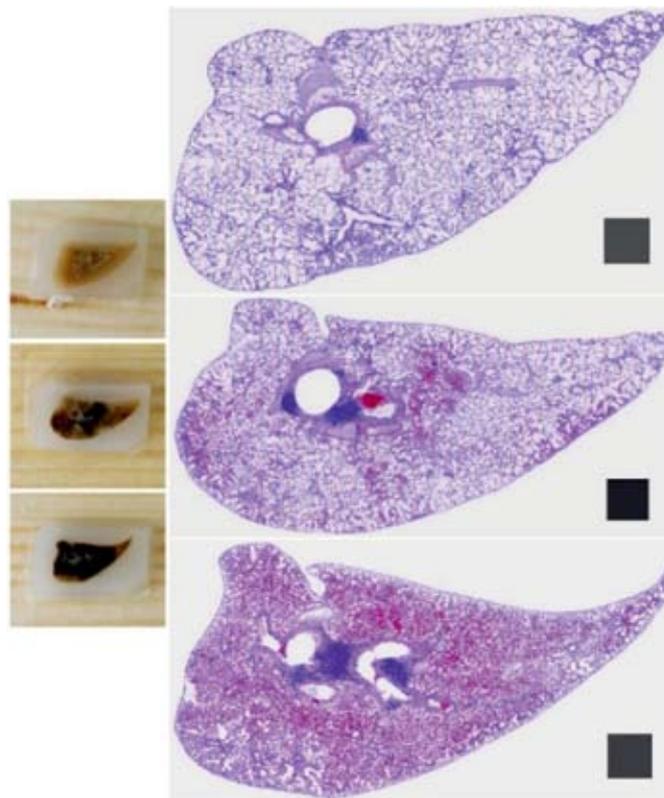
Гэтыя ды іншыя даныя адназначна сведчылі, што галоўнай прычынай, з-за якой тканкі лёгкіх выглядаюць больш цёмнымі ці светлымі, з'яўляецца ступень кровазліцця ў іх, якое адбываецца падчас забоя жывёл шляхам дэкапітацыі.

Феномен кровазліцця ў лёгкія немагчыма не ўлічваць, калі неабходна ацаніць ступень напоўненасці альвеол паветрам ці выявіць у альвеолярнай частцы органа, напрыклад, лейкоцы-

ты (*мал. 6*). Апошняя цяжка зрабіць у т.л. і з-за таго, што крывя акрамя эрытрацытаў прыносіць з сабой і лейкацыты.

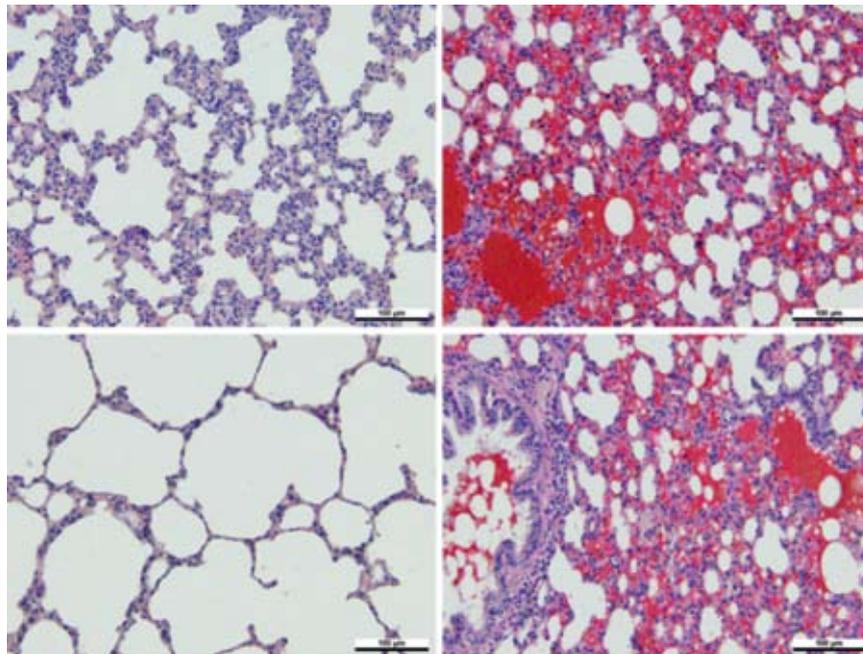
Уплыў на анатамічную і гісталагічную структуру лёгкіх лабараторных жывёл розных спа-сабаў іх забою ўжо вывучаўся [1]. Аўтары даследвання зрабілі выснову, што пры эўтаназіі розных відаў грызуноў і зайцападобных выкарыстанне вуглякіслага газу, а таксама прэпаратаў Ветафол, Залеціл і Ксіла, якія ўводзіліся як унутрывенна, так і ўнутрыбрушынна, вядзе да з'яўлення паталагічных змен у лёгкіх усіх даследваных жывёл. Пры гэтым пры выкарыстанні прэпаратаў Ветафол, а таксама камбінацыі прэпаратаў Залеціл і Ксіла назіраюцца атэлектаз, эмфізэма і гемарагіі, пры выкарыстанні вуглякіслага газу характэрным з'яўляюцца ацёк і гемарагіі ў тканкі лёгкіх. На жаль, у данае даследванне не было ўключана вывучэнне наступстваў, якія аказваюць на морфа-функцыянальную арганізацыю лёгкіх такія спосабы забою, як хуткая дэкапітацыя (тады можна было б параўнаць з нашымі вынікамі) і перадазіроўка эфірным нар-козам (пры якім можна спадзявацца на менш праяў кровазліцця).

Пры ўсіх недахопах выкарыстанага намі спосабу забою, такі паказчык, як адносная плош-ча зрэза альвелярнай часткі лёгкіх, занятая крывёй, якая выйшла з крывяноснага русла, можа мець і пазітыўнае значэнне — стаць дадатковым крытэрам у ацэнцы функцыянальнага стану лёгкіх. Так, у нашым выпадку аказалася, што лёгкія жывёл, якім удувалі ЛПЦ, мелі ў сярэднім у разы менш праяў кровазліцця, чым у кантрольнай групе (гл. *табл. 1*).



**Малюнак 5 — Тры кавалкі лёгкіх, залітыя ў парафін (злева), і тры панарамныя фота іх зрэзаў (справа) з рознай ступенню кровазліцця. Уверсе без праяў кровазліцця, у сярэдзіне — з ачагамі такога, унізе — з разлеглым кровазліццём у альвелярнай частцы органа. Бачна адпаведнасць паміж ступенню цёмнасці тканак і памерам кровазліцця ў іх. Цёмны квадрат плошчай 1 мм<sup>2</sup>**

Наступныя паказчыкі морфа-функцыянальнага стану лёгкіх, улічаныя ў нашым даследван-ні — плошча зрэза лёгкіх і ступень напоўненасці іх альвеал паветрам (гл. *мал. 7; табл. 1, 2*).



**Малюнак 6 — Альвеолярная частка лёгкіх з рознай ступенню напоўненасці паветрам (злева) і пасля кровазліцця (справа). Пры кровазліцці эрытрацыты запаўняюць як міжальвеолярныя прамежкі, так і прасветы альвеал. Бары — па 100 мкм**

**Табліца 1 — Марфаметрычныя адзнакі, якія характарызуюць стан лёгкіх**

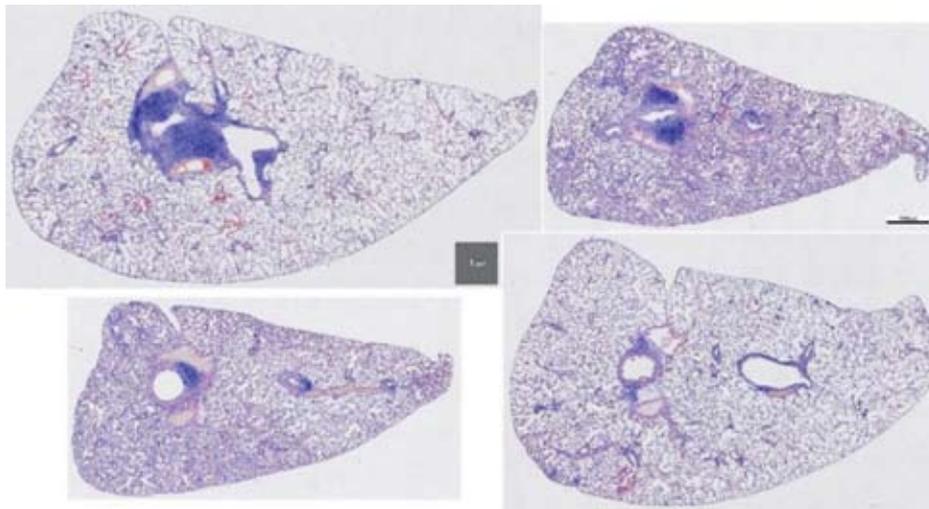
Група		Абсалютная плошча на зрэзе (мм <sup>2</sup> ):						Адносная плошча на зрэзе (%):					
		ўсяго зрэза	крово-зліцця	лім-фоіднай тканкі	прасвета га-лоўнага бронха	прасветаў 6 бронхаў	адзіпа-цытаў	крово-зліцця	лім-фоіднай тканкі	прасвета га-лоўнага бронха	прасвета ўсіх бронхаў	адзіпа-цытаў	
<b>К</b>	М ± m	38,0 ± 3,12	6,89 ± 2,315	0,32 ± 0,146	0,52 ± 0,071	1,15 ± 0,12	0,08 ± 0,028	19,0 ± 6,76	0,87 ± 0,375	1,51 ± 0,27	3,29 ± 0,51	0,20 ± 0,074	
		<b>ЛПЦ</b>	М ± m	30,0 ± 1,56	1,24 ± 0,57	0,704 ± 0,09	0,49 ± 0,115	0,89 ± 0,124	0,03 ± 0,014	3,60 ± 1,56	2,35 ± 0,28	1,54 ± 0,27	2,88 ± 0,27
	P <sub>1</sub>	0.0342	0.0293	0.0398	0.7902	0.1564	0.1003	0.0396	0.0054	0.9429	0.4828	0.2822	
	P <sub>2</sub>	0.0630	0.0246	0.0101	0.2799	0.1655	0.4436	0.0521	0.0068	0.9705	0.5787	0.5918	

Заўвага: P<sub>1</sub> і P<sub>2</sub> - даставернасць адрозненняў ад кантрольнай групы адпаведна па няпарным t-тэсце і тэсце Мана-Уітні.

Плошча зрэза лёгкіх у жывёл, якім ўдувалі ЛПЦ, аказалася на 21% і даставерна меншай, чым у кантролі (гл. **табл. 1**). Гэта магло быць абумоўлена як тым, што ў пацукоў данай групы артэфактна быў узяты меншы па памерах кавалак лёгкіх, так і тым, што мела месца большая ступень спадзення тканкі лёгкіх, якое адбывалася пасля ўскрыцця грудной поласці забітых жывёл (**мал. 7**).

У выніку праведзенага даследвання атрымалася, што альвеолярная частка лёгкіх у пацукоў, якім уводзілі ЛПЦ, сапраўды спадалася больш, чым у кантролі — праўда, на мяжы тэндэнцыі да даставернасці (гл. **табл. 2**).

Гэты паказчык, а таксама высокі каэфіцыент карэляцыі (r=0,85) паміж плошчай зрэза лёгкіх і ступенню напоўненасці паветрам іх альвеал (гл. **мал. 8**) сведчаць, што меншая, чым у кантролі, плошча зрэза лёгкіх у пацукоў, якім уводзілі ЛПЦ, у значнай ступені абумоўлена большай ступенню спадзення альвеолярнай часткі органа пасля ўскрыцця іх грудной клеткі.



**Малюнак 7 — Розная плошча зрэза і розная напоўненасць паветрам альвеол у лёгкіх чатырох пацукоў. Бачныя таксама розная ступень адкрытасці/закрытасці прасвету левага бронха (сціснутыя бронхі ўверсе, адкрытыя - ўнізе) і розніца ў колькасці размешчанай побач з ім лімфоіднай тканкі (шмат уверсе злева і мінімум справа ўнізе). Маштаб усіх фота аднолькавы (шэры квадрат у цэнтры — 1 мм<sup>2</sup>)**

**Табліца 2 — Дадатковыя марфаметрычныя адзнакі стана лёгкіх**

Група		Ступень напоўненасці альвеал паветрам (%)	Колькасць эзінафілаў, выяўленых на тэрыторыі альвеал	Колькасць эзінафілаў, выяўленых вакол сасудаў
<b>К</b>	M ± m	65,0 ± 4,54	52,0 ± 18,1	598 ± 170
<b>ЛПЦ</b>	M ± m	56,1 ± 2,75	68,6 ± 9,95	577 ± 76,8
	P <sub>1</sub>	0.1011	0.4089	0.9071
	P <sub>2</sub>	0.1220	0.1198	0.4967

Утрыманне лімфоіднай тканкі (як у абсалютных, так і адносных значэннях) у жывёл 1-й групы, наадварот, аказалася даставерна большым, чым у кантролі (*табл. 1*). Тады як такія паказчыкі, як прасвет бронхаў, аб'ём тлушчавай тканкі, колькасць «альвеалярных» і «ваколсасудзістых» эзінафілаў у лёгкіх усіх даследаваных жывёл істотна не адрозніваліся (*табл. 1, 2*).

На наша меркаванне найбольш інфарматыўнымі карэляцыйнымі сувязямі, выяўленымі паміж атрыманымі морфаметрычнымі адзнакамі, у дадатак да адзначаных раней, з'яўляюцца даставерныя станоўчыя сувязі паміж адноснай масай лёгкіх і плошчай іх зрэза ( $r = 0,56$ ), абсалютнай ступенню кровазліцця ў лёгкія і адкрытасцю прасвета іх бронхаў ( $r = 0,54$ ), абсалютнай ступенню кровазліцця і адноснай напоўненасцю альвеал паветрам ( $r = 0,55$ ), абезьвіюма групамі эзінафілаў ( $r = 0,83$ ). Між тым адносная напоўненасць альвеал паветрам аказалася адмоўна звязанай як з колькасцю эзінафілаў, выяўленых вакол сасудаў ( $r = -0,52$ ), так і з іх колькасцю на тэрыторыі альвеал ( $r = -0,54$ ).

**Заклучэнне.** Для лёгкіх пацукоў, забітых шляхам хуткай дэкапітацыі з наступным ускрыццём грудной клеткі без папярэдняй перавязкі трахеі, характэрным з'яўляецца большая ці меншая ступень кровазліцця ў альвеалярную частку органа, вар'іраванне ў напоўненасці паветрам альвеал, адкрытасці прасвету бронхаў.

Інгаляцыя ЛПС у дыхальныя шляхі пацукоў вядзе да: змяншэння праяў кровазліцця ў альвеалярную частку лёгкіх, якое адбываецца ў час дэкапітацыі; большай ступені спадзення альвел, якое адбываецца пасля ўскрыцця грудной клеткі; павелічэння аб'ёму лімфоіднай тканкі ў лёгкіх.

Такім чынам, некаторыя негатыўныя наступствы выкарыстаннага варыянту ўзяцця тканкі лёгкіх пацукоў для гісталагічнага даследвання (якія былі абумоўлены адаптацыяй да вырашэння прыярытэтных задач біяхімічнага даследвання) у даным выпадку былі часткова кампенсаваны атрыманнем дадатковых паказчыкаў, якія характарызавалі морфа-функцыянальных стан лёгкіх.

### Спіс літаратуры

1. Беляева, Е. В. Патоморфологическая диагностика легких при различных методах эвтаназии лабораторных животных / Е. В. Беляева [и др.] // Лабораторные животные для научных исследований. — 2018. — С. 3.
2. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой. 2-е изд. / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. — М.: Медицина, 1982. — 304 с.
3. Даценко, А. В. Морфометрические параметры воздушности легких лабораторных крыс при физических нагрузках / А. В. Даценко, В. И. Казьмин // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2015. — Т. 11, №4. — С. 645–649.
4. Gorbalenya, A.E. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 / A.E. Gorbalenya [et al.] // Nat Microbiol. — 2020. — №5. — P. 536–544.
5. Mu, E. Heparin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting nitric oxide synthase and TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway / E. Mu [et al.] // Thrombosis research. — 2012. — Vol. 129, №4. — P. 479–485.
6. Otani, S. Morphological characteristics of a rat model of reexpansion pulmonary edema / Otani S. [et al.] // Respirology. — 2017. — №22. — P. 149–150.
7. Toshiaki, I. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19 / Toshiaki I., J. Marie Connors, Jerrold H. Levy // T. Iba, J. M. Connors, J. H. Levy // Inflamm Res. — 2020. — Vol. 69, №12. — P. 1181–1189.
8. Yamamoto, Y. Morphology of aging lung in f344/nrat: alveolar size, connective tissue, and smooth muscle cell markers / Y. Yamamoto [et al.] // The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. — 2003. — Vol. 203, №2. — P. 538–547.

## FEATURES OF HISTOLOGICAL EXAMINATION OF THE LUNGS OF LABORATORY ANIMALS IN THE CONDITIONS OF PRIORITY OF BIOCHEMICAL RESEARCH

---

*Astrowski A.A., Tumanov A.V., Polubok V.Ch.,  
Marchik A.I., Baradzina T.A., Shlyahatun A.H.*

*Republican Scientific 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 shows that some negative consequences of such a variant of taking rat lung tissue for histological examination, which is adapted to the solution of priority tasks of biochemical research, can be partially compensated by obtaining additional indicators of the morpho-functional state of the lungs.*

## ДА ПЫТАННЯ ПРА АСНОЎНЫЯ МЕХАНІЗМЫ ЗАГОЙВАННЯ ПАЎНАСЛОЙНЫХ СКУРНЫХ РАН У ЛАБАРАТОРНЫХ ПАЦУКОЎ

*Бакуновіч А.А.<sup>1</sup>, Астроўская А.Б.<sup>2</sup>, Буко В.У.<sup>1</sup>, Ярашэнка Ю.У.<sup>1</sup>,  
Шатрова В.А.<sup>2</sup>, Меламед У.Д.<sup>2</sup>, Барадзіна Т.А.<sup>1</sup>, Астроўскі А.А.<sup>1</sup>*

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

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

**Рэзюмэ.** З дапамогай макра-, мікра- і ўльтрамікраскапічнага метадаў вывучаны асаблівасці загойвання паўнаслойнай скурнай раны ў лабараторных пацукоў. Высветлена, што ў ходзе данага працэсу ўтвараюцца дзве мяжы — адна па краі дэрмы, другая па краі эпідэрміса; што грануляцыйная тканка можа фарміравацца ў ране за кошт перабудовы падскурнай клятчаткі; што ў рэгенерацыі аднаўляецца падскурная эластычная праслойка. Вылучана гіпотэза, што ў ходзе кантракцыі міяфібрабласты могуць уцягваць калагенавыя валокны ўнутр цытаплазмы.

**Уводзіны.** У наш час у навуковых выданнях штогадова друкуюцца дзясяткі артыкулаў, прысвечаных праблеме стымуляцыі ці мадуляцыі загойвання паўнаслойных скурных ран (ПСР) з дапамогай разнастайных біялагічна актыўных рэчываў, пра што сведчаць даныя PubMed, ды іншых [5, 8, 9]. Адпаведныя працы ў большасці выпадкаў выконваюцца на лабараторных грызунах (часцей на мышах, пацуках). Аднак, істотнай праблемай з'яўляецца прысутнасць пэўных прабелаў у разуменні працэсу раназагойвання і правільнай інтэрпрэтацыі феноменаў ды механізмаў, якія яго забяспечваюць.

Так, у навуковых публікацыях часта немагчыма знайсці ўзгадак ці яснага тлумачэння, напрыклад, па наступных пытаннях: што лічыць мяжой раны; на грунце чаго ўтвараецца грануляцыйная тканка (ГТ); за кошт якіх клеткавых механізмаў адбываецца кантракцыя; ці аднаўляецца эластычная праслойка (ЭП), якая ў норме прысутнічае пад дэर्मальным слоём скуры.

Мы распрацавалі мадэль механічнай ПСР, зробленай у міжлапаткавай вобласці лабараторнага пацука і абароненай ахоўнай камерай. Мадэль прапануецца для даследвання ўплыву шырокага набору біялагічна актыўных чыннікаў на працэс рэгенерацыі данага пашкоджання. Пры гэтым рухавая актыўнасць і дыханне жывёл не парушаюцца, загойванне раны адбываецца ва ўмовах магчымасці штодзённых перавязак, фотадакументавання і атрымання колькасных даных, якія характарызуюць даны працэс.

На грунце мадэлі намі выканана комплекснае даследванне рэгенерацыі паўнаслойнага скурнага дэфекту (ПСД) з выкарыстаннем макраскапічнага, мікраскапічнага ды ўльтрамікраскапічнага метадаў, што дазволіла лепш зразумець некаторыя механізмы данай з'явы ў млекакормячых (і якія можна з пэўнымі абмежаваннямі экстрапаляваць на чалавека).

**Мэта даследвання:** на аснове выкарыстання распрацаванай намі мадэлі ПСР і вывучэння працэсу яе загойвання з дапамогай макраскапічнага, гісталагічнага і электронна-мікраскапічнага метадаў удакладніць ўяўленні, датычныя праблем межаў раны, крыніц фарміравання ГТ і механізмаў яе кантракцыі, значэння рэгенерацыі субдэर्मальнай ЭП.

**Матэрыялы і метады даследвання.** Даследаванне выканана на 38 пацуках-самках пароды Wistar, масай 230-280 г. Усе маніпуляцыі з імі, якія патрабавалі абязбольвання і абезрухомлівання, былі выкананы пад эфірным наркозам, што адпавядае ДАСТ 33215-2014, ДАСТ 33216-2014, а таксама ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика».

У першай групе жывёл (8 пацукоў) стваралі ПСД, абаронены ахоўнай камерай. Для гэтага ў пацукоў у міжлапаткавай вобласці выдалялі поўсць. 8-ю швамі падшывалі круглую ахоўную камеру дыяметрам 19 мм. На скуры, якая апыналася ўсярэдзіне камеры, выдалялі паўнаслойны скурны лоскут (ПСЛ) да падскурнай клятчаткі, якая станавілася дном раны. За кошт прысутнасці ў скуры сіл нацягнення плошча створанай раны звычайна аказвалася ў межах 120-150 мм<sup>2</sup>. Рану фатаграфавалі, закрывалі марлевымі дыскамі, на якія наносілі ізатанічны раствор хларыда натрыя. Зверху клалі марлевы тампон. Камеру зачынялі крышачкай. Праапераваных жывёл утрымлівалі ў індывідуальных клетках. Затым рабілі штосуткавыя перавязкі з фатаграфаваннем раны да поўнай яе эпідэрмізацыі.

Для знаходжання абсалютнай плошчы структур, прысутных на фота, карысталіся камп'ютарнай праграмай ImageJ. Статыстычную апрацоўку атрыманых колькасных даных праводзілі з дапамогай праграмы GraphPad Prism, Version 5.

Другая група пацукоў (24 шт.) была выкарыстана для гісталагічнага даследвання працэса загойвання раны, створанай апісаным вышэй спосабам. Пры гэтым у жывёл тканкі разам з падскурнай клятчаткай забіралі як непасрэдна пасля выдалення ПСЛ, так і праз 1, 3, 7, 11, 15 сутак. Дадаткова ў двух пацукоў з міжлапаткавай вобласці забіралі інтактную скуру. Участак памерам 5x15 мм у распраўленым стане фіксавалі ў сумесі фармалін-спірт-воцатная кіслата. Пасля прамыўкі, абязводжвання і заліўкі ў парафін атрымлівалі вертыкальныя зрэзы, таўшчынёй 5 мкм, якія праходзілі па сагітальнай лініі адносна цела пацука. Зрэзы афарбоўвалі гематаксілінам і эазінам, а таксама па Малоры. Іх вывучалі і фатаграфавалі з дапамогай мікраскопа Leica DM6-B.

Трэцюю групу жывёл (6 пацукоў) выкарысталі для электронна-мікраскапічнага (ЭМ) даследвання ЭП, а таксама для вывучэння клеткавага складу і міжклеткавага матрыксу рэгенерата праз 2 і 5 сутак пасля стварэння ПСД. Тканкі памерам каля 1x2x1 мм фіксавалі ў 1%-м осміевым фіксатары на 0.1 М буферы Мілоніга (рН 7.4) пры +4°C на працягу 2 гадзін. Затым іх абязводжвалі і залівалі ў аралдыт. На ўльтрамیکратоме Leica EM UC7 атрымлівалі ўльтратонкія зрэзы таўшчынёй каля 50 нм, якія кантрастравалі 2%-м раствором уранілацэтата на 50% метанале і цытратам свінца па Reynolds [3]. Прэпараты вывучалі ў электронным мікраскопе JEM-1011 (JEOL, Японія).

### **Вынікі даследавання і іх абмеркаванне.**

#### **Пра межы раны.**

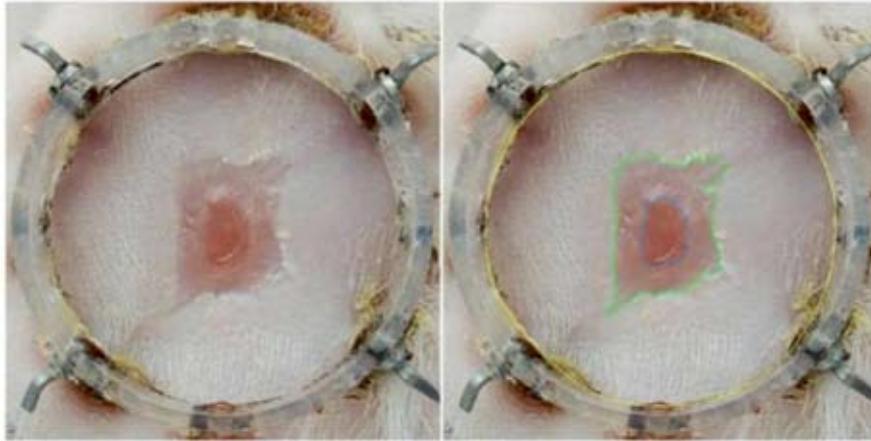
У большасці публікацый, у якіх ідзе гаворка пра плошчу раны, вымераную па пэўнай мяжы, і дынаміку працэсу раназагойвання, не агаворваецца, якая канкрэтна мяжа маецца на ўвазе.

Пры выкарыстанні нашай мадэлі з пэўнага часу (як правіла, праз 3-4 сутак пасля пашкоджання) станавілася добра бачна (нават макраскапічна), што пры апісанні працэсу загойвання ПСР пажадана ўзгадаць не адну, а дзве яе мяжы — тую, якая праходзіць па краі інтактнай дэрмы (Д), і тую, якую стварае край эпідэрміса (Э), які нарастае на ранавую паверхню (РП) (*мал. 1*).

Тое, што Э нарастае на ранавую паверхню, апярэджваючы Д, выразны бачна і на гісталагічных прэпаратах, зробленых ужо праз 2-3 сутак пасля стварэння ПСД. Пры гэтым Э расце ў выглядзе шматслойнай структуры па паверхні ГТ (гл. мал. 2), але, як правіла, пад напластаннямі фібрыну, тканавыя дэтрыту і ў атачэнні нейтрафільных гранулацытаў.

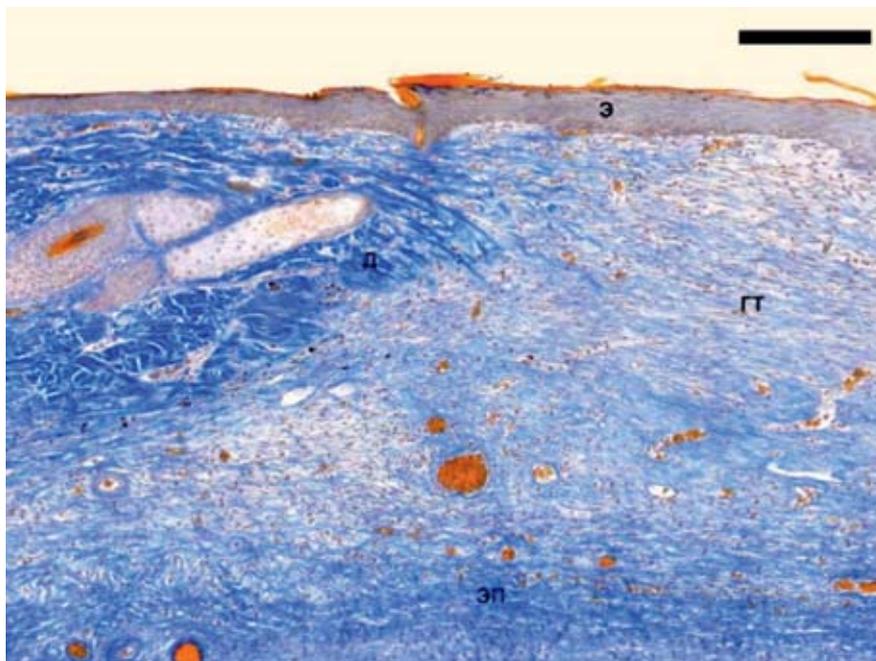
З улікам двух асноўных механізмаў раназагойвання — кантракцыі і эпідэрмізацыі — па апісанай вышэй метадыцы намі таксама была ахарактарызавана дынаміка данага працэсу. Ад-

паведныя крывыя прадеманстраваны на малюнку 3. Бачна, што адносная плошча раны (як участка скуры, на якім адсутнічае дэрма; сіняя лінія) першыя двое сутак не памяншалася (паколькі ішлі дэструктыўна-альтэратыўныя працэсы, абумоўленыя посттраўматычным запаленнем), у інтэрвале 3-4 сутак пасля пашкоджання РП пачала скарачацца, у інтэрвале 4-10 сутак гэтае скарачэнне было вельмі хуткім, а затым зноў марудным.



**Малюнак 1 — Прыклад ПСР, 10 сут. пасля пашкоджання.**

На фота злева бачна сценка ахоўнай камеры, інтактная скура і РП, часткова пакрытая Э. Справа тое ж фота пасля правядзення ліній па адпаведных межах: жоўтая лінія пазначае ніжні ўнутраны край ахоўнай камеры (дае маштаб для наступных вямярэнняў); зялёная лінія абмяжоўвае плошчу раны, на якой адсутнічае Д; сіняя лінія — частку ранавай паверхні, на якой адсутнічаюць і Д, і Э. Тэрыторыя паміж зялёнай і сіняй лініямі адпавядае плошчы Э, якія нараю на рану

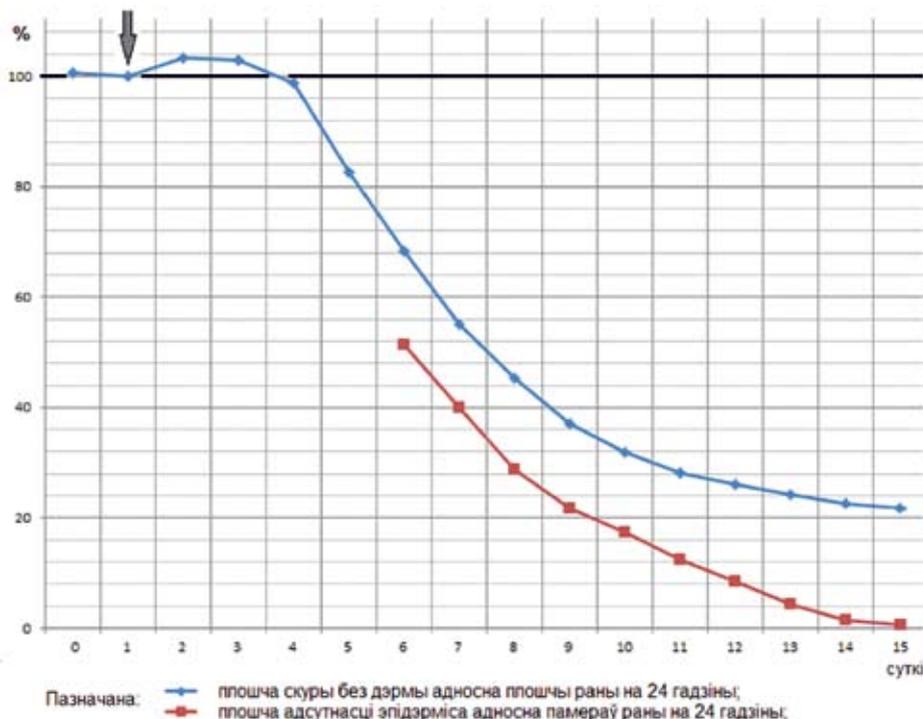


**Малюнак 2 — Вертыкальны зрэз скуры ў вобласці ПСР праз 7 сутак пасля пашкоджання. Бачна, што Э нарастае на РП. Скарачэннямі ГТ, Д (край дэрмы), Э, ЭП пазначаны тыя ж структуры, што і ў тэксце. Празрыстымі стрэлкамі пазначаны буйныя вены, чорнымі стрэлкамі больш дробныя вертыкальныя сасуды.**

**Афарбоўка: па Маллары; бар — 200 мкм**

Другую площчу раны (як частку РП, якая была і без Д, і без Э; карычневая лінія) мы вымяралі праз 6 сутак пасля пашкоджання, паколькі на працягу першых сутак край Э цяжка вызначыць дакладна (бо Э у гэты час вельмі тонкі і падростае пад тонкі ранаваы струп). На графіку бачна, што ў інтэрвале 6-10 сутак площча раны, дзе не было Э, скарачалася дастаткова хутка, пазней менш актыўна.

РП цалкам закрылася эпідэрмісам у раёне 15 сутак пасля пашкоджання.



**Малюнак 3 — Крывыя, якія дэманструюць дынаміку змены ключавых морфаметрычных паказчыкаў у працэсе раназагойвання (значэнне кожнай з крывых гл. пад графікамі; паказчыкі суаднесены з плошчай ПСД праз 1 суткі пасля пашкоджання)**

На графіку таксама бачна, што ва ўмовах нашай мадэлі на момант завяршэння эпідэрмізацыі РП кантракцыя забяспечыла скарачэнне памераў раны на, прыкладна, 80%, а 20% зыходнай РП былі закрыты за кошт эпідэрмізацыі.

Такім чынам, апісваючы працэс загойвання ПСД, трэба сапраўды ўлічваць існаванне дзвюх межаў раны: паміж інтактанай скурай і рэгенератам, а таксама паміж РП закрытай і незакрытай Э. Змена плошчаў раны ў даных межах характарызуе два ключавыя механізмы раназагойвання — кантракцыю і краявую эпідэрмізацыю.

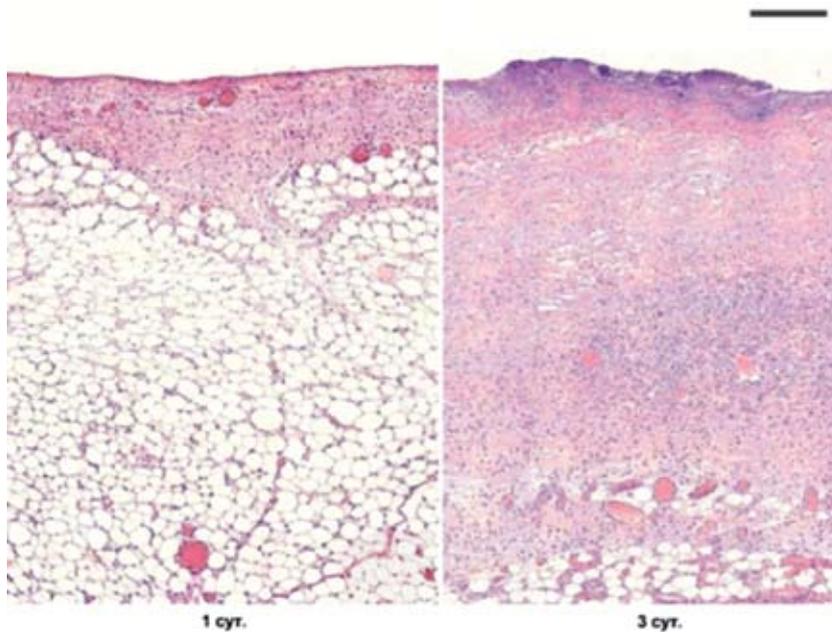
#### **Пра крыніцы ўтварэння ГТ на месцы ПСД.**

Многія даследчыкі, якія апісваюць фарміраванне ГТ, у тым ліку ў вобласці ПСД, лічаць, што яна ўтвараецца за кошт перабудовы фібрыну, які адкладаецца на РП у выніку эксудацыі [10, 13].

Такі механізм утварэння ГТ, напэўна, магчымы, але ва ўмовах нашай мадэлі больш абгрунтаваным, на наша меркаванне, выглядае фарміраванне большай часткі ГТ шляхам перабудовы падскурнай клятчаткі (ПК). У падтрымку апошняга працэсу найперш сведчыць тое, што вялікі аб'ём гэтай тканкі з'яўляўся вельмі хутка (*мал. 4*), а таксама тое, што ў складзе маладой ГТ часта заставаліся астраўкі адзіпацытаў.

Дадатковыя доказы магчымасці ўтварэння ГТ на месцы ПК былі атрыманы ў выніку электронна-мікраскапічнага даследавання. Так, ужо праз двое сутак з моманту ранення адзіпацыты, якія знаходзіліся непасрэдна пад паверхняй раны, пачыналі спадацца, іх цытаплазма павялічвала свой аб'ём, у ёй побач з вялікай кропляў тлушчу з'яўляліся шматлікія дробныя ліпідныя кропелькі, адзеленыя адна ад адной тонкімі праслойкамі цытаплазмы (*мал. 5*). Аднак, даныя клеткі ў цэлым захоўвалі сваю жыццяздольнасць і самастойна рабілі адзначаныя пераўтварэнні. Побач з адзіпацытамі часта знаходзіліся асобныя свабодныя кроплі тлушчу, якія паглыналіся макрафагамі. Адзіпацыты з прыкметамі ліполізу выяўляліся ў больш глыбокіх пластах ГТ і праз 5 сутак пасля пашкоджання (*мал. 6*; дарэчы, на гэтым малюнку бачна, што па перыметры ліпідных кропель знаходзіцца шмат чорных кропак; згодна з літаратурнымі данымі, на мяжы ліпіднай кроплі знаходзяцца бялкі перыліпіны, якія дазваляюць ліпазам пачаць ліполіз) [4]. Многія фібрабласты ў гэты час мелі ў сваёй цытаплазме вялікую колькасць ліпідных уключэнняў.

Дадзеныя факты адпавядаюць гіпотэзе, што частка фібрабластаў ГТ можа ўтварацца шляхам ператварэння адзіпацытаў, у выніку чаго ГТ і ўтвараецца на месцы былой падскурнай клятчаткі.



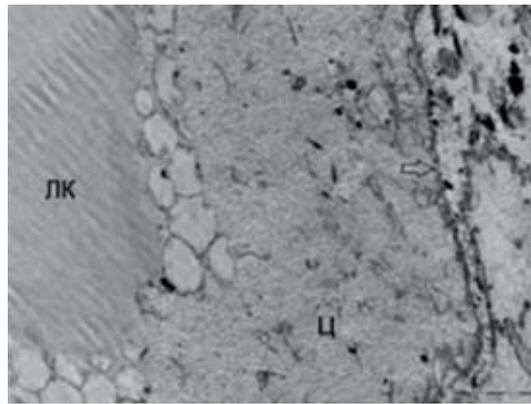
**Малюнак 4 — Агульны выгляд тканак пад ранавай паверхняй праз адны і тры суткі пасля пашкоджання. Бачна, што праз суткі пасля выдалення ПСЛ пад ранавай паверхняй па-ранейшаму знаходзілася тлушчавая тканка, а яшчэ праз два дні там ужо часта прысутнічае маладая ГТ. Гематаксілін і эазін, бар — 200 мкм**

Як высветлілася, даная гіпотэза ўпершыню была вылучана яшчэ ў канцы ХХ ст. [1]. У нашы дні яна знайшла бліскучае пацверджанне ў працах іншых навукоўцаў, якія выкарыстоўвалі самыя сучасныя метады даследавання [7, 11, 15, 12].

Такім чынам, стварэнне ГТ на месцы ПК (у адрозненне ад «фібрынавай гіпотэзы») сёння сапраўды можна лічыць асноўным механізмам з'яўлення ГТ у ране.

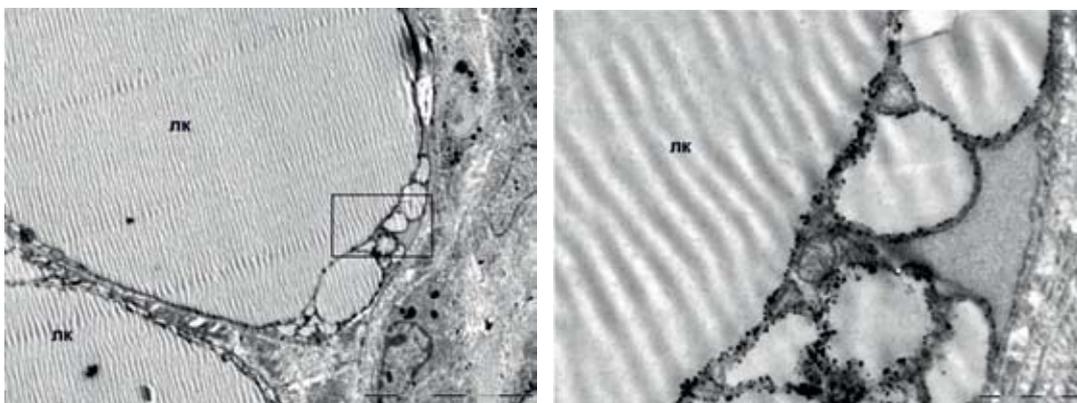
#### **Пра механізмы кантракцыі раны.**

ГТ у складзе рэгенерата, сфармаванага на месцы ПСД, выконвае часовую замяшчальную функцыю. Спачатку ў ёй прысутнічае мала калагена, аднак функцыя фібрабластаў вядзе да яго хуткага назапашвання ў наступныя суткі, што асабліва добра бачна ў прэпаратах, афарбаваных па Малоры (*мал. 7*).

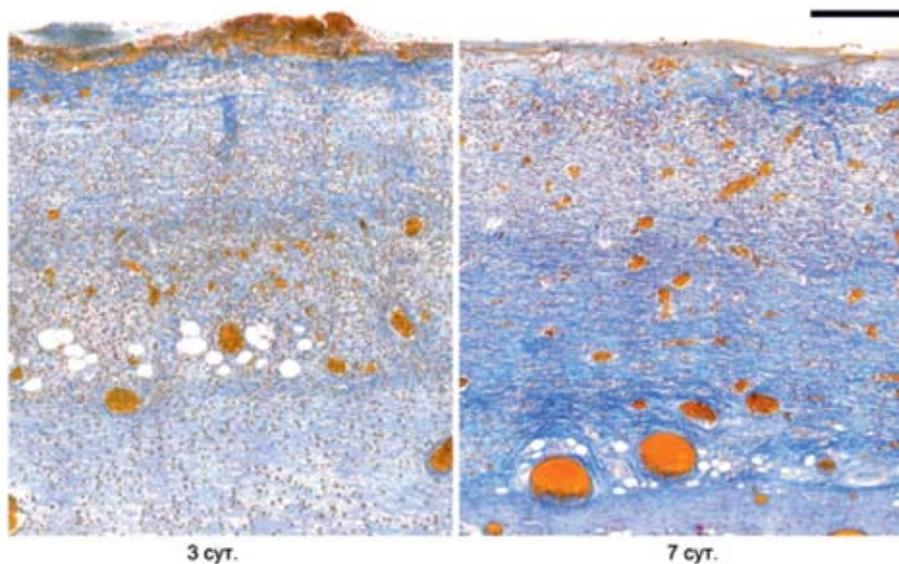


**Малюнак 5 — Адзіпацыт праз 2 сутак пасля стварэння ПСД.**

У клетцы назіраецца павелічэнне аб'ёму цытаплазмы, аддзяленне шматлікіх дробных кропелек тлушчу ад асноўнай ліпіднай кроплі. Пазначана: ЛК — ліпідная кропля, Ц — цытаплазма адзіпацыта, стрэлкай пазначана цытаплазматычная мембрана клеткі, за якой знаходзіцца базальная мембрана



**Малюнак 6 — Адзіпацыт праз 5 сутак пасля пашкоджання. ЛК — ліпідная кропля**

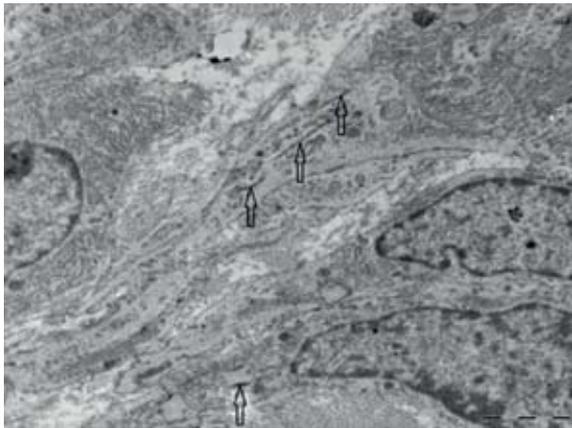


**Малюнак 7 — Выгляд ГТ у цэнтры раны праз 3 і 11 сут. пасля пашкоджання.**

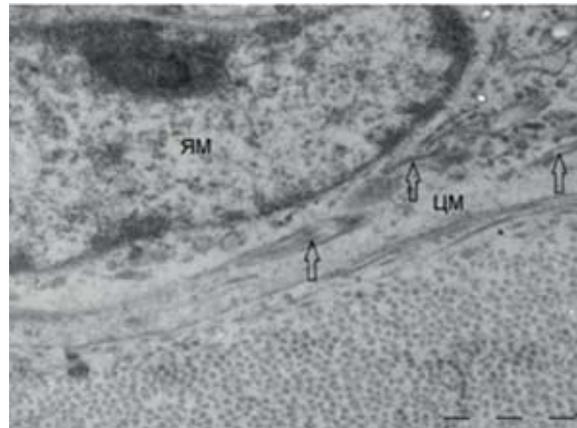
Бачна, што калагена ў ране (сіні колер) праз тыдзень пасля траўмы больш, чым праз 3 сутак. Пры гэтым ён размяшчаецца пераважна ў ніжняй палове ГТ. Афарбоўка па Малоры

Сетка калагенавых валокнаў (КВ) у ГТ становіцца асновай, якая дазваляе міяфібраблэстам (МФБ) забяспечыць скарачэнне плошчы дэфекта скуры за кошт кантракцыі [2]. Згодна з меркаваннямі шэрагу навукоўцаў [6], працэс кантракцыі ранавай тканкі адбываецца за кошт таго, што акцінавыя валокны, якія знаходзяцца ў цытаплазме МФБ, праз пасрэдніцтва размешчаных у іх мембране комплексаў адгезіі фібранексуса прымацоўваюцца да КВ. Потым, скарачаючы даўжыню акцінавых фібрыл унутры сябе, МФБ сцягваюць КВ вакол сябе, што і выклікае эфект скарачэння памераў ГТ. Атрымліваецца, што ў ходзе кантракцыі КВ заўсёды знаходзяцца звонку ад МФБ і не трапляюць у яго цытаплазму.

Але намі ў ходзе ЭМ-даследвання ГТ, прысутнай у вобласці раны праз 5 сутак пасля пашкоджання (час найбольш актыўнай кантракцыі — гл. мал. 3), было выяўлена шмат МФБ, у цытаплазме якіх на тэрыторыі акцінавых фібрыл прысутнічалі аточаныя мембранай КВ (гл. мал. 8, 9).



**Малюнак 8 — Тры МФБ з КВ у цытаплазме. Празрыстыя стрэлкі паказваюць на КВ**



**Малюнак 9 — Яшчэ адзін МФБ з КВ у цытаплазме. Стрэлка злева паказвае на два КВ пад адной мембранай**

Адзначаны феномен дае права вылучыць гіпотэзу, што кантракцыя раны забяспечваецца не толькі сцягваннем КВ МФБамі вакол сябе, а і за кошт далейшага ўцягвання іх унутр цытаплазмы даных клетак з наступнай іх дэградацыяй.

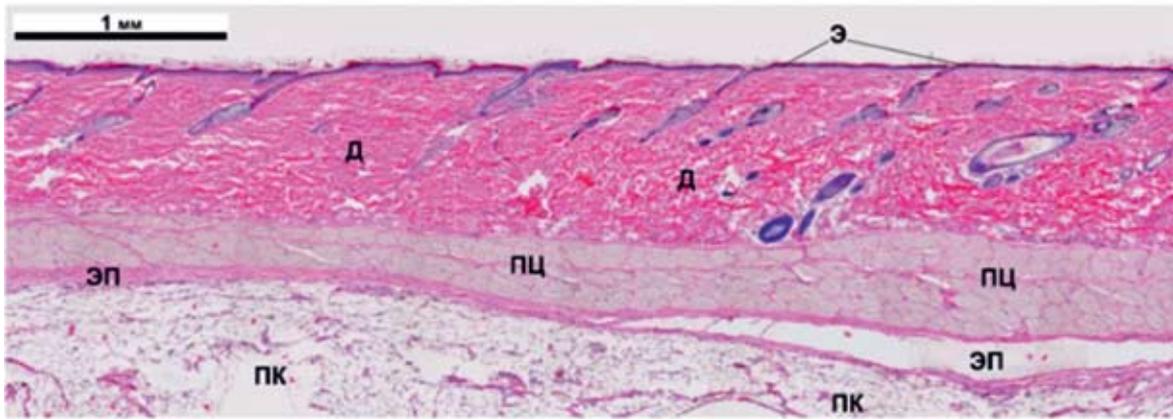
Магчыма, мы не першыя, хто выказвае падобную гіпотэзу, але ў выніку праведзенага літаратурнага пошуку нам не атрымалася знайсці апісання падобнага механізму кантракцыі. Важнасць пытання патрабуе яго далейшага даследвання.

#### **Пра эластычную праслойку.**

У лабараторных пацукоў паміж падскурнай цягліцай і ПК знаходзіцца ЭП. У ёй КВ танчэйшыя, чым у дэрме, размешчаны значна больш рыхла, што бачна нават на гісталагічным зрэзе (мал. 10). Такі ж эластычны пласт знаходзіцца і ў скуры чалавека [14]. Аўтары даследвання ўказваюць, што КВ ў ім таксама больш тонкія і размеркаваны ў выглядзе рыхлай сеткі.

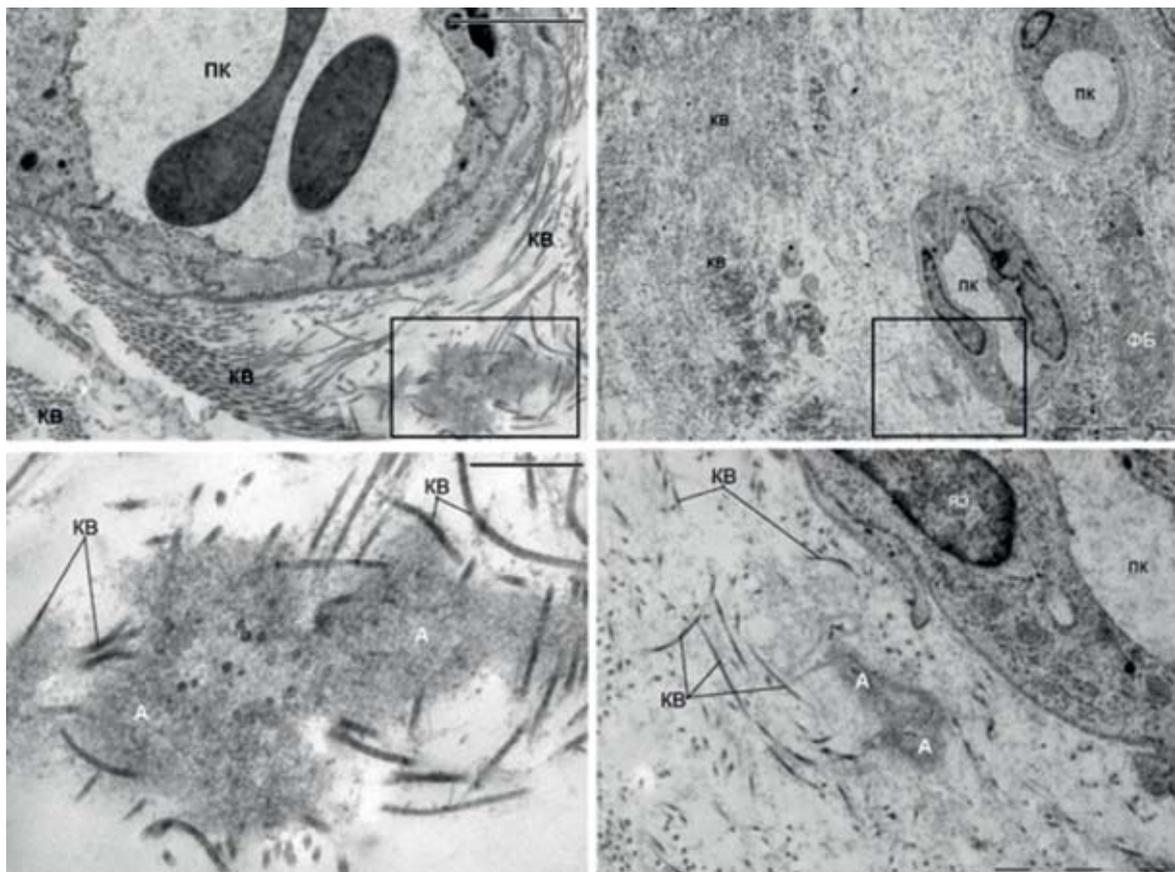
Пры ЭМ-вывучэнні ЭП ў інтактнай скуры лабараторных пацукоў намі было выяўлена, што вышэй адзначаныя ўласцівасці калагенавай сеткі сапраўды маюць месца. Дадаткова былі выяўлены эластычныя валокны, якія складаюцца са значна больш тонкіх, чым калагенавыя, аксіталанавых валокнаў, часта структурна звязаных з эластынам (мал. 11)

Для ўзяцця тканак з вобласці ПСД для гісталагічнага даследвання ў першыя тры сутак пасля пашкоджання даводзіцца браць тканкі ў вобласці пашкоджання разам з ПК, паколькі ЭП яшчэ адсутнічае. Але, калі пасля пашкоджання прайшло 5 і больш сутак, забор тканак значна палягчаецца, паколькі ГТ і скура вакол яе лёгка аддзяляюцца ад ПК за кошт таго, што ЭП ужо бывае адноўлена.



**Малюнак 10** — Будова скуры ў міжлапаткавай вобласці пацукоў. Зверху ўніз ідуць: Э, Д з валасянымі фалікуламі і сальнымі залозамі, падскурная цягліца (ПЦ), ЭП і ПК. Пры выдаленні ПСЛ для стварэння ПСР расшчапленне скуры адбываецца пераважна па ходу ЭП (гл. шчыліну ў ЭП справа)

ЭМ-даследаванне тканак з вобласці пашкодвання праз 5 сутак пасля стварэння ПСР пац-варджае рэгенерацыю ЭП, якая пазнаецца па прысутнасці рыхла размеркаваных КВ, сярод якіх сустракаюцца эластычныя валокны (мал. 11).



**Малюнак 11** — Злева ЭМ-фатаздымак папярочнага зрэза эластычнага валакна ў інтактнай скуры (пад падскурнай цягліцай), якое знаходзіцца побач з капілярам і КВ. Справа — ЭМ-фатаграфія з глыбокіх пластоў тканак (пад ГТ) праз 5 сутак пасля стварэння ПСД. Пазначана: А — эластынавыя масы ў складзе эластычных валокнаў, КВ — калагенавыя валокны, ПК — прасвет капіляра, ЯЭ — ядро эндатэліяцыта, ФБ — фібраблест, Бар — 500 нм

Такім чынам, прысутнасць ЭП разам з Э і ГТ ў скаладзе скурнага рэгенерата, які ўтвараецца на месцы ПСД, з'яўляецца абавязковай умовай паўнаўдаснай рэгенерацыі скуры. Таму аднаўленне ЭП павінна ўлічвацца і агаворвацца пры апісанні ходу загойвання ПСР ў млекакормячых і чалавека.

**Заклучэнне.** Праведзенае даследаванне дазволіла знайсці адказ на істотныя пытанні, датычныя асноўных феноменаў і механізмаў, якія забяспечваюць рэгенерацыю ПСД. Было высветлена, што пры апісанні і марфаметрыі данага працэсу трэба ўлічваць і агаворваць две мяжы раны — адна з іх праходзіць па краі Д, другая — па краі Э. Што да крыніцы паходжання ГТ на месцы ПСД, даследаванне дазволіла заключыць, што галоўным месцам яе стварэння з'яўляюцца не столькі напластаванні фібрыну, колькі ПК, якая перабудоўваецца ў ГТ. Рэгулярная прысутнасць КВ у цытаплазме МФБ у перыяд максімальнай кантракцыі раны дазваляе прапанаваць гіпотэзу, што МФБ не толькі сцягваюць КВ, якія застаюцца звонку ад даных клетак, а і ўцягваюць іх унутр цытаплазмы. Высветлена, што ЭП, якая ў норме прысутнічае ў інтактнай скуры лабараторных жывёл і людзей, з'яўляецца істотнай часткай скуры, якая абавязкова аднаўляецца (разам з утварэннем ГТ і нарастаннем на рану Э) у час загойвання раны.

Усё адзначанае прапануецца ўлічваць пры інтэрпрэтацыі вынікаў адпаведных навуковых даследаванняў.

### Спіс літаратуры

1. Andrade, Z. A. Interrelationship between adipocytes and fibroblasts during acute damage to the subcutaneous adipose tissue of rats: an ultrastructural study / Z. A. Andrade, J. de-Oliveira-Filho, A. L. M. Fernandes // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. — 1998. — Vol. 31, № 5. — P. 659–664.
2. Chitturi, R. T. The role of myofibroblasts in wound healing, contraction and its clinical implications in cleft palate repair / R. T. Chitturi [et al.] // *Journal of international oral health: JIOH*. — 2015. — Vol. 7, № 3. — P. 75–80.
3. Fixation, degydration and embedding of biological specimens. In: *Practical Methods in Electron Microscopy*. // 1975. — V.3. — part 1. Glauert A.M. (ed). American Elsevier, New York.
4. Heid, H. Formation and degradation of lipid droplets in human adipocytes and the expression of aldehyde oxidase (AOX) / H. Heid [et al.] // *Cell Tissue Res*. — 2020. — № 379. — P. 890–900.
5. Ignacio, G. Animal models for wound healing / G. Ignacio, I. El-Amin, V. Mendenhall // *Skin tissue engineering and regenerative medicine*. — 2016. — New York, 2016. — Ch. 19 — 387–400.
6. Kadler, K. E. Fell muir lecture: collagen fibril formation in vitro and in vivo / K. E. Kadler // *International journal of experimental pathology*. — 2017. — Vol. 98, № 1. — P. 4–16.
7. Mascharak, S. Fibroblast Heterogeneity in Wound Healing: Hurdles to Clinical Translation / S. Mascharak, H. E. desJardins-Park, M. T. Longaker // *Trends in molecular medicine*. — 2020. — Vol. 26., № 12. — P. 1101–1106.
8. Parnell, L. The Evolution of Animal Models in Wound Healing Research: 1993-2017 / L. Parnell, S. W. Volk // *Advances in wound care*. — 2019. — Vol. 8, № 12. — P. 692–702.
9. Perez, R. Relevance of animal models for wound healing / R. Perez, S. C. Davis // *Wounds: a compendium of clinical research and practice*. — 2008. — Vol. 20, № 1. — P. 3–8.
10. Rousselle, P. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies / P. Rousselle, F. Braye, G. Dayan // *Advanced drug delivery reviews*. — 2019. — № 146. — P. 344–365.

11. Shook, B. A. Dermal adipocyte lipolysis and myofibroblast conversion are required for efficient skin repair / B. A. Shook [et al.] // *Cell Stem Cell*. — 2020. — Vol. 26, №6. — P. 880-895.
12. Toyosaki, M. Dermal fibroblast-like cells reprogrammed directly from adipocytes in mouse / M. Toyosaki [et al.] // *Sci Rep*. — 2020. — Vol. 10, №1. — P. 1–9.
13. Werner, S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // *Physiological reviews*. — 2003. — Vol. 83, №3. — P. 835–870.
14. Wong, R. The dynamic anatomy and patterning of skin / R. Wong [et al.] // *Experimental Dermatology*. — 2016. — Vol. 25, №2. — P. 92–98.
15. Zhou, Z. Adipose extracellular matrix promotes skin wound healing by inducing the differentiation of adipose-derived stem cells into fibroblasts / Z. Zhou [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. — 2019. — №43. — P. 890–900.

## ON THE QUESTION OF THE MAIN MECHANISMS OF HEALING OF FULL-LAYER SKIN WOUNDS IN LABORATORY RATS

---

***Bakunovich A.A.<sup>1</sup>, Astrovskaja A.V.<sup>2</sup>, Buko V.U.<sup>1</sup>, Yarashenka Y.V.<sup>1</sup>,  
Shatrova V.O.<sup>2</sup>, Melamed V.D.<sup>2</sup>, Baradzina T.A.<sup>1</sup>, Astrowski A.A.<sup>1</sup>***

*<sup>1</sup>Republican Scientific Research Unitary Enterprise  
«Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy  
of Sciences of Belarus», Grodna, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>Grodna State Medical University, Grodna, Republic of Belarus*

**Summary.** *Using macro-, micro - and submicroscopic techniques were studied features of the healing of full-thickness skin wounds in laboratory rats. It was found that during this process, two borders are formed — one on the edge of the dermis, the second on the edge of the epidermis; that granulation tissue can be formed in the wound due to the restructuring of subcutaneous tissue; that the subcutaneous elastic layer is restored in the regenerate. It is hypothesized that during the contraction, myofibroblasts can draw collagen fibers into the cytoplasm.*

## ОЦЕНКА ГОМОЛОГИИ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗА ЧЕЛОВЕКА И ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ

---

*Балаева-Тихомирова О.М., Долматова В.В., Семенов И.О., Чиркин А.А.*

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

**Резюме.** У человека и моллюсков гомология ферментов нерегулируемого протеолиза составляет 66–69 %, регулируемого протеолиза — 69–76 %, пуринового обмена — 64–68 %, убиквитин-протеасомного пути — 78–83 %, убиквитина — 79–81 % у *Biomphalaria glabrata* и 80–84 % у *Lymnaea stagnalis*. Подтвержден эволюционный консерватизм протеолитических ферментов, что позволяет использовать ткани легочных пресноводных моллюсков как источник ферментов для биофармации, косметики и пищевой промышленности.

**Введение.** Протеолиз является одним из универсальных биохимических механизмов регуляции биосистем организма [8]. Это фундаментальный процесс в организме животных, который обеспечивает распад белков для пополнения аминокислотного фонда клеток, участвует в процессах роста, деления и их гибели. Во многих случаях протеазы являются триггерами каскадных процессов. При этом ферменты выполняют функции не только сигнала к запуску процесса, но и усилителя этого сигнала, а также участвуют в сопряжении многих физиологических процессов [7]. Во всех тканях живых организмов большинство внутриклеточных белков деградируют с помощью убиквитин (*Ubiquitin, Ub*)-протеасомного пути (UPP). Этот регулируемый тип протеолиза играет наиболее важную роль в сигналинге клеток [1–4]. Поскольку протеазы выполняют разнообразные функции в жизнедеятельности практически всех организмов, в их кодировании участвуют до 5 % всех генов из геномов живых организмов. Внеклеточные белки и некоторые белки поверхности клетки поглощаются эндоцитозом и деградируют в лизосомах. Некоторые цитозольные белки деградируют в лизосомах после поглощения в аутофагических везикулах, которые сливаются с лизосомами. Известна также шаперон-зависимая аутофагия, при которой происходит направленный транспорт частично денатурированных белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в ее полость. Особый интерес представляют процессы отмены действия многочисленных регуляторных белков системы внутриклеточного сигналинга посредством убиквитин-протеасомного пути [1]. Деградация белков по убиквитин-зависимому пути включает в себя два этапа — ковалентное присоединение к субстрату полиубиквитиновой цепочки и деградацию помеченного белка 26S протеасомой с высвобождением свободного убиквитина [1, 2]. После открытия убиквитина было найдено несколько родственных белков, которые группируются на 2 семейства: белки с убиквитин-подобным доменом (*UDP*) и убиквитин-подобные модификаторы (*Ubl*). Последние не только гомологичны убиквитину по аминокислотной последовательности и пространственной структуре, но и имеют С-концевой остаток Gly, при помощи которого они могут формировать конъюгаты с белками [1].

Целью данной работы явился сравнительный анализ степени гомологии протеолитических ферментов у человека и легочных пресноводных моллюсков. В качестве последних были из-

браны широко распространенные в водоемах Европы моллюски — *Planorbarius corneus* (кагушка роговая) и *Lymnae astagnalis* (прудовик обыкновенный), ближайшим родственником которых является достаточно хорошо изученный моллюск *Biomphalaria glabrata* [5].

**Материалы и методы исследования.** Поиск и отбор нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки человека, осуществляли на сервере <https://www.ensembl.org>; поиск гомологичных последовательностей для моллюсков производили на сервере <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> при помощи ресурса BLAST; описание белков для человека было взято с ресурса <https://www.uniprot.org>; парное выравнивание и сравнение последовательностей человека и моллюсков выполнено в программе MEGA5.2. В работе использован следующий алгоритм: поиск нуклеотидной последовательности → построение аминокислотных последовательностей сравниваемых белков → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур. Исследование мотивов и строения активных центров ферментов не входило в задачи данной работы.

Для анализа использованы следующие ферменты нерегулируемого протеолиза — Prolyloligopeptidase, Furin, SignalPeptidePeptidase, Aminopeptidase B, Leucylaminopeptidases (cytosolaminopeptidase), Thimetoligopeptidases и регулируемого протеолиза (убиквитин-протеасомного пути) — Ubiquitinconjugatingfactor E4 B-like, Ubiquitinconjugatingfactor E2 W-like, Ubiquitincarboxyl-terminalhydrolase L5, Ubiquitin-likemodifier-activatingenzyme 5, а также убиквитин-подобные модификаторы — SUMO (Smallubiquitin-likemodifier), NEDD8 (Neuronal-precursorcell-expresseddevelopmentallydown-regulatedprotein 8), ISG15 (IFN-stimulatedgene 15), GABARAP, FAT10 (F-adjacenttranscript-10), UFM1 (Ubiquitin-foldmodifier-1), URM1 (Ubiquitin-relatedmodifier-1); Ub (ubiquitin). Для сравнения использованы два фермента пуринового обмена, важного для синтеза нуклеотидов: Amidophosphoribosyl-transferase (phosphoribosylpyrophosphateamidotransferase) и Adenylosuccinatelyase (adenylosuccinase). Ранее было показано, что путем сравнения результатов двух докингов между собой шесть аминокислот трипсина у *Homo sapiens* и у *Biomphalaria glabrata* связываются с этионином в близких локусах молекул фермента. Аминокислоты для *Homo sapiens*: Asp 189, Ser 190, Gln 192, Ser 195, Val 213, Cys 220, аминокислоты для *Biomphalaria glabrata*: Asp 224, Ser 225, Gln 227, Ser 230, Val 248, Cys 254. Гомология молекул трипсина человека и моллюска составила 26,6 % [6].

**Результаты исследования и их обсуждение.** При сравнительном анализе протеолитических ферментов человека и моллюсков было найдено 27 нуклеотидных последовательностей ферментов у моллюска *Biomphalaria glabrata*, относящегося к одному семейству с моллюском *Planorbarius corneus* (*Planorbidae*), который может использоваться в качестве тест-организма. Из приведенного перечня семь протеолитических ферментов можно отнести к группе нерегулируемых протеолитических ферментов, шесть — к группе регулируемых протеолитических ферментов, два фермента — к группе ферментов пуринового обмена и семь ферментов — к группе убиквитин-подобных модификаторов.

При сравнительном анализе ферментов нерегулируемого протеолиза получены следующие данные. Фермент Prolyloligopeptidase (КФ 3.4.21.26) представляет собой цитозольную сериновую пептидазу, которая расщепляет пептидную связь С-концевого пролина; он способен обрабатывать пептиды, содержащие не более 30 аминокислот, благодаря уникальной структуре активного центра (гомология по нуклеотидной последовательности — 66 %, по аминокислотной — 62 %). Белок АТР-dependent Clp protease proteolytic subunit (КФ 3.4.21.92) — представляет собой высококонсервативную сериновую протеазу, содержащую каталитическую триаду Asp-His-Ser, найденную у бактерий, а также обнаруженную в митохондриях и хлоропластах эукариотических клеток

(гомология по нуклеотидной последовательности — 68 %, по аминокислотной — 67 %). Фермент Furin (КФ 3.4.21.75) — сериновая протеаза клеток животных, расположенная в аппарате Гольджи, напоминает бактериальный протеолитический фермент субтилизин (гомология по нуклеотидной последовательности — 69 %, по аминокислотной — 68 %). Белок SignalPeptidePeptidase — внутримембранная аспартил-протеаза, расщепляющая остаточные сигнальные пептиды, оставшиеся в мембране после действием сигнальной пептидазы (гомология по нуклеотидной последовательности — 67 %, по аминокислотной — 68 %). Amino-peptidase B (КФ 3.4.11.2) — фермент класса гидролаз, катализирующие отщепление от пептидов N-концевых  $\alpha$ -аминокислотных остатков, а также гидролиз  $\alpha$ -амидов аминокислот (гомология по нуклеотидной последовательности — 66 %, по аминокислотной — 50 %). Leucylaminopeptidases (cytosolaminopeptidase, КФ 3.4.11.1) — фермент, преимущественно катализирующий гидролиз лейциновых остатков на N-конце пептидов и белков (гомология по нуклеотидной последовательности — 66 %, по аминокислотной — 55 %). Белки Thimetoligopeptidases (КФ 3.4.24.15) — известные как TOPs, являются типами металлопептидаз, у животных участвуют в деградации пептидов — брадикинина, нейротензина, ангиотензина I и пептида A $\beta$  (гомология по нуклеотидной последовательности — 66 %, по аминокислотной — 63 %).

При сравнительном анализе ферментов регулируемого протеолиза получены следующие данные. Белок Ubiquitin conjugating factorE4 B-like(КФ 6.3.2.19) — убиквитин-протеиновая лигаза, которая, вероятно, функционирует как лигаза E3 в сочетании со специфическими лигазами E1 и E2 (по сходству) (гомология по нуклеотидной последовательности — 72 %, по аминокислотной — 49 %). Белок Ubiquitin conjugation factorE2 W-like принимает убиквитин из комплекса E1 и катализирует его ковалентное присоединение к другим белкам, в частности моноубиквитинирует N-конец различных субстратов, включая ATXN3, MAPT/TAU, POLR2H/RPB8 и STUB1/CHIP, путем распознавания атомов основной цепи неупорядоченных N-концов (гомология по нуклеотидной последовательности — 75 %, по аминокислотной — 74 %). Белок Ubiquitin conjugation factorE2 E1 принимает убиквитин из комплекса E1 и катализирует его ковалентное присоединение к другим белкам, катализирует ковалентное присоединение ISG15 к другим белкам, обеспечивает селективную деградацию короткоживущих и аномальных белков (гомология по нуклеотидной последовательности — 75 %, по аминокислотной — 88 %). Фермент Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolaseL5 — деубиквитинирующий фермент, связанный с регуляторной субъединицей 19S протеасомы 26S, предполагаемый регуляторный компонент комплекса INO80 (гомология по нуклеотидной последовательности — 72 %, по аминокислотной — 67 %). Фермент Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5 — E1-подобный фермент, который активирует UFM1 и SUMO2 (гомология по нуклеотидной последовательности — 76 %, по аминокислотной — 59 %). Фермент E3 ubiquitin ligase (EC 2.3.2.27) представляет собой белок, который рекрутирует убиквитин-конъюгирующий фермент E2, загруженный убиквитином, распознает белковый субстрат и помогает или непосредственно катализирует перенос убиквитина из E2 в белковый субстрат (гомология по нуклеотидной последовательности — 69 %, по аминокислотной — 51 %).

При сравнительном анализе ферментов пуринового обмена получены следующие данные. Amidophosphoribosyl-transferase (КФ 2.4.2.14) — фермент, ответственный за катализ превращения 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (PRPP) в 5-фосфорибозил-1-амин (PRA) с использованием аминной группы от боковой цепи глутамина (гомология по нуклеотидной последовательности — 68 %, по аминокислотной — 67 %). Фермент Adenylosuccinatelyase (КФ 4.3.2.2) пре-

вращает аденилосукцинат в АМР и fumarat как часть пуринового нуклеотидного цикла (гомология по нуклеотидной последовательности — 64 %, по аминокислотной — 60 %).

При сравнительном анализе убиквитин-подобных модификаторов получены следующие данные. Белок SUMO (Smallubiquitin-like modifier) вовлечен в регуляцию ядерного транспорта, транскрипции, репликация и репарации ДНК, апоптоза и стабилизация белков. У позвоночных обнаружено 4 гомологичных гена — *SUMO1*, *SUMO2*, *SUMO3*, *SUMO4*. Так же, как и убиквитинирование, присоединение SUMO к субстрату — сумоилирование (sumoylation) — происходит через образование изопептидной связи между С-концевым остатком Gly в молекуле SUMO и ε-аминогруппой остатка Lys в молекуле субстрата. Гомология по аминокислотной последовательности для SUMO2 — 33 % и для SUMO3 — 35 %; последовательностей SUMO1 и SUMO4 не обнаружено. Белок NEDD8 (Neuronal-precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8) подавляет экспрессию набора генов в предшественниках нервных клеток во время развития мозга (гомология по аминокислотной последовательности — 92 %). Белок ISG15 (IFN-stimulated gene 15) вовлечен в регуляцию иммунного ответа, клеточный рост и дифференцировку (гомология по аминокислотной последовательности — 33 %). Белок GABARAP является ортологом Atg8, у млекопитающих этот модификатор вовлечен в регуляцию аутофагии при нейродегенеративных, нервно-мышечных и онкозаболеваниях, бактериальных и вирусных инфекциях (гомология по нуклеотидной последовательности — 78 %, по аминокислотной — 95 %). FAT10 (F-adjacent transcript-10) — белок кодируется геном главного комплекса гистосовместимости и индуцируется TNFα и γ-интерфероном, состоит из 2-х убиквитин-подобных доменов, один из которых может напрямую связываться с 26S протеасомой и опосредовать убиквитин-независимую деградацию белков (гомология по аминокислотной последовательности — 32 %). Белок UFM1 (Ubiquitin-fold modifier-1) — биологические функции этой молекулы пока не установлены (гомология по нуклеотидной последовательности — 83 %, по аминокислотной — 89 %). Белок URM1 (Ubiquitin-related modifier-1) — ковалентно конъюгируется через изопептидную связь с остатками лизина целевых белков (гомология по аминокислотной последовательности — 64 %). Для моллюска *Lymnaea stagnalis* была найдена только одна аминокислотная последовательность, которая при парном выравнивании давала процент сходства с несколькими модификаторами — NEDD8 (56 %), ISG15 (33 %), FAT10 (31 %).

Особый интерес представляют данные о размерах найденных последовательностей, проценте сходства последовательностей человека и моллюска, а также проценте покрытия для убиквитина (табл. 1).

Белок Ubiquitin является малым (8.6 kDa) регуляторным протеином, присутствующим в большинстве клеток эукариотических организмов. Четыре гена человеческого генома кодируют убиквитин: *UBB*, *UBC*, *UBA52* и *RPS27A*. При сравнительном анализе белковых продуктов этих четырех генов были получены следующие данные для *Biomphalaria glabrata*: *UBB* — гомология по нуклеотидной последовательности — 81 %, по аминокислотной — 99 %, *UBC* — гомология по нуклеотидной последовательности — 79 %, по аминокислотной — 100 %, *UBA52* — гомология по нуклеотидной последовательности — 79 %, по аминокислотной — 94 %. *RPS27A* — гомология по нуклеотидной последовательности — 81 %, по аминокислотной — 93 %. Для *Lymnaea stagnalis* были получены несколько иные данные: *UBB* — гомология по нуклеотидной последовательности — 82 %, по аминокислотной — 100 %, *UBC* — гомология по нуклеотидной последовательности — 84 %, по аминокислотной — 100 %, *UBA52* — гомология по нуклеотидной последовательности — 82 %, по аминокислотной — 100 %, *RPS27A* — гомология по нуклеотидной последовательности — 80 %, по аминокислотной — 93 %. Для понимания полученных резуль-

татов следует учитывать, что в геноме человека убиквитин кодируют 4 гена, а у моллюсков было найдено по 1 гену, которые при выравнивании с каждым из 4 генов человека давали разные проценты гомологии.

**Таблица 1 — Оценка гомологии первичной структуры убиквитина человека и моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *Lymnaea stagnalis***

Белок	Типы последовательности	Гомология	Покрытие
UBB ( <i>Biomphalaria</i> )	NS	81 %	56 %
	AAS	99 %	100 %
UBB ( <i>Lymnaea</i> )	NS	82 %	55 %
	AAS	100 %	99 %
UBC( <i>Biomphalaria</i> )	NS	79 %	93 %
	AAS	100 %	96 %
UBC ( <i>Lymnaea</i> )	NS	84 %	93 %
	AAS	100 %	93 %
UBA52 ( <i>Biomphalaria</i> )	NS	79 %	68 %
	AAS	94 %	67 %
UBA52 ( <i>Lymnaea</i> )	NS	82 %	39 %
	AAS	100 %	40 %
RPS27A ( <i>Biomphalaria</i> )	NS	81 %	43 %
	AAS	93 %	43 %
RPS27A ( <i>Lymnaea</i> )	NS	80 %	43 %
	AAS	93 %	43 %

*Примечание:* NS — нуклеотидные последовательности, AAS — аминокислотные последовательности

**Заключение.** При парном выравнивании нуклеотидных последовательностей ферментов нерегулируемого протеолиза человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* было обнаружено, что параметры Activesite, Bindingsite and Metalbinding для 7 ферментов были полностью гомологичны у человека и моллюска (Prolyloligopeptidase, Thimetoligopeptidases, ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, Leucylaminopeptidases, SignalPeptidePeptidase, Adenylosuccinatelase, Aminopeptidase B), два фермента — гомологичны частично (Amidophosphoribosyltransferase и Furin) — у моллюска отсутствуют Metalbinding. При парном выравнивании нуклеотидных последовательностей ферментов регулируемого протеолиза человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* было обнаружено, что параметры Activesite, Bindingsite and Metalbinding для 4 ферментов были полностью гомологичны у человека и моллюска (SUMO, NEDD8, FAT10, ISG15), для 3 ферментов активные сайты и сайты связывания пока не описаны (UFM1, URM1, GABARAP). При парном выравнивании нуклеотидных последовательностей ферментов пуринового обмена человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* было обнаружено, что параметры Activesite, Bindingsite and Metalbinding для одного фермента гомологичны полностью (Adenylosuccinatelase), а для фермента — частично (Amidophosphoribosyltransferase) — у моллюска отсутствуют 2 Metalbinding. При парном выравнивании нуклеотидных последовательностей кодирующих гены убиквитина человека и моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *Lymnaea stagnalis* было обнаружено, что Activesite, Bindingsite and Metalbinding полностью гомологичны в 4 нуклеотидных последовательностях — как *Biomphalaria glabrata*, так и *Lymnaea astagnalis*.

Подводя итог проведенным исследованиям, следует отметить, что гомология ферментов нерегулируемого протеолиза у человека и легочных пресноводных моллюсков составляет 66–69 %; регулируемого протеолиза — 69–76 %; пуринового обмена — 64–68 %; убиквитин-протеасомного пути — 78–83 %; убиквитина — 79–81 % (*Biomphalaria glabrata*) и 80–84 %

(*Lymnaea stagnalis*). Практическое значение высокой степени гомологии протеолитических ферментов у людей и пресноводных легочных моллюсков обосновывает необходимость создания аквакультуры моллюсков, для получения из их тканей белковых ферментативных препаратов протеолитического действия в рамках задач биофармацевтики, косметики и пищевой промышленности. Таким образом, подтвержден эволюционный консерватизм протеолитических ферментов, что позволяет использовать легочных пресноводных моллюсков с целью получения ферментов.

**Благодарность:** авторы благодарны заведующему кафедрой общей химии БГМУ В. В. Хрусталеву за консультации по методам биоинформатики.

### Список литературы

1. Сорокин, А.В. Протеасомная система деградации и процессинга белков // А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // Успехи молекулярной биологии. — 2009. — Т. 49. — С. 3–76.
2. Цимоха, А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах / А.С. Цимоха // Цитология. — 2010. — Т. 52, №4. — С. 277–300.
3. Burger, A.M. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications / A.M. Burger, A.K. Seth // Eur. J. Cancer. — 2004. — Vol. 40(15). — P. 2217–2229.
4. Regulated intramembrane proteolysis: emergent role in cell signalling pathways / A.J. McCarthy [et al.] // Biochem. Soc. Trans. — 2017. — Vol. 45, №6. — P. 1185–1202.
5. Сравнительный биохимический анализ тканей легочных пресноводных моллюсков, обитающих в озерах Витебской и Гомельской областей Республики Беларусь / А.А. Чиркин [и др.] // SWorld. Научный мир. — 2018. — Т. 1, №51. — С. 90–95.
6. Chirkin, A.A. Proteolysis-antiproteolysis system and possible mechanism of the divergence of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* / A.A. Chirkin, V.V. Dolmatova, O.M. Balaeva-Tichomirova // The 3rd International symposium on EuroAsian Biodiversity. 05–08 July, 2017. — Minsk-Belarus: BSU, IPBB. — P. 236.
7. Антонов, В.К. Химия протеолиза / В.К. Антонов. — М.: Наука, 1991. — 504 с.
8. Веремеенко, К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / К.Н. Веремеенко, О.П. Голобородько, А.И. Кизим. — Киев: Здоровья, 1988. — 200 с.

## ASSESSMENT OF HOMOLOGY OF THE PROTEOLYSIS SISTEM PROTEINS IN HUMANS AND PULMONARY FRESHWATER MOLLUSKS

---

***Balaeva-Tichomirova O.M., Dolmatova V.V., Semenov I.O., Chirkin A.A.***

*Vitebsk State University named after P.M. Masherov  
Vitebsk, Republic of Belarus*

**Summary.** It is established that in humans and molluscs a homology of enzymes unregulated proteolysis is in the range of 66–69 %; regulated proteolysis in the range 69 to 76 %; purine metabolism — in the range of 64–68 %; ubiquitin-proteasome pathway — 78–83 %; ubiquitin-within 79–81 % (*Biomphalaria glabrata*) and 80–84 % (*Lymnaea stagnalis*). The evolutionary conservatism of proteolytic enzymes has been confirmed, which allows the use of pulmonary freshwater molluscs to produce enzymes.

## ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И ЕГО НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АГОНИСТА НА СТЕРОИДОГЕНЕЗ В СЕМЕННИКАХ ЗДОРОВЫХ, ДИАБЕТИЧЕСКИХ И СТАРЕЮЩИХ КРЫС

*Бахтюков А.А., Деркач К.В.<sup>1</sup>, Сорокоумов В.Н.<sup>1</sup>, Степочкина А.М.<sup>2</sup>, Шпаков А.О.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова российской академии наук», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация;  
<sup>2</sup>Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Резюме.** Впервые показано, что введение здоровым, диабетическим и стареющим самцам крыс гонадотропина (чХГ) и тиенопиримидинового производного (ТП) с активностью агониста рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГ) повышало уровень тестостерона и экспрессию гена стероидогенеза *Star*. В первый день обработки стероидогенный эффект чХГ превосходил таковой ТП, на пятый день во всех группах он был выражен слабее, что обусловлено снижением экспрессии рецептора ЛГ у крыс, обработанных чХГ, но не ТП.

**Введение.** Для коррекции андрогенной недостаточности у мужчин наряду с агонистами гонадолиберина и заместительной терапией тестостероном широко применяют мочевого или рекомбинантный хорионический гонадотропин человека (чХГ) [9]. Однако его применение сопряжено с серьезными проблемами, что в случае мочевых форм обусловлено гетерогенностью препарата, а в случае рекомбинантных форм чХГ связано с особенностями посттрансляционных модификаций и вызванными этим отличиями в биологической активности. Важно отметить, что при длительном применении чХГ вызывает десенситизацию рецепторов лютеинизирующего гормона (ЛГ), с которыми он специфично связывается, что приводит к резистентности семенников к эндогенным гонадотропинам и в результате — к андрогенному дефициту [3]. Альтернативой гонадотропинам являются низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ, которые связываются с аллостерическим сайтом, расположенным внутри трансмембранного домена рецептора, недоступного для чХГ и его гомолога ЛГ. Наибольший интерес среди таких регуляторов вызывают тиенопиримидиновые производные, которые на протяжении последних лет интенсивно разрабатываются как зарубежными учеными [4, 13, 14], так и в нашей лаборатории [6, 7].

Андрогенный дефицит часто развивается у мужчин с сахарным диабетом 1 типа (СД1) и при физиологическом старении организма, которое сопровождается угасанием тестикулярной функции [2, 15]. Основными причинами этого являются ослабление регуляторного влияния гонадотропинов на семенники и ингибирование тестикулярного стероидогенеза, вследствие чего эффективность чХГ при СД1 и в условиях старения снижается [9, 15]. Поскольку механизмы действия тиенопиримидиновых производных на рецептор ЛГ отличаются от таковых чХГ, то мы предположили, что их стимулирующее влияние на стероидогенез в семенниках крыс при СД1 и старении не будет ослабляться. Целью работы было изучить эффективность стимулирующего влияния чХГ и разработанного нами производного 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилтио)-4-[3-

(2-(этиламино) никотинамидо)-фенил]тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТП), с активностью агониста рецептора ЛГ, на андрогенный статус трехмесячных самцов крыс со стрептозотоциновым СД1 и стареющих 18-месячных самцов крыс без признаков патологии.

**Материалы и методы исследования.** В экспериментах использовали самцов крыс породы Wistar. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), и требованиями, изложенными в документах «European Communities Council Directive 1986» (86/609/ЕЕС) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Для моделирования СД1 трехмесячным крысам однократно, внутривентриально вводили стрептозотозин (50 мг/кг), через 10 дней отбирали животных с выраженной постпрандиальной гипергликемией ( $> 15$  ммоль/л), через 40 дней после индукции СД1 рандомизировали диабетических крыс на группы в соответствии с уровнем гликемии и гликированного гемоглобина (Hb1a): без лечения (Д,  $n = 5$ ), с лечением 50 МЕ чХГ (ДГ,  $n = 5$ ) и 15 мг/кг ТР (раствор в ДМСО) (ДТ,  $n = 5$ ). Контрольным самцам крыс того же возраста вместо стрептозотозина вводили его растворитель (100 мМ цитратный буфер, рН 4.5) и формировали группы: без лечения (К,  $n = 5$ ), с лечением 50 МЕ чХГ (КГ,  $n = 5$ ) и 15 мг/кг ТР (КТ,  $n = 5$ ). Стареющих самцов крыс (18 месяцев) обрабатывали сходным образом, также формируя три группы: без лечения (Ст,  $n = 5$ ), с лечением 50 МЕ чХГ (СтГ,  $n = 5$ ) и 15 мг/кг ТР (СтТ,  $n = 5$ ). Уровень тестостерона в крови измеряли до и после введения препаратов, через 3 ч после обработки. В последний день эксперимента животных наркотизировали и декапитировали, выделяя ткани семенников для оценки экспрессии генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1*, кодирующих рецептор ЛГ, белок StAR, ответственный за ключевую стадию стероидогенеза — перенос холестерина в митохондрии, и цитохром P450<sub>scс</sub>, катализирующий синтез прегненолона, предшественника прогестерона.

Уровень тестостерона в крови крыс определяли с помощью наборов «Тестостерон-ИФА» («Алкор-Био», Россия), используя спектрофотометр «Anthos Absorbance Reader 2020» («Anthos Labtec Instruments», Австрия). Образцы крови получали из хвостовой вены, используя местный наркоз с помощью анестезии 2%-м раствором лидокаина (в расчете 2–4 мг/кг).

Экспрессию мРНК в семенниках крыс оценивали с помощью полуколичественной ПЦР в реальном времени, для чего из тестикулярной ткани выделяли тотальную РНК с помощью реагента «ExtraRNA» («Evrogen», Россия), как описано ранее [5]. Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора «MMLV RT Kit» («Evrogen», Россия), экспрессию оценивали с помощью амплификатора «7500 Real-Time PCR System» («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Для оценки экспрессии гена *Lhr* использовали праймеры CTGCGCTGTCCTGGCC (For) и CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA (Rev), для оценки экспрессии гена *Star* — AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC (For) и CACCTGGCACCCACTTACTT (Rev), для оценки экспрессии гена *Cyp11a1* — TATTCGCTTTGCCTTTGAG (For) и CACGATCTCCTCCAACATCC (Rev). В качестве референсных использовали гены  $\beta$ -актина (*Actb*) и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*Gapdh*), результаты анализировали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$  и программ 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе животных.

Статистический анализ осуществляли, используя программу «Microsoft Office Excel 2007». Для сравнения двух выборок использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех групп — дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при  $p < 0,05$ , данные представляли как  $M \pm SEM$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Введение контрольным крысам чХГ и ТП приводило к повышению уровня тестостерона в крови, но если в первый день гонадотропин

был эффективнее низкомолекулярного агониста, то к пятому дню картина менялась, стимулирующий эффект чХГ был снижен в сравнении с таковым ТП (табл. 1). Это было ассоциировано со снижением на 59 % экспрессии гена *Lhr* в семенниках крыс, обработанных гонадотропином, в то время у крыс, обработанных ТП, данный показатель имел тенденцию к повышению (табл. 2). Показано, что экспрессия гена, кодирующего белок StAR, в одинаковой степени возрастала в группах КГ и КТ, в то время как экспрессия гена *Cyp11a1* возрастала только в группе КГ (см. табл. 2). Это может быть обусловлено тем, что ослабление стимулирующего влияния чХГ на тестикулярную стероидогенную систему вследствие снижения уровня рецептора ЛГ компенсируется повышением экспрессии стероидогенных генов, в том числе *Cyp11a1*. При этом несмотря на повышение экспрессии генов *Star* и *Cyp11a1* эффективность стимулирующего влияния чХГ на синтез тестостерона на пятый день обработки была ниже, чем при обработке животных низкомолекулярным агонистом.

При СД1 и старении уровни тестостерона в крови животных были достоверно снижены, а их стимуляция чХГ и ТП была ослаблена в сравнении с контролем (см. табл. 1). В наибольшей степени эффект чХГ был ослаблен при СД1, что может быть обусловлено как уменьшением содержания рецепторов ЛГ в семенниках, на что указывают наши данные о снижении экспрессии гена *Lhr* в группе Д (см. табл. 2), так и нарушением передачи гонадотропинового сигнала вследствие ослабления взаимодействия рецептора ЛГ с  $G_s$ -белком и аденилатциклазой, ниже лежащими компонентами аденилатциклазной сигнальной системы, ответственной за регуляцию стероидогенеза [1]. При старении число рецепторов существенно не менялось, вследствие чего причинами сравнительно небольшого ослабления эффекта чХГ у стареющих крыс могут быть усиление в семенниках таких процессов, как стресс эндоплазматического ретикулума, окислительный стресс, воспаление [8, 10]. Это приводит к обнаруженному нами ослаблению стимулирующего влияния чХГ на экспрессию генов стероидогенеза, как компенсаторного механизма для поддержания адекватной стимуляции семенников гонадотропинами (см. табл. 2). Как и в случае контрольных крыс, у диабетических и стареющих животных в первый день обработки стероидогенный эффект гонадотропина заметно превосходил таковой ТП, в наибольшей степени при сравнении групп СтГ и СтТ. В то же время, на 5-й день стероидогенный эффект чХГ уступал таковому ТП, причем последний даже усиливался с увеличением продолжительности обработки животных этим низкомолекулярным агонистом (см. табл. 1). Определенный вклад в это может вносить способность низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ проявлять свойства шаперонов, способных проникать внутрь клетки, связываться там с незрелыми формами рецептора ЛГ и обеспечивать их активацию и транслокацию в мембрану [11, 12]. Эти шапероноподобные свойства низкомолекулярных агонистов могут оказаться особенно востребованы в условиях нарушения фолдинга тестикулярных белков, включая рецептор ЛГ, в условиях СД1 и старения.

**Заключение.** Таким образом, нами впервые показано, что при длительном (5 дней) введении самцам крыс Wistar гонадотропина (чХГ) и низкомолекулярного агониста рецептора ЛГ (ТП) стимулирующий продукцию тестостерона эффект чХГ постепенно снижается, что во многом обусловлено снижением экспрессии рецептора ЛГ в семенниках, в то время как соответствующий эффект ТП, напротив, усиливается и на 4-й и 5-й дни превосходит таковые гонадотропина. У самцов крыс с СД1 и у стареющих животных стероидогенные эффекты чХГ и ТП снижаются, что ассоциировано с ослаблением их стимулирующего влияния на экспрессию стероидогенных генов *Star* и *Cyp11a1*. Как и в случае контрольных животных, если в первый день стероидогенный эффект гонадотропина более выражен, то после пятидневного введения

он заметно уступает таковому ТП. Это обусловлено снижением экспрессии гена, кодирующего рецептор ЛГ, при длительном введении чХГ, но не ТП. Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу возможности применения низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ на основе тиенопиримидинов для стимуляции тестикулярного стероидогенеза и компенсации андрогенного дефицита при тяжелых формах СД1 и при возрастном снижении тестикулярной функции у мужчин.

**Таблица 1 — Уровни тестостерона у здоровых, диабетических и стареющих самцов крыс, которых в течение 5 дней обрабатывали чХГ (50 МЕ/крысу/сутки) и ТП (15 мг/кг/сутки)**

Показатель	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день
К	15,2 ± 2,7	14,5 ± 3,0	14,1 ± 2,9	16,1 ± 2,3	14,7 ± 3,8
КГ	139,9 ± 9,5 <sup>a</sup>	111,4 ± 13,3 <sup>a</sup>	72,5 ± 10,8 <sup>a</sup>	70,4 ± 8,6 <sup>a</sup>	81,3 ± 7,8 <sup>a</sup>
КТ	63,4 ± 7,1 <sup>a,b</sup>	84,7 ± 8,9 <sup>a</sup>	100,5 ± 11,8 <sup>a</sup>	111,9 ± 11,2 <sup>a,b</sup>	122,5 ± 10,7 <sup>a,b</sup>
Д	6,1 ± 0,9	6,3 ± 1,8	5,5 ± 0,7	5,2 ± 1,2	5,3 ± 1,4
ДГ	58,7 ± 4,8 <sup>a</sup>	62,2 ± 5,1 <sup>a</sup>	48,7 ± 4,6 <sup>a</sup>	47,8 ± 3,0 <sup>a</sup>	45,2 ± 4,4 <sup>a</sup>
ДТ	36,4 ± 3,7 <sup>a,b</sup>	46,5 ± 3,9 <sup>a</sup>	47,7 ± 4,6 <sup>a</sup>	59,8 ± 4,1 <sup>a</sup>	63,3 ± 3,1 <sup>a,b</sup>
Ст	10,4 ± 1,3	11,9 ± 2,2	9,8 ± 1,4	9,7 ± 3,0	10,6 ± 1,9
СтГ	100,7 ± 7,0 <sup>a</sup>	93,4 ± 9,8 <sup>a</sup>	56,4 ± 6,9 <sup>a</sup>	62,3 ± 7,6 <sup>a</sup>	47,4 ± 2,6 <sup>a</sup>
СтТ	35,8 ± 4,1 <sup>a,b</sup>	43,9 ± 5,2 <sup>a,b</sup>	58,4 ± 5,1 <sup>a</sup>	69,2 ± 5,4 <sup>a</sup>	63,8 ± 5,1 <sup>a,b</sup>

*Примечание.* \* — препараты вводили в 11:00, уровень тестостерона измеряли через 3 ч в 14:00. <sup>a</sup> — различия между группой К и группами КГ и КТ, группой Д и группами ДГ и ДТ, группой Ст и группами СтГ и СтТ статистически значимы при  $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> — различия между группами, обработанными чХГ и ТП, статистически значимы при  $p < 0,05$ . Значения представлены, как  $M \pm SEM$ , во всех группах  $n = 5$ .

**Таблица 2 — Экспрессия генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1* в семенниках здоровых, диабетических и стареющих самцов крыс, которых в течение 5 дней обрабатывали чХГ (50 МЕ/крысу/сутки) и ТП (15 мг/кг/сутки)**

Показатель	Lhr	Star	Cyp11a1
К	1,01 ± 0,08	1,03 ± 0,12	1,00 ± 0,08
КГ	0,41 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,92 ± 0,24 <sup>a</sup>	6,45 ± 0,47 <sup>a</sup>
КТ	1,48 ± 0,22 <sup>b</sup>	3,19 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,21 <sup>b</sup>
Д	0,72 ± 0,06	0,69 ± 0,15	0,91 ± 0,08
ДГ	0,14 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,17 <sup>a</sup>
ДТ	0,97 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,97 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,07 <sup>b</sup>
Ст	1,07 ± 0,11	0,90 ± 0,07	0,98 ± 0,05
СтГ	0,36 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,84 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,76 ± 0,35 <sup>a</sup>
СтТ	0,87 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,88 ± 0,10 <sup>a, b</sup>	1,19 ± 0,10 <sup>b</sup>

*Примечание.* <sup>a</sup> — различия между группой К и группами КГ и КТ, группой Д и группами ДГ и ДТ, группой Ст и группами СтГ и СтТ статистически значимы при  $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> — различия между группами, обработанными чХГ и ТП, статистически значимы при  $p < 0,05$ . Значения представлены, как  $M \pm SEM$ , во всех группах  $n = 5$ .

### Список литературы

1. Бахтюков, А.А. Взаимосвязь между андрогенным дефицитом и ослаблением чувствительности аденилатциклазы к гонадотропинам в семенниках крыс со стрептозотоци-

новым диабетом различной степени тяжести / А.А. Бахтыуков, К.В. Деркач, А.О. Шпаков // Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. — 2019. — Т. 105, № 1. — С. 100–110.

2. Шпаков, А.О. Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы при сахарном диабете / А.О. Шпаков // Проблемы эндокринологии. — 2010. — Т. 56, № 5. — С. 23–29.

3. Шпаков, А.О. Гонадотропины и другие регуляторы репродуктивных функций: фундаментальные и клинические аспекты / А.О. Шпаков // СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. — 2020. — 508 с.

4. Anderson, R.C. Small Molecule Follicle-Stimulating Hormone Receptor Agonists and Antagonists / R.C. Anderson, C.L. Newton, R.P. Millar // Front. Endocrinol. (Lausanne). — 2019. — Vol. 9. — P. 757.

5. Thienopyrimidine derivatives specifically activate testicular steroidogenesis but do not affect thyroid functions / A.A. Bakhtyukov [et al.] // J. Evol. Biochem. Physiol. — 2019. — Vol. 55, № 1. — P. 30–39.

6. Conservation of steroidogenic effect of the low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor in the course of its long-term administration to male rats / A.A. Bakhtyukov [et al.] // Dokl. Biochem. Biophys. — 2019. — Vol. 484, № 1. — P. 78–81.

7. Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats / K.V. Derkach [et al.] // Dokl. Biol. Sci. — 2014. — Vol. 459, № 1. — P. 326–329.

8. Aging changes of the testis in albino rat: light, electron microscopic, morphometric, immunohistochemical and biochemical study / S.M. Hussein [et al.] // Folia Morphol (Warsz). — 2019.

9. Jangir, R.N. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review / R.N. Jangir, G.C. Jain // Curr. Diabetes Rev. — 2014. — Vol. 10, № 3. — P. 147–157.

10. Levy, S. Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood/epididymis barrier in rats / S. Levy, B. Robaire // Biol. Reprod. — 1999. — Vol. 60, № 6. — P. 1392–1401.

11. Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist / C.L. Newton [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2011. — V. 108, № 17. — P. 7172–7176.

12. Segaloff, D.L. Regulatory processes governing the cell surface expression of LH and FSH receptors / D.L. Segaloff // Subcell Biochem. — 2012. — Vol. 63. — P. 113–129.

13. Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH / R. van de Lagemaat [et al.] // Endocrinology. — 2011. — Vol. 152, № 11. — P. 4350–4357.

14. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor / C.J. van Koppen [et al.] // Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 2008. — Vol. 378, № 5. — P. 503–514.

15. Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors / Y. Wang [et al.] // Reproduction. — 2017. — Vol. 154, № 4. — P. R111–R122.

**INFLUENCE OF CHORIONIC GONADOTROPIN  
AND ITS LOW-MOLECULAR WEIGHT AGONIST  
ON STEROIDOGENESIS IN THE TESTES OF HEALTHY,  
DIABETIC AND AGING RATS**

---

***Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N., Steepochkina A.M., Shpakov A.O.***

*<sup>1</sup>Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,  
Russian Academy of Sciences,  
Petersburg, Russian Federation;*

*<sup>2</sup>Institute of Chemistry,  
Petersburg, Russian Federation*

**Summary.** *It was shown for the first time that the administration of gonadotropin (hCG) and a thienopyrimidine derivative (TP) with the activity of a luteinizing hormone (LH) receptor agonist to healthy, diabetic and aging male rats led to an increase in the testosterone levels and the expression of the steroidogenesis gene Star. On the first day of treatment, the steroidogenic effect of hCG was higher than that of TP; and on the fifth day, it was weaker in all the studied groups due to a decrease in LH receptor expression in rats with hCG treatment, but not with TP treatment.*

## ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЁННОСТИ УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ У МОЛОДЫХ ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ПОЛА

*Блажко А.С.<sup>1</sup>, Переверзев В.А.<sup>1</sup>, Сикорский А.В.<sup>1</sup>, Евсеев А.В.<sup>2</sup>,  
Разводовский Ю.Е.<sup>3</sup>, Корзун Д.Л.<sup>4</sup>, Никитина О.С.<sup>1</sup>, Переверзева Е.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Смоленский государственный медицинский университет»,  
г. Смоленск, Российская Федерация

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

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Поволжская государственная академия  
физической культуры, спорта и туризма», г. Казань, Российская Федерация

**Резюме.** Распространённость употребления алкоголя и её динамика у девочек и девушек были достоверно шире в 1,19-2,36 раза ( $\chi^2 = 28,720$ ;  $p < 0,001$  при  $df = 9$ ) и более быстрыми в 1,20–3,25 раза ( $\chi^2 = 14,359$ ;  $p < 0,01$  при  $df = 4$ ) темпами во все возрастные периоды психического развития детей и подростков (от 3 до 17 лет включительно) по сравнению с мальчиками и юношами. Полученные факты указывают на важность постоянного мониторинга распространённости употребления алкоголя молодёжью уже начиная со школьного возраста и пропаганды трезвого образа жизни, прежде всего, среди родителей, служащих прямым примером своим детям, а затем уже и среди школьников и студентов при активном привлечении к этому педагогов, тренеров, священнослужителей.

**Введение.** Известна большая распространённость употребления алкоголя молодёжью (в том числе, и белорусскими молодыми людьми обоего пола) по сравнению со взрослыми людьми [2, 5, 8-10, 14, 15]. Закономерно вставал вопрос о причинах большей распространённости УА среди молодёжи по сравнению со взрослыми людьми. Для поиска ответов на данный вопрос был произведен анализ начала УА белорусскими студентами разного пола.

**Цель.** Изучить динамику начала употребления алкоголя молодёжью в разные возрастные периоды.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проведено среди белорусских студентов 1-2 курсов всех факультетов БГМУ при их добровольном согласии. Отказались от участия в исследовании 10 студентов, 832 респондента согласились. Все молодые люди, согласившиеся участвовать в исследовании, заполнили три анкеты: «Общая» и анкеты психометрических тестов «AUDIT» и «CAGE».

Анкета «Общая» была утверждена Комитетом по биомедицинской этике УО «БГМУ» 10.02.2019. Ответы на вопросы, содержащиеся в ней, позволяли оценить искренность (правдивость) ответов респондентов и получить общие сведения о них, включая их отношение к алкоголю (трезвенник или лицо, употребляющее алкогольные напитки). Ответы на вопросы шкалы

«Лжи» из методики «Уровень невротизации-психопатизации» [7] позволяли оценить искренность студентов, что необходимо для суждения о степени доверия ответам испытуемых и по другим тестам, что соответствует современным требованиям проведения психометрической диагностики [3, 10]. Результаты ответов на другие вопросы анкеты «Общая» и психометрических тестов «AUDIT» и «CAGE» учитывались только в том случае, если число правдивых ответов шкалы «Лжи» составляло не менее 6 из 10 вопросов (т.е. 60 — 100%). Все анкеты респондентов, набравших в тесте «Искренность» 5 и менее баллов ( $\leq 50\%$ ) согласно рекомендаций [3, 7] не интерпретировались. По результатам анализа ответов теста «Искренность» анкеты 142 белорусских студентов были исключены из дальнейшей обработки. Для полного анализа использовались анкеты 690 молодых людей: 164 юношей и 526 девушек.

Для выявления распространенности употребления алкогольных напитков и связанных с этим (алкогольных) проблем среди студентов были использованы психометрические тесты «AUDIT» и «CAGE», рекомендованные ВОЗ [2, 14] для этих целей и разрешенные для использования в наркологической и общемедицинской практике Республики Беларусь [1]. Это позволило оценить у испытуемых наличие проблем, обусловленных алкоголем, а также рассчитать частоту и объём (разовый, месячный и годовой в пересчёте на абсолютный этанол) его потребления. Вопросы анкеты «Общая» позволяли рассчитать стаж (общую длительность и объём потребленного этанола) и возраст начала потребления алкоголя, а также длительность периодов трезвости, узнать возраст самого испытуемого, его пол, место рождения, вероисповедание, отношение к здоровому образу жизни.

Для изучения возрастной специфики начала употребления алкоголя молодёжью взята периодизация психического развития Д.Б. Эльконина (1971) [13], применяемая и в настоящее время [11; 12], для чего в процессе анализа (данных из анкет студентов о начале потребления алкогольных напитков) были выделены следующие возрастные группы: 1-я — дети 3-6 лет (дошкольники); 2-я — дети 7-10 лет, ученики младшей школы; 3-я — подростки 11-14 лет (ученики средних классов); 4-я — подростки 15-17 лет (старшеклассники); 5-я девушки и юноши 18-23 лет (студенты 1-2 курсов УО «БГМУ», которые собственно и заполняли анкеты).

Межполовой градиент у респондентов рассчитывался как соотношение распространенности употребления алкогольных напитков (в том числе, в опасном и вредном режиме) среди молодых людей (девушек : юношей) разного пола, когда показатель для молодых респонденток был принят за единицу.

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа [4, 6].

Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 10 (разработчик - StatSoft.Inc).

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению, для этого использовался критерий Колмогорова-Смирнова, а также показатели асимметрии и эксцесса. В случае описания количественных показателей, имеющих нормальное распределение, полученные данные объединялись в вариационные ряды, в которых проводился расчет средних арифметических величин ( $M$ ), стандартных отклонений ( $SD$ ) и стандартных ошибок средних величин ( $m$ ).

Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений, долей в процентах в виде коэффициентов вариации с рассчитанными для них ошибками (ошибками коэффициентов вариации [6, с. 349]).

Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона. Значение критерия  $\chi^2$  сравнивалось с критическими значениями для  $(r - 1) \cdot C$  ( $C - 1$ ) числа степеней свободы. В том случае, если полученное значение критерия  $\chi^2$  превышало критическое, делался вывод о наличии статистической взаимосвязи между изучаемым фактором риска и исходом при соответствующем уровне значимости.

Оценка различий между двумя долями проводилась с помощью t-критерия, который сравнивался с его критическими значениями для выбранного числа наблюдений (при уровне значимости  $p < 0,05$ ), или же путём сравнения коэффициентов вариации (долей) распространённости признака и их ошибок в двух независимых выборках на основании следующего алгебраического выражения неравенства [6, с. 349]:

$$\frac{\text{абсолютное значение разности коэффициентов вариации (долей)}}{\text{корень квадратный из суммы квадратов ошибок коэффициентов вариации}} > 3 + 6 / (N - 4)$$

При выполнении неравенства, т.е. когда левая половина была больше правой, различия считались достоверными

**Результаты исследования и их обсуждение.** Анализ сведений о начале употребления алкоголя (табл. 1) респондентами показал, что уже в дошкольном возрасте дети (3–6 лет) начинают потреблять алкогольные напитки. Доля таких детей составляет 1,9 %, в том числе среди девочек 2,1% и среди мальчиков 1,2%. Во время учебы в школе этот показатель постоянно увеличивается. Распространённость употребления алкоголя учениками младшей школы составляла 5,1% (5,9% среди девочек и 2,5 среди мальчиков), подростков 14 лет — 22,0% (24,7% среди школьниц и 13,5% среди школьников), старшеклассников 17 лет 76,1% (79,1% среди девушек и 66,3% среди юношей) и у студентов 1-2 курсов 89,3% (90,5% среди респонденток и 85,4% среди респондентов). Из представленных в таблице 1 данных следует, что распространённость употребления алкоголя девочками и девушками (дошкольницами и школьницами) во все возрастные периоды психического развития детей и подростков была достоверно больше аналогичных показателей у мальчиков и юношей, а также суммарно между молодыми респондентами женского и мужского пола по всем пяти выделенным группам, включая студентов.

Динамика прироста употребления алкоголя составляла у молодых лиц женского и мужского пола по отношению к трезвенникам соответствующего пола в 7–10-летнем возрасте к детям дошкольного возраста +3,9% у девочек и 1,2% у мальчиков; в 11–14 лет к младшим школьникам (7–10 лет) — +20,0% и +12,6% соответственно; в 15–17 лет к детям среднего школьного возраста (11–14 лет) — +72,4% у девушек и +60,6% у юношей; у студентов к ученикам старшей школы (15–17 лет) — +54,1% у респонденток и + 57,1% у респондентов (табл. 1). Выявленные факты показывают, что школьный возраст (15–17 лет) является наиболее уязвимым для начала употребления алкоголя — на него приходится максимальный прирост распространённости употребления алкогольных напитков.

Следует отметить, что распространённость употребления алкоголя и её динамика у девочек и девушек (табл. 1) были достоверно шире в 1,19-2,36 раза ( $\chi^2=28,720$ ;  $p < 0,001$  при  $df=9$ ) и более быстрыми в 1,20-3,25 раза ( $\chi^2=14,359$ ;  $p < 0,01$  при  $df=4$ ) во все возрастные периоды психического развития детей и подростков (от 3 до 17 лет включительно) по сравнению с мальчиками и юношами. Полученные факты указывают на важность постоянного мониторинга распространённости употребления алкоголя молодёжью уже начиная со школьного возраста и пропаганды трезвого образа жизни, прежде всего, среди родителей, служащих прямым при-

мером своим детям, а затем уже и среди школьников и студентов при активном привлечении к этому педагогов, тренеров, священнослужителей.

Особую тревогу с употреблением алкоголя молодёжью вызывает факт его широкого распространения среди молодёжи, особенно, среди девушек (табл. 1). Проведенный сравнительный анализ динамики потребления алкоголя и проблем, вызываемых им, за последние 10 лет у студентов-медиков, результаты которого представлены в таблице 2, показал достоверное сокращение распространённости трезвого образа жизни на 5,9% ( $\chi^2=7,225$ ;  $p<0,025$  при  $df=1$ ) среди студенток младших курсов за счёт возрастания удельного веса среди них девушек, употребляющих алкоголь в режиме низкого риска на 4,5%, а также в опасном и вредном режимах на 1,4% ( $\chi^2=7,771$ ;  $p<0,05$  при  $df=2$ ), за счёт резкого, более чем 2-х кратного, повышения количества признаваемого разового и месячного потребления этанола ими (табл. 2). Для сравнения у юношей (табл. 2) эта негативная динамика употребления алкоголя (например, уменьшение распространённости трезвого образа жизни, увеличение месячной дозы этанола /в 1,57 раза, а не двукратное/) была менее выраженной по сравнению с девушками, а по целому ряду показателей даже было существенное снижение вредных последствий действия этанола (выраженное и достоверное понижение распространённости потребления алкоголя в опасном и вредном режимах на 10,4% /в 1,57 раза/, получения травм /в 2,43 раза/, утраты контроля за потреблением алкогольных напитков /в 3,06 раза/, желанья опохмелиться /в 1.70 раза/, частоты УА в 1,47 раза).

**Таблица 1 — Распространённость (удельный вес) употребления алкоголя (УА) и её динамика среди девушек (Д) и юношей (Ю) в зависимости от указанного ими возраста начала УА**

№ гр	Возраст лет (пе-риод ДП, лет)	КВ распространённости УА среди:				КВ ДП УА от Тр среди:			
		девочек и Д, n=526		мальчиков и Ю, n=164		девочек и Д, n=526		мальчиков и Ю, n=164	
		N	КВ уд. веса (С), % ( $M_C \pm m_C$ )	n	КВ уд. веса (С), % ( $M_C \pm m_C$ )	n	КВДПУА от Тр (С), % ( $M_C \pm m_C$ )	N	КВДПУА от Тр (С), % ( $M_C \pm m_C$ )
1	6 (3-6)	11	2,1±0,1 *▲■	2	1,2±0,1*▲■	11	2,1±0,1 *■□	2	1,2±0,1 *■□
2	10(7-10)	31	5,9±0,2 *▲■	4	2,5±0,2 *▲■	20	3,9±0,1 *■□	2	1,2±0,1*■□
3	14(11-14)	130 <sup>△</sup>	24,7±0,8*▲■	22 <sup>△</sup>	13,5±0,8*▲■	99 <sup>△</sup>	20,0±0,7 *■□	18 <sup>△</sup>	12,6±0,7*■□
4	17(15-17)	417 <sup>△</sup>	79,1±3,7*■	108 <sup>△</sup>	66,3±5,0*■	287 <sup>△</sup>	72,5±3,7 *■□	86 <sup>△</sup>	60,6±4,7 *■□
5	23(18-23)	476	90,5±4,5 *■	140	85,4±7,4 *■	59	54,1±4,6 *■□	32	57,1±6,9 *■□
Достоверность различий ( — ) КВ и КВДПУА между группами									
■ — $\chi^2$ между Дев/Д и М/Ю для всех десяти подгрупп = 28,720; $p < 0,001$ при $df = 9$ и критическом значении $\chi^2 = 27,877$ для $p=0,001$						□ — $\chi^2$ между Дев/Д и М/Ю = 14,359; $p < 0,01$ при $df = 4$ и критическом значении $\chi^2 = 13,277$ для $p = 0,01$			

Примечания: n — число детей или студентов в подгруппах женского (Дев/Д — Девочки/ Девушки) или мужского (М/Ю — Мальчики/Юноши) пола; КВ — Коэффициент Вариации (распространённости УА); КВДПУАот-Тр — Коэффициент Вариации Динамики Прироста УА от числа оставшихся в каждой подгруппе (Дев/Д или М/Ю) Трезвенников; \* — достоверность различий ( $p<0,05$ ) КВ доли детей или студентов УА или КВДПУА к нулевой гипотезе в каждой подгруппе (Дев/Д или М/Ю) с 1 по 5 группы разного возраста; ▲ — достоверность различий КВ распространённости УА и КВДПУА между подгруппами Дев/М или между Д/Ю внутри своей группы; <sup>△</sup> — различия достоверны ( $\chi^2$  между Д и М более 5,023 для  $p<0,025$  при  $df=1$ ) между подгруппами Дев/М или между Д/Ю внутри своей группы; ■ — достоверность различий КВДПУА между подгруппами Дев/М или между Д/Ю внутри своей группы

**Таблица 2 — Динамика распространённости трезвого образа жизни, употребления алкоголя (УА) и его показателей за последние двенадцать лет среди белорусских студентов-медиков разного пола**

Показатель	среди (у) девушек			среди (у) юношей		
	2019/2020 учеб. год	2007/2008 учеб. год	динамика к 2008 году	2019/2020 учеб. год	2007/2008 учеб. год	Динамика к 2008 году
Группа	№1	№2		№3	№4	
Общее число респондентов в группе	n=526	n=415		n=164	n=150	
Распространённость трезвого образа жизни	n <sub>1,1</sub> =50* <sup>▣</sup> 9,5 %* <sup>▲</sup>	n <sub>2,1</sub> =64* <sup>▣</sup> 15,4%* <sup>▲</sup>	↓1,62 раза* -5,9% <sup>▲</sup>	n <sub>3,1</sub> =24 <sup>▣</sup> 14,6 %	n <sub>4,1</sub> =26 <sup>▣</sup> 17,3%	↓1,18 раза <sup>▣</sup> -2,7%
Распространённость УА в режиме низкого риска (AUDIT 1-7 баллов)	n <sub>1,2</sub> =419* 79,7%	n <sub>2,2</sub> =312* 75,2%	↑1,06 раза* +4,5%	n <sub>3,2</sub> =110 <sup>▣</sup> 67,1% <sup>▲</sup>	n <sub>4,2</sub> =81 <sup>▣</sup> 54,0% <sup>▲</sup>	↑1,24 раза <sup>▣</sup> +13,1% <sup>▲</sup>
Распространённость УА в опасном и вредном режимах (AUDIT ≥8 баллов)	n <sub>1,3</sub> =57* 10,8%	n <sub>2,3</sub> =39* 9,4%	↑1,15 раза* +1,4%	n <sub>3,3</sub> =30 <sup>▣</sup> 18,3% <sup>▲</sup>	n <sub>4,3</sub> =39 <sup>▣</sup> 28,7% <sup>▲</sup>	↓1,57 раза <sup>▣</sup> -10,4% <sup>▲</sup>
* — $\chi^2$ между группами №1 и №2 для всех трёх подгрупп (1.1;1.2;1.3 и 2.1;2.2;2.3) в каждой группе = 7,771; p < 0,05 при df = 2 и критическом значении $\chi^2 = 5,991$ для p = 0,05; ▲ — достоверность различий (p < 0,05) между долями трезвенников в подгруппах 1.1–2.1			▣ — $\chi^2$ между группами №3 и №4 для всех трёх подгрупп = 6,186; p < 0,05 при df = 2; ▲ — различия достоверны (p < 0,05) в подгруппах 3.2–4.2 и 3.3–4.3			
УА в пересчёте на этанол (мл/раз), M±m	59±1,6	26	↑2,27 раза	87±4,9	35	↑2,49 раза
Частота УА (раз/месяц), M±m	1,5±0,06	1,5	=	1,7±0,11	2,5	↓1,47 раза
УА в пересчёте на этанол (мл/месяц), M±m	96±5,3	40	↑2,40 раза	166±19,3	106	↑1,57 раза
Распространённость утраты контроля за количеством УА при выпивке (C <sub>кв</sub> ±m <sub>кв</sub> )	n=31 6,5±0,2% <sup>▲</sup>	n=15 4,3±0,2% <sup>▲</sup>	↑1,51 раза <sup>▲</sup> +2,2% <sup>▲</sup>	n=9 6,5±0,3% <sup>▲</sup>	n=21 19,6±1,3% <sup>▲</sup>	↓3,06 раза <sup>▲</sup> -13,1% <sup>▲</sup>
Распространённость необходимости опох-мельиться утром после выпивки (C <sub>кв</sub> ±m <sub>кв</sub> )	n=31 6,5±0,2% <sup>▲</sup>	n=14 4,0±0,2% <sup>▲</sup>	↑1,63 раза <sup>▲</sup> +2,5% <sup>▲</sup>	n=17 12,1±0,7 <sup>▲</sup>	n=22 20,6±1,4% <sup>▲</sup>	↓1,70 раза <sup>▲</sup> -8,5% <sup>▲</sup>
Распространённость получения травмы Вами или кем-то другим по причине Вашего чрезмерного УА (C <sub>кв</sub> ±m <sub>кв</sub> )	n=36 7,6±0,3%	n=23 6,6±0,3%	↑1,15 раза +1,0%	n=14 10±0,6% <sup>▲</sup>	n=26 24,3±1,6% <sup>▲</sup>	↓2,43 раза <sup>▲</sup> -14,3% <sup>▲</sup>

Примечания: n — число студентов в группах и подгруппах; КВ — Коэффициент Вариации; ▲ — достоверность различий распространённости (по КВ) соответствующего показателя между группами 1-2 и 3-4. Данные за 2019/2020 год собственные, а данные за 2007/2008 учебный год взяты из монографии М.О. Вэлкома и др. (2013) [10].

Гендерный (межполовой) градиент «употребления алкоголя с вредными последствиями» хорошо описан в отечественной и зарубежной медицинской литературе и составляет у взрослых людей в трудоспособном возрасте около 1:4 (женщины:мужчины), а у несовершеннолетних 1:2,2 [2, 8, 9]. В представленном исследовании данный показатель (гендерный градиент — девушки/юноши) опасного и вредного режимов употребления алкоголя, который в 2007/2008 учебном году был равен 1:3,05 (табл. 2 [10]), составил у студентов 2019/2020 года только 1:1,69. Таким образом, у студентов имеет место наиболее низкий межполовой градиент среди потребителей алкоголя с вредными последствиями, что указывает на растущую вовлеченность молодых женщин в этот процесс и необходимость проведения превентивных мероприятий среди них во время обучения, начиная уже со школы и активно продолжая в университетах.

Особо следует отметить раннее начало употребления алкоголя (табл. 1) уже с дошкольного возраста (среди девочек 2,1%, а мальчиков 1,2%) и его резкое возрастание в школе (у подростков-старшеклассников /9-11 класс/ до 72,5% среди девушек и 60,6% среди юношей). Причем распространённость употребления алкоголя девочками и девушками (дошкольницами и школьницами) во все указанные возрастные периоды психического развития детей и подростков была достоверно больше аналогичных показателей у мальчиков и юношей (табл. 1). Оба рассмотренных факта указывают на необходимость выделения девочек и девушек в отдельную целевую группу для проведения с ними антиалкогольной пропаганды за здоровый (трезвый) образ жизни.

### **Выводы**

1. Распространённость употребления алкоголя и её динамика у девочек и девушек были достоверно шире в 1,19-2,36 раза ( $\chi^2=28,720$ ;  $p<0,001$  при  $df=9$ ) и более быстрыми в 1,20-3,25 раза ( $\chi^2=14,359$ ;  $p<0,01$  при  $df=4$ ) темпами во все возрастные периоды психического развития детей и подростков по сравнению с мальчиками и юношами.

2. Проведенный сравнительный анализ динамики потребления алкоголя и проблем, вызываемых им, за последние 10 лет у студентов-медиков, показал достоверное сокращение распространённости трезвого образа жизни на 5,9% ( $p<0,025$ ) среди студенток младших курсов за счёт возрастания удельного веса среди них девушек, употребляющих алкоголь в режиме низкого риска на 4,5%, а также в опасном и вредном режимах на 1,4% ( $\chi^2=7,771$ ;  $p<0,05$  при  $df=2$ ), за счёт резкого, более чем 2-х кратного, повышения количества признаваемого разового и месячного потребления этанола ими.

3. Среди студентов имеет место наиболее низкий межполовой градиент среди потребителей алкоголя с вредными последствиями (девушки:юноши равный 1:1,69) по сравнению со взрослым населением.

4. Полученные факты указывают на важность постоянного мониторинга распространённости употребления алкоголя молодёжью уже начиная со школьного возраста и пропаганды трезвого образа жизни, прежде всего, среди родителей, а затем школьников и студентов при активном привлечении к этому педагогов, тренеров, священнослужителей.

### **Список литературы**

1. Алгоритм клинической диагностики алкогольной болезни печени. Инструкция по применению / Ю.В. Гаргун [и др.] Утверждена 5 декабря 2013 г. Регистрационный № 203–1213. — Минск, 2013. — 11 с.
2. Алкоголизм: Руководство для врачей / под ред. Н.Н. Иванца, М.А. Винниковой. — М.: ООО «Издательство «МИА», 2011. — 856 с.
3. Власенко, В.И. Психофизиология: методологические принципы профессионального психологического отбора: монография / В.И. Власенко; под ред. В.А. Переверзева. — Минск, 2005. — С. 53–57, 75–79, 110–112.
4. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Медицина, 1999. — 460 с.
5. Глобальная стратегия сокращения вредного употребления алкоголя / ВОЗ. — Женева, Швейцария, 2010. — 40 с.
6. Зайцев, В.М. Прикладная медицинская статистика: учеб. пособие. — 2-е изд. / В. М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И. Маринкин. — СПб: Фолиант, 2006. — 432 с.
7. Кабанов, М.М. Методы психологической диагностики и коррекции в клинике / М. М. Кабанов, А.Е. Личко, В.М. Смирнов. Л.: Медицина, 1983. — 310 с.

8. Разводовский, Ю.Е. Алкоголизация женщин как атрибут современного общества. / Ю. Е. Разводовский // Собириология. — 2018. — №2. — С. 67–70.
9. Разводовский, Ю.Е. Зиматкина, Т.И., Переверзев В.А. и др. Гендерный градиент эпидемиологических параметров алкогольной зависимости // Современные вопросы радиационной и экологической медицины, лучевой диагностики и терапии: сборник материалов Республиканской научно-практической конференции с международным участием, 24-25 сентября 2020 г. / Отв. ред. А.С. Александрович. — Гродно: ГрГМУ, 2020. — С. 248–252.
10. Состояние когнитивных функций у студентов-медиков Беларуси с различным отношением к алкоголю / М.О. Вэлком [и др.]: под ред. В.А. Переверзева. — Минск: БГМУ, 2013. — 167 с.
11. Уласень, Т.В., Ваулин С.В. Полиморфизм клинико-психологических проявлений травматических переживаний у подростков, перенесенных в условиях депривационного опыта // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2017. — Т. 16, №3. — С. 106–113.
12. Уласень, Т.В., Авдеева Т.Г., Марченкова О.Н. Диагностическая ценность методики определения неспецифических адаптационных реакций крови в оценке психического статуса у детей и подростков // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2020. — Т. 19, №1. — С. 124–130.
13. Эльконин, Д.Б. К проблеме периодизации психического развития в детском возрасте // Вопросы психологии. — 1971. — №4. — С. 6–20.
14. AUDIT : the Alcohol Use Disorders Identification Test : guidelines for use in primary health care(second edition) 18 November 2019 — Режим доступа : [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67205/WHO\\_MSD\\_MSB\\_01.6a.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67205/WHO_MSD_MSB_01.6a.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Дата доступа 13. 05. 2020
15. Gender specific trends in alcohol use: cross-cultural comparisons from 1998 to 2006 in 24 countries and regions. / Simons-Morton B.G. [et al.] // Int. J. Public Health. — 2009. — Vol. 54, №2. — P. 199–208.

## **AGE-RELATED DYNAMICS OF ALCOHOL CONSUMPTION PREVALENCE AMONG YOUNG PEOPLE OF DIFFERENT GENDERS**

---

***Blazhko A.S.<sup>1</sup>, Pereverzev V.A.<sup>1</sup> Sikorsky A.V.<sup>1</sup>, Evseev A.V.<sup>2</sup>,  
Razvodovsky Yu.E.<sup>3</sup>, Korzun D.L.<sup>4</sup>, Nikitina O.S.<sup>1</sup>, Pereverzeva E.V.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

<sup>2</sup>*Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia*

<sup>3</sup>*Republican Scientific Research Unitary Enterprise*

*«Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

<sup>4</sup>*Povolzhskaya State Academy of Physical Culture, Sports and Tourism Russia, Kazan*

**Summary.** *The prevalence of alcohol consumption and its dynamics in girls and women were significantly wider by 1.19-2.36 times ( $\chi^2 = 28.720$ ;  $p < 0.001$  with  $df = 9$ ) and faster by 1.20-3.25 times ( $\chi^2 = 14.359$ ;  $p < 0.01$  with  $df = 4$ ) rates in all age periods of mental development of children and adolescents (from 3 to 17 years, inclusive) compared with boys and young men. The obtained facts indicate the importance of constant monitoring of the prevalence of alcohol consumption by young people starting from school age and the promotion of a sober lifestyle, first, among parents serving as a direct example to their children, and then among schoolchildren and students with the active involvement of teachers and trainers, clergy.*

## ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ НЕЙРОНОВ ТЕМЕННОЙ КОРЫ И ГИППОКАМПА КРЫС С СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ВВЕДЕНИИ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

*Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Малыхина А.В.*

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

**Резюме.** Субтотальная ишемия головного мозга приводит к развитию морфофункциональных нарушений филогенетически разных отделов коры. Введение омега-3 полиненасыщенных жирных кислот положительно влияет на состояние нейронов гиппокампа крыс, приводит к уменьшению количества дегенеративных форм нейронов, оказывает противовоспалительное действие. Полученные данные могут служить основой для поиска подходов к терапии острого ишемического инсульта, что является актуальной проблемой.

**Введение.** Ранее проведенными исследованиями выявлены изменения структуры нейронов теменной коры гиппокампа у крыс с субтотальной ишемией головного мозга (СИГМ). Они проявлялись уменьшением размеров перикарионов и увеличением количества гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов [1, 2].

Учитывая важную роль  $\omega$ -3 полиненасыщенных жирных кислот (Омега-3 ПНЖК) обеспечения функционирования клеточных мембран, трансмембранных ионных каналов, синтезе местных тканевых факторов, передаче импульсов и работе рецепторов, актуально изучение их влияния на изменение структуры нейронов теменной коры и гиппокампа [3, 4].

**Цель исследования** — изучение изменений структуры нейронов теменной коры и гиппокампа крыс с субтотальной ишемией головного мозга и введением омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты проведены на 18 самцах беспородных белых крыс массой 220-260 г, разделенных на три группы по 6 крыс в каждой. В ходе исследования соблюдались все требования Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей. Крыс содержали в проветриваемом помещении при температуре 22°C, достаточном освещении, на стандартном рационе вивария, им был обеспечен свободный доступ к корму и воде.

Контрольную группу (группа 1) составили ложнооперированные крысы. Субтотальную ишемию головного мозга (группа 2) моделировали путем перевязки обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг). Крысам третьей группы до перевязки общих сонных артерий в течение недели внутрижелудочно вводили препарат Омега-3 ПНЖК в дозе 5 мг/кг массы тела. Крысам второй группы с субтотальной церебральной ишемией внутрижелудочно вводили эквиобъемное количество изотонического раствора NaCl. Животных второй и третьей групп декапитировали после 60-минутной ишемии. У крыс изучали морфологические изменения нейронов пятого слоя теменной коры и поля CA<sub>1</sub> гиппокампа. Для морфометрического исследования после декапитации быстро извлекали головной мозг и фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1%-м толуидиновым синим по

методу Ниссля. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss AG, ФРГ), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). У каждого животного оценивали не менее 30 нейронов пирамидного слоя теменной коры и поля СА<sub>1</sub> гиппокампа, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа (всего по 180 нейронов на группу). Определяли общую численную плотность нейронов (на 1 мм<sup>2</sup>). Различали нейроны интенсивности окраски цитоплазмы (хроматофилии): нормохромные — умеренно окрашенные, гиперхромные — темные, гиперхромные сморщенные — очень темные, с деформированными перикарионами, гипохромные — светло окрашенные и клетки-тени — почти прозрачные. Для изучения изменений размеров и формы перикарионов нейронов с помощью программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США) измеряли их площадь, форм-фактор ( $4\pi S/P^2$  — показатель сферичности и складчатости) и фактор элонгации ( $D_{max}/D_{min}$  — показатель потери сферичности).

Для статистического анализа полученных в эксперименте данных использовали методы непараметрической статистики. Количественные данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me — медиана, LQ — нижний квартиль; UQ — верхний квартиль. Различия между группами считали статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$  (критерий Краскела-Уоллиса).

**Результаты исследования и их обсуждение.** При субтотальной ишемии головного мозга в теменной коре и гиппокампе наблюдалось уменьшение размеров и деформация перикарионов нейронов, изменения хроматофилии их цитоплазмы. В частности, при морфометрии нейронов теменной коры и гиппокампа во второй группе с СИГМ отмечалось значительное уменьшение площади перикарионов — на 53% ( $p < 0,05$ ) и 49% ( $p < 0,05$ ), увеличение фактора элонгации тел нейронов на 20% ( $p < 0,05$ ) в каждом из изучаемых отделов коры головного мозга и уменьшение форм-фактора на — 11% ( $p < 0,05$ ) и 22% ( $p < 0,05$ ). Предполагается, что данные изменения размеров и формы (увеличение вытянутости и уменьшение сферичности) нейронов обусловлены денатурацией белка цитоскелета, а также водно-электролитными нарушениями.

Также отмечалось уменьшение количества нормохромных нейронов, увеличение количества гиперхромных нейронов и их дегенеративных форм — гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней, по сравнению с их значениями в контрольной группе на 79% ( $p < 0,05$ ), 77% ( $p < 0,05$ ), 80% ( $p < 0,05$ ) и 67% ( $p < 0,05$ ), соответственно.

Увеличение доли гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов может быть связано с денатурацией синтезированных белков в цитоплазме, вызванной развитием дегенеративных изменений гранулярной эндоплазматической сети под воздействием развивающейся гипоксии и ацидоза. Уменьшение размеров и деформация перикарионов гиперхромных нейронов может происходить вследствие потери воды из-за энергетических и ионных нарушений. Гиперхромные сморщенные нейроны утрачивают функциональную активность, что впоследствии приводит к развитию нарушений двигательной функции, расстройствам чувствительности, когнитивным нарушениям [5].

Введение Омега-3 ПНЖК не оказывало влияния на площадь и форму нейронов в теменной коре ( $p > 0,05$ ). Однако, в гиппокампе отмечено уменьшение количества гиперхромных сморщенных нейронов на 20% ( $p < 0,05$ ) с увеличением количества гиперхромных нейронов — на 31% ( $p < 0,05$ ).

Корректирующий эффект Омега-3 ПНЖК на состояние нейронов гиппокампа может быть обусловлен наличием у них антиоксидантных свойств, а также участием в регуляции клеточной проницаемости и рецепторной активности. Кроме того, полиненасыщенные жирные кислоты

оказывают благоприятное влияние на систему гемостаза, способствуют улучшению реологических свойств крови и мозгового кровообращения [3, 4]. Нейроны гиппокампа, филогенетически более древнего отдела коры головного мозга, более устойчивы к гипоксии, что, по-видимому, явилось причиной их чувствительности к корригирующему действию Омега-3 ПНЖК.

**Заключение.** Таким образом, при введении омега-3 полиненасыщенных жирных кислот выявлено их корригирующее действие в отношении состояния нейронов гиппокампа крыс с субтотальной ишемией головного мозга, проявившееся в уменьшении количества дегенеративных форм нейронов. Полученные данные могут служить основой для разработки новых подходов к корригированию повреждений головного мозга при его ишемии как одной из актуальных проблем неврологии.

### Список литературы

1. Бонь, Е. И. Гистологические изменения нейронов теменной коры головного мозга крыс с субтотальной и тотальной ишемией / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович, С.М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2020. — Т. 19. №2. — С. 23-27.
2. Максимович, Н.Е. Морфологические, цитохимические и функциональные проявления энергетических процессов в головном мозге крыс при субтотальной церебральной ишемии / Н.Е. Максимович, Е.И. Бонь, И.К. Дремза // Оренбургский медицинский вестник. — Т.7, №3. —2019. — С. 47-53.
3. Kaliannan, K. Multi-omic analysis in transgenic mice implicates omega-6/omega-3 fatty acid imbalance as a risk factor for chronic disease / K. Kaliannan, X. Li, B. Wang // Communal Biology. — 2019. — V. 2. — P. 276-280.
4. Wu, B. Antidepressant activity of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in ovariectomized rats: role of neuroinflammation and microglial polarization / B. Wu, Q. Song, Y. Zhang // Lipids Health Disease. — 2020. — V. 19. — P. 4-8.
5. Zimatkin, S.M. Dark neurons of the brain / S.M. Zimatkin, E.I. Bon // Neuroscience and Behavioral Physiology. — 2018. — V. 48. — P. 908-912.

## THE ALTERATIONS IN THE STRUCTURE OF NEURONS IN PARIETAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS IN RATS WITH SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA UNDER THE ADMINISTRATION OF OMEGA-3 FATTY ACIDS

---

*Bon E.I., Maksimovich N.E., Maksimovich N.E., Malykhina A.V.*

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

**Summary.** Subtotal cerebral ischemia leads to the development of morphofunctional disorders of phylogenetically different parts of the cortex. The introduction of omega-3 polyunsaturated fatty acids has a positive effect on the state of neurons in the rat hippocampus, leads to a decrease in the number of degenerative forms of neurons, and has an anti-inflammatory effect. The data obtained can serve as a basis for the search for approaches to the treatment of acute ischemic stroke, which is an urgent problem.

## АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КАРИОЗНОГО ДЕНТИНА ВРЕМЕННЫХ ЗУБОВ ПОД ПОКРЫТИЕМ «CLINPRO XT VARNISH»

*Бутвиловский А.В., Терехова Т.Н., Колб А.В., Бутвиловский В.Э.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** В результате исследования установлено содержание кальция, фосфора и весовые кальций/фосфорные коэффициенты, а также определены зависимости между содержанием кальция и фосфора в дентине временных зубов под покрытием «Clinpro XT Varnish» и расстоянием от дна кариозной полости. В слое до 50 мкм от дна кариозной полости под «Clinpro XT Varnish» содержание фтора составляет 2,70%, что в 3,86 раза статистически значимо больше такового для аналогичного слоя дентина под «Vitrebond» (0,70%).

**Введение.** Учитывая значительную эмиссию фторида (и, следовательно, возможность реминерализации внутреннего слоя кариозного дентина) из стеклоиономерного цемента (СИЦ) двойного отверждения «Vitrebond» («3М»), его хорошие изолирующие свойства и управление временем отверждения, M. Raadal была предложена методика приостановления кариеса зубов с использованием этого материала [4]. Данная методика предназначена для менеджмента кариеса дентина временных зубов и включает ряд этапов:

1. Удаление зубного налета.
2. Экскавация наружного слоя кариозного дентина.
3. Нанесение СИЦ тонким слоем и его полимеризация.
4. Динамическое наблюдение (раз в месяц) до приостановления кариеса по клиническим критериям и при необходимости восстановления покрытия из СИЦ [4].

Необходимость ежемесячных посещений для контроля состояния покрытия (и при необходимости его восстановления), а также отсутствие эмиссии кальция и фосфатов являются недостатками этой методики [2]. Нами предложено использование СИЦ «Clinpro XT Varnish» («3М») для приостановления кариеса временных зубов, так как этот материал имеет улучшенные физико-механические свойства и обеспечивает эмиссию фосфатов и кальция (благодаря содержанию глицерофосфата кальция) [2]. В ходе исследований установлено, что содержание фтора в материале «Clinpro XT Varnish» составляет 18,1% (12,3–21,5), что в 2,5 раза статистически значимо выше по сравнению с «Vitrebond» (7,3% (3,2–9,1)) [3]. Однако, сопоставление содержания кальция, фосфора и фтора в кариозном дентине временных зубов под данными материалами не проводилось, что и определяет актуальность данного исследования.

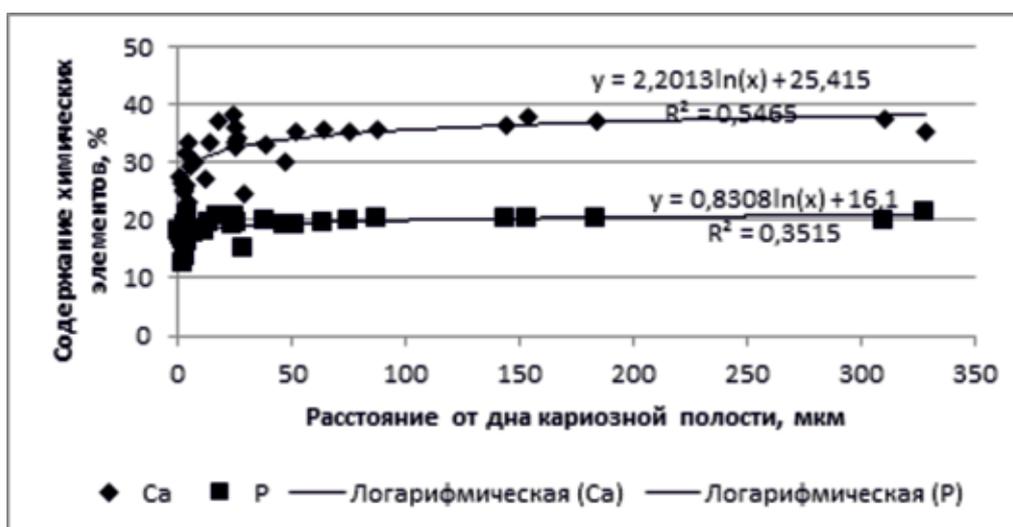
Цель исследования: проанализировать химический состав кариозного дентина временных зубов под покрытием «Clinpro XT Varnish».

**Материалы и методы исследования.** Удаленные временные зубы (n=13) очищали щеточкой с пастой без фтора, промывали водой и высушивали. В группе №1 (n=6) проводили аппликацию СИЦ «Vitrebond» («3М»), замешанного в пропорции порошок/жидкость 1:1, в группе №2 (n=7) — аппликацию СИЦ «Clinpro XT Varnish» («3М») в рекомендованной производителем пропорции. Фотополимеризация выполнялась с помощью лампы «Elipar

DeerCure S» («3M») в соответствии с инструкциями по применению исследуемых материалов. Через 24 часа зубы распиливали вдоль для последующего изготовления образцов и подвергали анализу (на предмет содержания кальция, фосфора, фтора в дентине) на рентгеновском энергодисперсионном спектрометре «INCA 350» («Oxford Instruments», Великобритания) при области возбуждения рентгеновского излучения 0,5 мкм и ускоряющем напряжении при съемке 20 кВ.

Полученные результаты обработаны методами описательной статистики, описание количественных переменных представлено в виде медианы, нижнего и верхнего квантиля Me (Q1-Q3). Достоверность различий при сравнении двух независимых групп определена по критерию U (Манна-Уитни) с критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез, равном 0,05. Достоверность различий при множественном сравнении определена по критерию Н (Краскела-Уоллиса, с критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез, равном 0,05), при апостериорных сравнениях — по критерию z с поправкой Бонферрони (с критическим уровнем значимости 0,017) [1].

**Результаты исследования и их обсуждение.** Зависимость между содержанием кальция и фосфора в дентине под покрытием «Clinpro XT Varnish» и расстоянием от дна кариозной полости показаны на рис. 1.



**Рисунок 1. — Зависимость между содержанием кальция и фосфора в дентине под покрытием «Clinpro XT Varnish» и расстоянием от дна кариозной полости**

Установлено, что с наибольшими коэффициентами аппроксимации данные зависимости описываются логарифмическими трендами: для кальция —  $y=2,20 \ln(x)+25,42$  и для фосфора —  $y=0,83 \ln(x)+16,1$ , где  $y$  — содержание химического элемента,  $x$  — расстояние от дна кариозной полости.

Содержание кальция, фосфора и кальций/фосфорные коэффициенты в слоях кариозного дентина под покрытием «Clinpro XT Varnish» представлены в таблице 1.

**Таблица 1 — Содержание кальция, фосфора и кальций/фосфорные коэффициенты в слоях кариозного дентина под покрытием «Clinpro XT Varnish»**

Слой дентина, мкм	Содержание кальция, %	Содержание фосфора, %	Значение Ca/P коэффициента
0-10	27,0 (25,2–30,4)	17,3 (15,5–18,5)	1,61 (1,54–1,71)
11-50	33,3 (30,2–36,1)	19,5 (19,0–20,2)	1,68 (1,64–1,78)
Более 50	35,7 (35,3–37,4)	20,0 (19,6–20,3)	1,83 (1,78–1,83)

При множественном сравнении содержания кальция в выделенных слоях дентина под покрытием «Clipro XT Varnish» обнаружены статистически значимые отличия ( $H=16,36$ ;  $p<0,001$ ). При апостериорных сравнениях (таблица 2) отмечено статистически значимое отличие содержания кальция в слоях 0-10 мкм (27,0% (25,2–30,4%) и более 50 мкм (35,7% (35,3–37,4%);  $z=4,04$ ,  $p<0,001$ ).

**Таблица 2 — Значения критерия z (в левом нижнем углу) и вероятность безошибочного прогноза p для попарных сравнений содержания кальция в выделенных слоях дентина под покрытием «Clipro XT Varnish»**

Слой дентина, мкм	0-10	11-50	>50
0-10		0,025	<0,001
11-50	2,24		0,051
>50	4,04	1,95	

Установлено, что содержание фосфора в выделенных слоях дентина под покрытием «Clipro XT Varnish» (таблица 1) также отличается ( $H=10,86$ ;  $p<0,01$ ). В ходе попарных сравнений выявлено статистически значимое отличие содержания фосфора (таблица 3) между слоями 0-10 мкм (17,3% (15,5–18,5%) и более 50 мкм (20,0% (19,6–20,3%);  $z=3,23$ ,  $p=0,001$ ).

**Таблица 3 — Значения критерия z (в левом нижнем углу) и вероятность безошибочного прогноза p для попарных сравнений содержания фосфора в выделенных слоях дентина под покрытием «Clipro XT Varnish»**

Слой дентина, мкм	0-10	11-50	>50
0-10		0,029	0,001
11-50	2,19		0,240
>50	3,23	1,18	

Наименьшее значение кальций/фосфорного коэффициента (1,61 (1,54–1,71)) характерно для прилежащего к модифицированному стеклоиономерному цементу слою дентина (таблица 1), большее — для слоя 11-50 мкм (1,68 (1,64–1,78), а наибольшее — для слоя более 50 мкм (1,83 (1,78–1,83)). При множественном сравнении слоев дентина по данному показателю обнаружены статистически значимые отличия ( $H=7,03$ ;  $p=0,030$ ). При последующих попарных сравнениях зафиксирован один случай  $p<p_{\text{крит}}$  при сопоставлении слоев 0-10 мкм и более 50 мкм ( $z=2,60$ ;  $p=0,009$ ). Наблюдаемые отличия содержания фтора, кальция, фосфора и значений кальций/фосфорных коэффициентов, вероятно, с высокой реакционной способностью фтора и меньшей исходной степенью деминерализации глубоких слоев пораженного кариесом дентина.

При сравнении содержания фтора в дентине под покрытиями из СИЦ установлено, что в слое до 50 мкм от дна кариозной полости под «Clipro XT Varnish» данный показатель составляет 2,70% (1,00–3,65%), что в 3,86 раза статистически значимо ( $U=79,5$ ;  $p=0,02$ ) больше такового для аналогичного слоя дентина под «Vitrebond» (0,70% (0,40–2,08%). Необходимо отметить, наличие статистически значимых отличий ( $U=39,5$ ;  $p<0,001$ ) значений кальций/фосфорных коэффициентов на глубине до 50 мкм под покрытиями «Clipro XT Varnish» (1,65 (1,57–1,78)) и «Vitrebond» (1,96 (1,78–2,52)).

#### **Заключение.**

1. Зависимости между содержанием кальция и фосфора в дентине под покрытием «Clipro XT Varnish» и расстоянием от дна кариозной полости соответственно, описываются логарифмическими трендами  $y=2,20\ln(x)+25,42$  и  $y=0,83\ln(x)+16,1$ , где  $y$  — содержание химического элемента,  $x$  — расстояние от дна кариозной полости.

2. Под покрытием «Clinpro XT Varnish» содержание кальция, фосфора и весовые кальций/фосфорные коэффициенты в слое дентина 0-10 мкм статистически значимо меньше по сравнению со слоем более 50 мкм.

3. В слое до 50 мкм от дна кариозной полости под СИЦ «Clinpro XT Varnish» содержание фтора составляет 2,70% (1,00–3,65%), что в 3,86 раза статистически значимо ( $p=0,02$ ) больше такого для аналогичного слоя дентина под СИЦ «Vitrebond» (0,70% (0,40–2,08%)).

### Список литературы

1. Гржибовский, А.М. Анализ трех и более независимых групп данных / А.М. Гржибовский // Экология. — 2008. №3. — С. 50–58.

2. Терехова, Т.Н. Научное обоснование применения модифицированного стеклоиономерного цемента «Clinpro XT Varnish» для приостановления кариеса временных зубов / Т.Н. Терехова, А.В. Бутвиловский // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2018. №3. — С. 141–146.

3. Терехова, Т.Н. Сравнительный анализ химического состава ряда стеклоиономерных цементов и содержания фтора в дентине временных зубов под покрытиями из них / Т.Н. Терехова, А.В. Бутвиловский // БГМУ — в авангарде медицинской науки и практики. Рецензируемый сборник научных трудов. — 2019. Выпуск 9. — С. 322–327.

4. Raadal, M., Interceptive versus restorative caries therapy in preschool children / M. Raadal // Eur. J. Paediatr. Dent. — 2000. Vol. 1 (1). — P. 31–33.

## ANALYSIS OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF CARIOUS DENTIN OF DECIDUOUS TEETH UNDER «CLINPRO XT VARNISH» COATING

---

*Butvilovsky A.V., Tserekhova T.N., Kolb A.V., Butvilovsky V.E.*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *As a result of the research, the content of calcium, phosphorus and weight calcium / phosphorus coefficients were determined, as well as the relationship between the content of calcium and phosphorus in the dentin of deciduous teeth under the «Clinpro XT Varnish» coating and the distance from the bottom of the carious cavity. In the layer up to 50  $\mu\text{m}$  from the bottom of the carious cavity under «Clinpro XT Varnish» the fluorine content is 2.70%, which is 3.86 times statistically significantly higher than that for a similar dentin layer under «Vitrebond» (0.70%).*

## БИОРЕГУЛЯТОРНЫЕ И НЕФРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА МЕЛАТОНИНА, ТАУРИНА И АРГИНИНА

*Бушма М.И., Басалай О.Н., Борисенок О.А.,  
Зиматкин С.М., Шейбак В.М., Михальчук Е.Ч.*

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

**Резюме.** Таурин обладает детоксицирующим, осморегулирующим и антиоксидантным действием. Регулирует рост и дифференцировку клеток. Его применяют при патологических состояниях ЦНС, заболеваниях и поражениях глаз, сердечно-сосудистой системы, сахарном диабете, интоксикациях. Аргинин — донор NO, что предопределило его применение в качестве вазодилатора и антиагреганта при АГ и стенокардии. Аминокислоту применяют при сахарном диабете и «гестационной гипертензии». Мелатонин — антиоксидант и стимулятор иммунитета. Его клиническое применение многообразно: нейродегенеративные заболевания, нарушения сна; для усиления действия лекарственных средств, применяемых при ИМ, АГ, онкологических заболеваниях. Результаты исследований, описанных в настоящем обзоре, свидетельствуют о нефрозащитных свойствах, анализируемых трех соединений. Это создает перспективу для их применения в клинической практике в качестве нефрозащитных средств при токсических нефропатиях и трансплантации почек.

**Введение.** Частота развития нефропатий колеблется в диапазоне 18-27%. У большинства пациентов патология прогрессирует с развитием хронической почечной недостаточности. В финальной стадии заболевания требуется проведение многократного диализа или трансплантация органа. Эти процедуры трудоемки, дорогостоящие и не приводят к полному излечению. Вышеизложенное свидетельствует о целесообразности разработки высокоэффективных и безопасных нефропротекторов, способных на ранних стадиях заболевания предотвратить дальнейшую манифестацию патологического процесса или оказать профилактическое действие до его развития. Несмотря на клиническую значимость патологии, до настоящего времени отсутствуют высокоэффективные и безопасные нефропротекторы. Имеющиеся литературные данные, полученные в опытах на лабораторных животных свидетельствуют о потенциальном нефрозащитном действии веществ относящихся к классу регуляторов метаболизма.

В настоящем обзоре, представлены результаты собственных исследований и литературные данные последних 20 лет, по изучению нефрозащитного действия аминокислот и мелатонина. Среди всего разнообразия первых, нефрозащитным, потенциально клинически значимым действием, обладают таурин и аргинин.

### **Мелатонин как биорегулятор**

**Фармакокинетика.** Благодаря амфифильности и малой молекулярной массе мелатонин легко проникает в клетки и субклеточные компартменты. После внутривенного введения животным гормон быстро метаболизируется в печени и почках. Экскретируется почками в виде метаболитов и исходного вещества (5%) [33].

**Фармакодинамика.** Биологическая роль мелатонина опосредована его взаимодействием со специфическими рецепторами. Семейство мембранных рецепторов мелатонина представле-

но тремя подтипами: MT1, MT2 и MT3. Они экспрессируются не только на клетках передней доли гипофиза и супрахиматических ядер, но и во многих периферических тканях. Это семейство серпентинных рецепторов, сопряженных с Gi-белками. Активация рецепторов мелатонином приводит к снижению внутриклеточного содержания цАМФ.

Недавно открытые ядерные рецепторы мелатонина относятся к подсемейству RZR/ROR ретиноидных рецепторов. Предполагается, что через них опосредуются многие иммуностимулирующие и противоопухолевые эффекты мелатонина. Гормон вовлекается в регуляцию многих функций клеток.

**Антиоксидантное действие.** Под влиянием мелатонина увеличивается активность ферментной системы антиоксидантной защиты и снижается — прооксидантной [24]. Мелатонин ингибирует активность NO-синтазы, катализирующей образование цитотоксичных NO-радикалов. Этот полезный эффект гормона расшифрован у крыс с пересаженной почкой и развившейся реакцией «трансплантат против хозяина». Мелатонин оказывает нефропротекторное действие путем снижения экспрессии генов, кодирующих синтез ядерного фактора (NF- $\kappa$ Bp65) индуцибельной NO-синтазы и каспазы-3 [23]. Кроме мелатонина, выраженными антиоксидантными свойствами обладают также и его метаболиты — гидроксимелатонин и N1-ацетил-N2-формил-5-метоксикинумарин [25].

Помимо рецепторного механизма, биологические эффекты мелатонина в значительной степени обусловлены его прямым взаимодействием со свободными радикалами кислорода, липидпероксильным радикалом и некоторыми ферментами (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза). В конечном итоге происходит защита липидов мембран от окислительного повреждения [1].

Универсальность антиоксидантного действия мелатонина продемонстрирована с использованием различных экспериментальных моделей активации перекисного окисления липидов (ионизирующее излучение, тяжелые металлы, нефротоксичные лекарственные средства) [32].

**Имуностимулирующее действие.** Мелатонин оказывает прямое иммуностимулирующее действие. Онактивируетвыработкуинтерлейкинов (IL-2, IL-6, IL-12), TNF- $\alpha$  [28]. Кроме того, гормон усиливает Т-хелперные иммунные реакции [34].

#### **Мелатонин как нефропротектор**

*Аминогликозидная нефропатия.* Введение крысам гентамицина (внутрибрюшинно, 60 мг/кг/день, 10 дней) сопровождается развитием тяжелой нефропатии. Об этом свидетельствует отсутствие нормальных проксимальных извитых канальцев корковых нефронов (ПИК КН), преобладание сильно поврежденных и погибших канальцев, а также таковых, заполненных клеточным детритом. Увеличивается внутренний диаметр и уменьшается высота выстилающих их эпителиоцитов. Содержание рибонуклеопротеинов увеличивается. В ПИК КН снижается активность щелочной и кислой фосфатаз, сукцинат- и лактатдегидрогеназ. В плазме повышается содержание мочевины и креатинина за счет снижения их экскреции с мочой. Суточный объем мочи увеличивается, регистрируется протеинурия.

Мелатонин (в желудок через зонд в виде взвеси в слизи крахмала, 10 мг/кг/день, начиная за 5 дней до и, затем, параллельно с гентамицином, 10 дней) оказывает нефрозащитное действие. Об этом свидетельствует увеличение высоты эпителиоцитов, выстилающих ПИК КН. Повышается активность щелочной фосфатазы и сукцинатдегидрогеназы [4].

Нефрозащитное действие мелатонина продемонстрировано и при другом режиме и дозировках введения нефротоксина и гормона. Введение крысам с гентамициновой (внутрибрюшинно, 80 мг/кг/день, 6 дней) нефропатией мелатонина (в желудок, 5 мг/кг/день, 6 дней) сопро-

вождается минимизацией гистопатологических изменений в почечной паренхиме. Снижается распространенность и выраженность канальцевого некроза, дистрофии и повреждения клубочков. В плазме снижается повышенное содержание креатинина и увеличивается его клиренс, нормализуется сниженная концентрация калия. Ослабляются проявления олигурии, протеинурии; увеличивается экскреция натрия [5].

**Нефропатия, вызванная цисплатин.** Введение мелатонина (внутрибрюшинно, 20 мг/кг/день) в течение 3 дней до и 2 — после введения цисплатин (внутрибрюшинно, 15 мг/кг, однократно) значительно ослабляет проявления острой почечной недостаточности. В почках уменьшается площадь очагов некроза. Это ассоциируется со снижением уровня рецептор-связанных серин/треонинпротеинкиназ 1 и 3 (RIPK1 and RIPK3). В эпителиоцитах почечных канальцев значительно уменьшается повышенный уровень экспрессии антител к молекулам, повреждающим почки (Kim-1), а также содержание TNF- $\alpha$  и интерлейкина-6. Снижается увеличенный диаметр канальцев, количество погибших эпителиоцитов в них, активность каспазы 3 и полимеразы 1. В плазме снижается содержание мочевины и креатинина [22].

**Нефропатия, вызванная колистином.** Циклический полипептидный антибиотик колистин применяют в виде ингаляций при инфекциях дыхательных путей, вызванных *Pseudomonasaeruginosa* и при муковисцидозе. В экспериментальной фармакологии его используют для моделирования тяжелой нефропатии. Так, его внутривенное введение с 12-ти часовыми интервалами в течение 7 дней, с увеличением дозы от 0,5 до 4,0 мг/кг, приводит к развитию тяжелой дозозависимой нефропатии. Параллельное внутривенное введение мелатонина (5 мг/кг/день, 7 дней) приводит к улучшению как структуры, так и функции почек. В корковом веществе почек уменьшается площадь очагов некроза, ишемии и содержание колистина. В плазме снижается повышенное содержание креатинина [5].

*Ишемически/реперфузионная нефропатия.* У крыс с ишемией/реперфузией, вызванной пережатием обеих почечных артерий в течение 45 мин., параллельное введение мелатонина (внутрибрюшинно, 50 мг/кг/день, 3 дня) оказывает нефрозащитное действие. В почечной паренхиме снижается повышенное содержание малонового диальдегида, активизируются ингибированные миелопероксидаза и супероксиддисмутаза. В плазме снижается повышенное содержание креатинина и ишемически-модифицированного альбумина [33].

**Аутоиммунный нефрит.** Пристан — насыщенный терпеноидный алкан, получаемый из печени акул, вызывает аутоиммунные заболевания у грызунов. Его однократное введение мышам (внутрибрюшинно, 500 мкл) приводит к развитию аутоиммунного нефрита. Так по истечении 6 месяцев от начала эксперимента в почках регистрируются поврежденные клубочки с увеличением их объема. Нарушается структура внутриклубочкового мезангиального матрикса. Повышается количество активно-пролиферирующих клеток и TNF- $\alpha$ . Снижается экспрессия защитного белка клеток почечной паренхимы — никотинамидадениндинуклеотид-зависимой деацетилазы, белка окислительного стресса (индуцибельной NO синтазы), а также почечного провоспалительного фактора (NF- $\kappa$ B). Мелатонин, добавленный в питьевую воду в виде 1% раствора в этаноле обладает нефрозащитным действием. Под его влиянием в значительной степени ослабляются вышеперечисленные проявления нефрита [26].

*Контраст-индуцированная нефропатия.* При внутрижелудочном введении крысам в дозах 20 и 40 мг/кг/день, в течении 4 дней он оказывает нефрозащитное действие при нефропатии, вызванной йогексолом (внутривенно, 10 мл/кг, однократно). В почечной паренхиме повышается активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, снижается содержание малонового диальдегида, а также TNF- $\alpha$ , и IL-6. В плазме снижается уровень мочевины и креатинина [9].

*Механизмы нефропротекторного действия мелатонина. Выраженное антиоксидантное действие гормона лежит в основе его нефрозащитного действия при нефропатиях, в патогенезе которых ключевую роль играет активация процессов свободнорадикального окисления и ингибирование системы антиоксидантной защиты клеток (ишемически/реперфузионные нефропатии, а также вызванные аминогликозидными антибиотиками и колистином, цисплатин и рентгено-контрастными средствами).*

*Таурин как биорегулятор*

*Фармакокинетика.* Таурин после перорального введения имеет высокую биодоступность ( $\approx 73\%$ ). Он распределяется по всем органам и тканям. Через 15 мин. наибольшая концентрация регистрируется в почках. Примерно 90% аминокислоты плазмы фильтруется в просвет капсулы Боумена-Шумлянского. В проксимальных извитых канальцах (ПИК) он частично реабсорбируется специфической транспортной системой для  $\beta$ -аминокислот с высоким сродством к таурину [8].

*Фармакодинамика: Детоксицирующее действие.* Таурин вступает в реакции конъюгации с цитотоксичными желчными кислотами с образованием малотоксичных таурохолатов, выводимых с калом. Кроме того, он является комплексоном двухвалентных катионов (ртуть, медь, кадмий) с последующей их элиминацией [2].

*Осморегулирующее действие.* Таурин — непротиеногенная аминокислота, присутствующая в высоких концентрациях во внеклеточном пространстве (плазма) и цитозоле клеток в свободном виде. Это обусловлено ее важнейшей ролью как регулятора осмотического давления, опосредованного двумя независимыми механизмами. Первый реализуется за счет положительно заряженного азота и отрицательно заряженной серы таурина. Они удерживают диполи воды. Второй механизм: таурин — регулятор внутриклеточного уровня кальция, играющего важную роль в поддержании осмотического давления. Последнее осуществляется двумя способами. Во-первых, таурин запускает триггерный механизм выброса кальция из митохондрий в цитозоль и связывается с ним по отрицательно заряженной сере. Во-вторых, аминокислота взаимодействует с мембраносвязанными ферментами (особенно фосфолипид-метилтрансферазой). Следствием этого является возрастание их каталитической активности, что сопровождается увеличением притока кальция в цитозоль. Оба «кальциевых механизма» являются важнейшими регуляторами поддержания внутриклеточного осмотического давления и внутриклеточного объема в ответ на повышение осмолярности плазмы [14]. В конечном итоге, сохраняется тургор клеток, компартментализация органелл и оптимальное протекание биохимических процессов.

*Антиоксидантное действие.* Таурин связывает цитотоксичные метаболиты ( $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ,  $O\cdot$ ,  $Cl\cdot$ ). Связываясь с последним в составе продуцируемой миелопероксидазой токсичной гипохлорной кислоты, он нейтрализует ее. Образуются стабильные хлорамины, предотвращается апоптоз. Это свойство используется с лечебной целью при поражениях тканей с исходно высокой активностью фермента (сетчатка — глазные капли тауфон) [27].

*Мембраностабилизирующее действие.* Оно обусловлено как антиоксидантным (предотвращение окислительного повреждения мембранных фосфолипидов), так и осморегулирующим (поддержание оптимального тургора клеточных мембран) действием [3]. *Регуляция роста и дифференцировки клеток.* Потребность в таурине у растущих организмов повышена. Известно, что аминокислота является стимулятором синтеза белков. В механизме ее анаболического действия играет роль не включение в состав белков (непротиеногенная аминокислота), а взаимодействие с уридином с образованием 5-тауринметилуридина. Последний модифицирует (активизирует) тРНК митохондрий [21].

*Антигипоксическое действие.* Оно продемонстрировано у крыс, подвергнутых острой гипоксической и гемической гипоксии. В механизме действия важную роль играет нормализация таурином сниженного пула аденина, энергетического обмена, а также торможение активированных процессов ПОЛ. У животных с острой гемической гипоксией повышаются сниженные значения  $pO_2$  и снижается содержание метгемоглобина [7].

*Иммунная система.* Доказано иммуностимулирующее действие таурина.

### **Таурин как нефропротектор**

*Аминогликозидная нефропатия.* У крыс с нефропатией, вызванной гентамицином (внутрибрюшинно, 100 мг/кг/день, 8 дней), параллельное введение таурина (внутрибрюшинно, 7,5 мг/кг/день) оказывает нефрозащитное действие, проявляющееся в ускорении элиминации креатинина, активации в почечной паренхиме супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [7].

Его нефрозащитные свойства проявляются и при комбинации с цинка диаспаратом (тауцин) в соотношении компонентов, соответственно 20 г/моль таурина и 1 г/моль цинка диаспартата. У крыс с нефропатией, вызванной гентамицином (внутрибрюшинно, 60 мг/кг/день, 10 дней), параллельное введение тауцина (внутрибрюшинно, 500 мг/кг/день, 10 дней) приводит к увеличению процента неповрежденных ПИК корковых и юктагломерулярных нефронов (КН, ЮН), высоты выстилающих их эпителиоцитов, активности в них ЩФ, СДГ и ЛДГ. Также уменьшается диаметр почечных телец и сосудистых клубочков КН, количество поврежденных ПИК КН и ЮН; таковых, заполненных детритом, наружный и внутренний диаметры, содержание мочевины в плазме. Нефрозащитное действие тауцина в значительной степени обусловлено таурином. Это подтверждается усилением лечебного действия комбинации средств при увеличении в ней относительного содержания таурина, но не цинка диаспартата [6].

*Нефропатия, вызванная алюминием.* Однократное внутрибрюшинное введение мышам алюминия хлорида в дозе 25 мг/кг сопровождается активацией процессов ПОЛ (увеличение в почках содержания малонового диальдегида и снижение содержания восстановленного глутатиона, активности глутатионпероксидазы и каталазы). В плазме увеличивается содержание мочевины и креатинина. Таурин, вводимый внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг/день в течение 5 дней (до нефротоксина), ослабляет проявления нефропатии [10].

*Циклоспориновая нефропатия.* Введение крысам циклоспорина (внутрибрюшинно, 25 мг/кг/день, ежедневно, 3 недели) приводит к развитию интерстициального нефрита, атрофии почечных канальцев, протеинурии и увеличению в плазме содержания креатинина, снижению его клиренса. Таурин (с питьевой водой в виде 1% раствора, начиная за 3 дня до начала введения циклоспорина, и, затем, на протяжении всего периода параллельно с ним) в значительной степени ослабляет проявления нефропатии. Кроме того, под его влиянием в почечной паренхиме ослабляются процессы ПОЛ (снижается содержание малонового диальдегида) и активизируется система антиоксидантной защиты (повышается содержание восстановленного глутатиона, активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы) [19].

*Диабетическая нефропатия.* У крыс с диабетической нефропатией, вызванной стрептозоцином (50 мг/кг/неделю, 2 недели) на фоне высокожирового и высокоуглеводного рациона, таурин (внутрижелудочно, 2,1–3,4 мг/кг/день, начиная через 1 неделю после введения стрептозацина, и, затем, на протяжении 10 недель) оказывает дозозависимое нефрозащитное действие. Оно проявляется в снижении степени тяжести течения гломерулосклероза и тубулоинтерстициального фиброза, ослаблении протеинурии и альбуминурии. В крови снижается повышенное содержание глюкозы и общего холестерина, триглицеридов и креатинина; повышается — липопротеидов высокой плотности [30].

*Ишемически/реперфузионная нефропатия.* У крыс с ишемией/реперфузией, вызванной пережатием обеих почечных артерий в течение 40 мин., однократное внутривенное введение таурина (7,5 мг/кг) в период реперфузии оказывает нефрозащитное действие. В плазме снижается повышенное содержание креатинина и малонового диальдегида и увеличивается — восстановленного глутатиона. В почках увеличивается содержание последнего и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [37].

В опытах с добавлением аминокислоты в питьевую воду (1% раствор) крыс с ишемией (60 мин)/реперфузией почек также продемонстрировано его нефрозащитное действие. Увеличивается как масса почек, так и коэффициент ее отношения к массе тела, нормализуется сниженный диурез и осмолярность мочи. Микроскопические исследования почечной паренхимы свидетельствуют о восстановлении структуры органа. Регистрируется лишь незначительный процент канальцев с кистозными расширениями [15].

**Механизмы нефропротекторного действия таурина.** Учитывая то обстоятельство, что аминокислота имеет высокую тропность к почечной паренхиме, предполагается, что ее полезные биологические свойства реализуются преимущественно в этом органе. Основную роль в нефрозащитном действии таурина играют его антиоксидантные свойства (большинство нефропатий), способность повышать ингибированный трансмембранный перенос  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и некоторых органических соединений (аминогликозидная нефропатия), образовывать нетоксичные комплексы с металлами (нефропатия, вызванная алюминием), способность тормозить апоптоз (циклоспориновая и диабетическая нефропатии); осморегулирующее и мембраностабилизирующее действие (контраст-индуцированная нефропатия).

#### **Аргинин как биорегулятор**

*Фармакокинетика.* Биодоступность L-аргинина при введении в желудок составляет примерно 70% с пиковой концентрацией в плазме через 90 мин.

Аргинин попадает внутрь клетки с помощью специфических транспортных систем: CAT-1 и CAT-2b (транспортёры катионных аминокислот) [17]. В эндотелиоцитах под влиянием эндотелиальной кальций-зависимой изоформы NO-синтазы из аминокислоты синтезируется NO. NO быстро окисляется до  $\text{NO}_2$  и  $\text{NO}_3$ . Последний элиминируется почками. После введения в желудок аргинина пиковая концентрация оксида азота в моче регистрируется через 120 мин, а после внутривенной инфузии — через 30 мин [18].

Кроме экзогенного аргинина, источником аминокислоты для клеток служит его синтез из цитрулина (продукт метаболизма аргинина). Последний образуется в тонком кишечнике и попадает в системный кровоток. Примерно 80% захватывается эпителиоцитами проксимальных извитых канальцев почек, где аргинин синтезируется *de novo*. Это феномен известен как кишечно-почечная циркуляция аргинина [13].

#### **Фармакодинамика.**

**Регуляция тонуса сосудов.** Способность аргинина расширять периферические сосуды обусловлена образованием из его молекулы NO. Внутривенное введение крысам 3г L-аргинина сопровождается снижением систолического и диастолического артериального давления, общего периферического сопротивления и сердечного выброса [12].

**Ингибирование агрегации тромбоцитов.** Синтезируемый из аргинина NO активирует гуанилатциклазу тромбоцитов с образованием ц-ГМФ. Последний ингибирует их агрегацию [12].

*Регуляция воспаления.* При развитии воспалительного процесса активируются макрофаги. Это сопровождается повышенной утилизацией аргинина. В M1 макрофагах он используется преимущественно для синтеза NO [36]. Однако это не компенсирует их высокую потребность

в аминокислоте. Альтернативным источником аргинина для них является его синтез *denovo*. М2 макрофаги, в отличие от М1 популяции, используют аргинин не для поддержания воспаления (биосинтез NO), а для активизации процессов репарации тканей после воспаления. Этот процесс обусловлен присутствием в них аргиназы, которая конкурирует с NO<sub>2</sub>-синтазой за аргинин и является частью противовоспалительного ответа. Вызванное аргиназой истощение аргинина приводит к подавлению активации, пролиферации и дифференцировки провоспалительных Т-клеток [13].

*Регуляция функций ЦНС.* Подкожное (6 мг/кг) введение L-аргинина крысам на модели активного и пассивного избегания улучшает обучение активному избеганию при электрическом раздражении. Эти эффекты опосредуются различными изоформами NO-синтазы — главным образом, нейрональной и индуцибельной [29].

#### **Аргинин как нефропротектор**

*Аминогликозидная нефропатия.* У крыс с нефропатией, вызванной гентамицином (под кожу, 100 мг/кг/день, 7 дней), параллельное применение L-аргинина (с питьевой водой 2 г/л, 7 дней) оказывает нефрозащитное действие, проявляющееся в снижении мочевины и креатинина в плазме, гентамицина в моче, уменьшении площади почечной паренхимы с дегенеративными изменениями, повышении клиренса креатинина [31].

**Нефропатия, вызванная золотом.** Внутривентриальное введение крысам в течение 7 дней 50 мкл наночастиц золота (диаметр 10 нм) сопровождается развитием нефропатии. В почках активируются процессы перекисного окисления липидов (повышается содержание малонового диальдегида и снижается — глутатиона). В плазме повышается содержание мочевины и креатинина. Аргинин (внутрибрюшинно, 200 мг/кг/день, 7 дней) ослабляет вышеперечисленные проявления нефропатии [16].

*Нефропатия, вызванная цинком.* Внутривентриальное введение крысам 600 мг/кг/день наночастиц цинка оксида в течение 5 дней приводит к формированию нефропатии. Аргинин (в желудок, 200 мг/кг, 21 день) оказывает нефрозащитное действие. Оно проявляется снижением в плазме повышенного содержания креатинина, провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , CRP и IL-6), IgG, фактора роста эндотелия сосудов и увеличением в почечной паренхиме содержания глутатиона [35].

*Циклоспориновая нефропатия.* Введение крысам циклоспорина (под кожу, 7,5 мг/кг/день, 28 дней) сопровождается развитием нефропатии. Об этом свидетельствует снижение скорости клубочковой фильтрации и экскреции метаболитов NO (NO<sub>2</sub> и NO<sub>3</sub>), увеличение площади зон тубулоинтерстициального фиброза и атрофии почечных канальцев, поражении почечных сосудов (гипертрофия гладкомышечных клеток афферентных артериол и их инфильтрация эозинофилами). L-аргинин в форме порошка (1,7 г/кг диеты), начиная с 5-го дня после введения циклоспорина оказывает нефрозащитное действие. Оно проявляется в ослаблении всех вышеперечисленных показателей нефропатии [11].

Применение циклоспорина (однократно, под кожу, 2,5 мг/кг) у крыс с трансплантацией здоровых почек с целью профилактики реакции «трансплантат против хозяина» сопровождается развитием нефропатии. Использование питьевой воды, обогащенной L-аргинином (1% раствор), обладает нефрозащитным действием. Это подтверждается увеличением сниженной скорости клубочковой фильтрации и интенсивности почечного кровотока, снижением сопротивления почечных сосудов. Снижается вероятность тромбоза почечных сосудов, тубулоинтерстициального отека, инфильтрации моноцитами и макрофагами [20].

**Нефропатия, вызванная цисплатином.** У крыс со стрептозаациновым диабетом цисплатин (внутрибрюшинно, 2,5 мг/кг/день, 12 дней) оказывает выраженное нефротоксическое дей-

ствии. Снижается масса тела животных, регистрируется выраженное повреждение почечной паренхимы. В плазме повышается содержание мочевины, креатинина и малонового диальдегида. L-аргинин (внутрибрюшинно, 150 мг/кг/день, 12 дней) оказывает нефрозащитное действие, проявляющееся в значительном ослаблении вышеперечисленных проявлений нефротоксичности [38].

**Механизмы нефропротекторного действия аргинина.** Биологическая роль аргинина в значительной степени определяется его ролью в регуляции тонуса сосудов и ингибировании процессов тромбообразования. Он является субстратом NO-синтазы. Генерируемый ферментом NO обладает выраженным вазодилаторным эффектом и способностью тормозить функцию тромбоцитов. Следовательно, при вышеперечисленных нефропатиях в патогенезе которых ключевую роль играет ишемическое повреждение органа, аргинин оказывает нефрозащитное действие.

**Заключение.** Таурин обладает детоксицирующим, осморегулирующим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим, антигипоксическим, иммуностимулирующим действием. Он является одним из регуляторов роста и дифференцировки клеток. Аргинин — донор NO, что предопределило его применение в качестве вазодилатора и антиагреганта. Мелатонин — антиоксидант и стимулятор иммунитета. Результаты экспериментальных исследований, представленных в настоящем обзоре, свидетельствуют о нефрозащитных свойствах трех соединений. Это создает перспективу для их применения в клинической практике в качестве безопасных и эффективных нефрозащитных лекарственных средств при токсических нефропатиях и трансплантации почек.

### Список использованной литературы

1. Анисимов, В.Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике / В.Н. Анисимов. — Санкт-Петербург: Система, 2007. — 40 с.
2. Антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффект таурина / М. А. Огай [и др.] // Вестн. ВГУ. — 2011. — № 1. — С. 186–191.
3. Кушнарера, Е. А. Мембраномодифицирующий эффект таурина / Е. А. Кушнарера, Е. Ю. Паршина, А. Г. Платонов // Биофизика. — 2012. — Т. 57, № 4. — С. 641–648.
4. Лечебное действие мелатонина при гентамициновой нефропатии у крыс / О.А. Борисенок [и др.] // Токсикологический вестник. — 2011. — № 4. — С. 57–59.
5. Морфофункциональные изменения почек крыс при применении мелатонина на фоне развития гентамицин-индуцированного острого повреждения почек / Дудка Е.А. [и др.] // Вестник морфологии. — 2018. — № 1, Т. 24. — С. 5–10.
6. Нефрозащитное действие комбинации таурина с цинка диаспартатом при гентамициновой нефропатии у крыс / О. Н. Басалай, Е. Ч. Михальчук, С. М. Зиматкин, М. И. Бушма, О. А. Борисенок // Токсикол. вестн. — 2015. — Т. 134, № 5. — С. 21–24.
7. Торкунов, П. А. Действие нового производного таурина при различных вариантах гипоксических состояний / П. А. Торкунов // Эксперим. и клин. фармакология. — 2000. — Т. 63, № 1. — С. 37–40.
8. Шейбак, В. М. Биосинтез и обмен таурина / В. М. Шейбак, Л. Н. Шейбак // Журнал ГрГМУ. — 2005. — № 1. — С. 9–12.
9. A novel approach to contrast-induced nephrotoxicity: the melatonergic agent agomelatine / AdemKaraman [et al.] // Br J Radiol. — 2016. — Vol. 89. — P. 2015–2016.
10. Al Kahtani, M. A. The influence of taurine pretreatment on aluminum chloride induced nephrotoxicity in Swiss albino mice / M. A. Al Kahtani, A. M. Abdel-Moneim, W. M. El-Sayed // Histol. Histopathol. — 2014. — Vol. 29, № 1. — P. 45–55.

11. Andoh, Takeshi F. Protective effects of dietary L-arginine supplementation on chronic cyclosporine nephrotoxicity / Takeshi F. Andoh, Michael P. Gardner, William M. Bennett // *Transplantation*. — 1997. — Vol. 64. — P. 1236–1240.
12. Arginine and ornithine are the main precursors for citrulline synthesis in mice / J. C. Marini [et al.] // *J. Nutr.* — 2012. — Vol. 142. — P. 572–580.
13. Arginine deficiency leads to impaired cofilin phosphorylation in activated human T lymphocytes / N. Feldmeyer [et al.] // *Int. Immunol.* — 2012. — Vol. 24. — P. 303–313.
14. Bidri, M. Taurine: a particular amino acid with multiple functions / M. Bidri, P. Choay // *Ann. Pharm. Fr.* — 2003. — Vol. 61, №6. — P. 385–391.
15. Differential effects of taurine treatment and taurine deficiency on the outcome of renal ischemia reperfusion injury / Mahmood S Mozaffari [et al.] // *J Biomed Sci.* — 2010. — Vol. 17. — P. 1–32.
16. Effects of quercetin and arginine on the nephrotoxicity and lipid peroxidation induced by gold nanoparticles in vivo / Mohamed Anwar K Abdelhalim [et al.] // *Int J Nanomedicine*. — 2018. — Vol. 13. — P. 7765–7770.
17. Fotiadis, D. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters / D. Fotiadis, Y. Kanai, M. Palacin // *Mol. Aspects Med.* — 2013. — Vol. 34. — P. 139–158.
18. Glutamine is an important precursor for de novo synthesis of arginine in humans / G. C. Ligthart-Melis [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2008. — [et al.] // Vol. 87. — P. 1282–1289.
19. Hagar, H. H. Taurine attenuates hypertension and renal dysfunction induced by cyclosporine A in rats / H. H. Hagar, E. Etter, M. Arafa // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* — 2006. — Vol. 33, №3. — P. 189–196.
20. L-Arginine Supplementation Improves Function and Reduces Inflammation in Renal Allografts / H. C. VOS INGRID [et al.] // *JASN*. — 2001. — Vol. 12. — P. 361–367.
21. Maternal taurine supplementation in the late pregnant rat stimulates postnatal growth and induces obesity and insulin resistance in adult offspring / K. Hultman [et al.] // *J. Physiol.* — 2007. — Vol. 579. — P. 823–833.
22. Melatonin Attenuates Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury through Dual Suppression of Apoptosis and Necroptosis / Jong Woo Kim [et al.] // *Biology (Basel)*. — 2019. — Vol. 8. — P. 53–64.
23. Melatonin modulates endoplasmic reticulum stress and Akt/GSK3-beta signaling pathway in a rat model of renal warm ischemia reperfusion / A. T. K. Hadj [et al.] // *Anal. Cell Pathol.* — 2015. — Vol 15. — P. 635172.
24. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? / R. Jockers [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* — 2008. — Vol. 154, №6. — P. 1182–1195.
25. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs / R.J. Reiter [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 75. — P. 1299–1321.
26. NLRP3 inflammasome modulation by melatonin supplementation in chronic pristane-induced lupus nephritis / Francesca Bonomini [et al.] // *Int J Mol Sci.* — 2019. — Vol. 14. — P. 3454–3466.
27. Oral taurine supplementation prevents the development of ethanol-induced hypertension in rats / H. Harada [et al.] // *Hypertens Res.* — 2000. — Vol. 23, №4. — P. 277–284.
28. Pandi-Perumal, S. R. The role of melatonin in immunoenhancement: Potential application in cancer / S. R. Pandi-Perumal, A. I. Esquifino, D. P. Cardinali // *Int. J. Exp. Pathol.* — 2006. — Vol. 87. — P. 81–87.
29. Plech, A. Effect of L-arginine on memory in rats / A. Plech, T. Klimkiewicz, B. Maksym // *Pol. J. Pharmacol.* — 2003. — Vol. 55, №6. — P. 987–992.

30. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy / S. Lin [et al.] // J. Biomed. Sci. — 2010. — Vol. 17, № 1 — P. 3–8.
31. Protective effect of L-arginine on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats / Əbrahim Baəohan [et al.] // Indian J Pharmacol. — 2014. — Vol. 46. — P. 608–612.
32. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: A review / J. J. Garcia [et al.] // J. Pineal Res. — 2014 — Vol. 56. — P. 225–237.
33. Reiter, R. J. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology / R. J. Reiter, D. X. Tan, M. D. Maldonado // J. Pineal Res. — 2005. — Vol. 39. — P. 215–216.
34. Role of melatonin in neurodegenerative diseases / V. Srinivasan [et al.] // Neurotox. Res. — 2005. — Vol. 7. — P. 293–318.
35. Role of quercetin and arginine in ameliorating nano zinc oxide-induced nephrotoxicity in rats / Laila M Faddah [et al.] // BMC Complement Altern Med. — 2012. — Vol. 12. — P. 42–60.
36. Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1 / J. E. Qualls [et al.] // Cell Host Microbe. — 2012. — Vol. 12. — P. 313–323.
37. The effect of taurine on renal ischemia /reperfusion injury / G. Guz [et al.] // Amino Acids. — 2007. — Vol. 32. — P. 405–411.
38. The Protective Effect of L-arginine in Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Streptozotocin-induced Diabetic Rats / Fatemeh Gharibi [et al.] // Adv Biomed Res. — 2017. — Vol. 6. — P. 100–111.

## **BIOREGULATORY AND NEPHROPROTECTIVE PROPERTIES OF MELATONIN, TAURINE AND ARGININE**

---

*Bushma M.I., Basalai O.N., Borisenok O.A., Zimatkin S.M., Sheibak V.M., Mikhalchuk E.C.*

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

**Summary.** *Taurine has detoxifying, osmoregulating and antioxidant effects. It regulates cell growth and differentiation. It is used in pathological conditions of the central nervous system, diseases and lesions of the eyes, the cardiovascular system, diabetes mellitus, intoxications. Arginine is a donor of NO, which predetermined its use as a vasodilator and antiaggregant in hypertension and coronary heart disease. The amino acid is used in diabetes mellitus and «gestational hypertension.» Melatonin is an antioxidant and immune stimulator. Its clinical application is diverse: neurodegenerative diseases, sleep disorders; to enhance the effect of drugs used in MI, hypertension, oncological diseases. The results of the studies described in this review indicate the nephroprotective properties of the three compounds. This creates a prospect for their use in clinical practice as nephroprotective agents for toxic nephropathies and kidney transplantation.*

## БИОХИМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК В УКРЕПЛЕНИИ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

---

*Величко М. Г.<sup>1</sup>, Кравчик Е. Г.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», г. Гродно, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь*

**Резюме.** Обобщены данные литературы и собственные исследования о биологически активных добавках и потребление их в пищу студентов-спортсменов. Указаны основные причины, по которым студенты-спортсмены используют БАД и даны характеристики химического состава основных БАД применяемых для увеличения мышечной массы и сил мышц.

Питание является не только определяющим фактором, формирующим здоровье, но также и предупреждающим звеном при формировании предпосылок метаболического дисбаланса при адаптации организма к стресс- агентам внешней и внутренней среды. Ежедневный рацион человека должен быть сбалансирован не только по белкам, жирам и углеводам, но и содержать необходимые биокатализаторы в оптимальных дозах для эффективного протекания биохимических реакций, участвующих в их превращениях в процессах анаболизма и катаболизма. Сбалансированное питание предусматривает научно обоснованное оптимальное количество сбалансированных между собой питательных веществ (белков, жиров, углеводов, минеральных веществ, витаминов, пищевых волокон, воды); хорошую усвояемость пищи, зависящую от ее состава и способа приготовления. Однако, на сегодняшний день следует признать, что для коррекции недостаточного питания необходима дополнительная нутриционная поддержка, осуществляемая парентеральным и энтеральным путем.

Биологически активные добавки (БАД) к пище можно применять в виде различных лекарственных форм - порошков, сиропов, настоев, экстрактов, таблеток, капсул [1, 6]. Они получают из растительного, животного или минерального сырья, используя для этого химические и биотехнологические способы [2].

По данным литературы БАД применяются для следующих целей: во-первых, для быстрого восполнения дефицита полиненасыщенных жирных кислот, незаменимых аминокислот, водорастворимых витаминов, пищевых волокон и экстрактивных веществ, макро и микроэлементов. Это позволяет составить рацион наиболее оптимального соотношения питательных и веществ с учётом их энергетического вклада при расчете энергозатрат конкретного человека.

Во-вторых, для регулирования массы тела при уменьшении калорийности рациона, не нарушая обменные процессы организма [3, 7].

В-третьих, удовлетворение в пищевых веществах при разных заболеваниях, благодаря включению в диету соединений, снижающих нагрузку на поражённые патологические процессы и метаболические звенья [7, 8].

В соответствии с СанПиНом Постановление № 193 от 20 ноября 2012 г. в РБ для производства БАД к пище могут быть использованы : Пищевые вещества, содержащие белки; жиры,

жироподобные вещества; жиры рыб и морских животных; индивидуальные полиненасыщенные жирные кислоты, выделенные из пищевых источников; углеводы и продукты их переработки; крахмал и продукты его гидролиза; инулин и другие полифруктозаны; глюкоза, фруктоза, лактоза, лактулоза, рибоза, ксилоза, арабиноза; витамины, витаминоподобные вещества и коферины; минеральные вещества (макро- и микроэлементы: кальций, фосфор, магний, калий, натрий, железо, йод, цинк, бор, хром, медь, сера, марганец, молибден, селен, кремний, ванадий, фтор, германий, кобальт); минорные компоненты пищи, пробиотики и пребиотики; различные классы олиго- и полисахаридов; биологически активные вещества - иммунные белки и ферменты, лизоцим, лактоферрин, лактопероксидаза, бактериоцины молочнокислых микроорганизмов, за исключением препаратов из тканей и жидкостей человека; растения (пищевые и лекарственные), продукты моря, рек, озер, пресмыкающиеся, членистоногие, минерало-органические или минеральные природные субстанции (в сухом, порошкообразном, таблетированном, капсулированном виде, в виде водных, спиртовых, жировых сухих и жидких экстрактов, настоев, сиропов, концентратов, бальзамов): мумие, спирулина, хлорелла, дрожжи инактивированные и их гидролизаты, цеолиты; продукты пчеловодства: маточное молочко, прополис, воска, цветочная пыльца, перга [13, 15].

При этом в БАД не должно быть производных из растений содержащие сильнодействующие, наркотические или ядовитые вещества, веществ, не свойственных пище, пищевым и лекарственным растениям, синтетических аналогов активно действующих начал лекарственных растений (не являющиеся эссенциальными факторами питания), гормонов, антибиотиков, тканей и органов человека, потенциально опасных тканей животных, их экстракты и продукты, спорозоносных микроорганизмов; представители родов и видов микроорганизмов, среди которых распространены условно-патогенные варианты микроорганизмов; живые дрожжи [3, 10].

Несмотря на отсутствие белкового и энергетического дефицита в питании людей, выполняющих повышенную физическую нагрузку, существующие пищевые рационы не обеспечивают необходимого количества минеральных веществ, витаминов, пищевых волокон для данной категории лиц [4, 9].

Данные белорусских ученых свидетельствуют, что в питании белорусов присутствует избыток животных жиров (сливочное масло, сало, жирное мясо), крайне низкое потребление рыбы (7-8 кг в год), в то время как в развитых странах рыбу потребляют до 40 кг в год. [12]

Анализ научных и промышленных разработок в данной области свидетельствует, что объектами для создания физиологически функциональной пищи для групп населения, занимающихся усиленной физической нагрузкой, являются зерновые и молочные продукты, жиры, детское питание, безалкогольные напитки как продукты постоянного и массового применения [15].

Сбалансированное питание предусматривает научно обоснованное оптимальное количество сбалансированных между собой питательных веществ (белков, жиров, углеводов, минеральных веществ, витаминов, пищевых волокон, воды); хорошую усвояемость пищи, зависящую от ее состава и способа приготовления [11]. Однако, на сегодняшний день следует признать, что для коррекции недостаточного питания необходима дополнительная нутриционная поддержка, осуществляемая парентеральным и энтеральным путем.

Разнохарактерность обменных изменений при усиленной физической нагрузке и отсутствие по сей день обобщающих данных о компенсаторных возможностях организма в этих условиях являются серьезными препятствиями для осуществления унифицированного подхода к разработке эффективных немедицинских мероприятий и вынуждают расширить круг поиска профилактических средств, ослабляющих воздействие и мобилизующих защитные силы орга-

низма при дозированных физических нагрузках. Большинство опубликованных научных работ по обменным процессам, при физической нагрузке посвящено изучению нарушений липидного, углеводного, минерального и отчасти витаминного обмена. На наш взгляд обмену витаминов и микроэлементов должно уделяться основное внимание, так как современная технология приготовления пищи и рафинирование продуктов питания приводит к снижению уровня потребления антиоксидантов, необходимого для защиты организма от повреждающего действия свободных радикалов и предупреждения развития окислительного стресса [5]. Результаты многочисленных исследований убедительно доказали целесообразность использования низкомолекулярных антиоксидантов и, в первую очередь, витаминов для профилактики хронических процессов, вызываемых воздействием постоянно присутствующих во внешней среде радикализирующих факторов, таких как минеральная пыль, ксенобиотики, радиация [6, 7]. Известно, что синтетические препараты витаминов на 50% менее активны, чем природные, поскольку представляют собой рацемические смеси стереоизомеров [8, 10]

Воздействие на организм человека физических упражнений выражается в увеличении резервных возможностей, т.к. регулярная физическая тренировка значительно повышает потенциал всех систем и органов человека, следует отметить, что в состоянии покоя все системы и органы тренированного человека работают более экономно [4, 9].

Кроме того, регулярные физические упражнения позволяют повысить двигательную активность и компенсировать вредное воздействие гипокинезии [10]. Особое внимание заслуживает трофический (питающий) эффект физической нагрузки [11, 14]. Выполняя дозированную мышечную работу, человек активно воздействует на все внутренние органы. Благодаря этим связям органов с мышцами происходят многочисленные изменения, поэтому эффективность мышечной деятельности отражается как на отдельных двигательных функциях организма, так и по общей его устойчивости (резистентности) при действии неблагоприятных факторов внешней среды [8]. Одной из важных задач в спорте высоких достижений является мобилизация резервных возможностей организма спортсмена без применения допинга. Современный большой спорт предъявляет к спортсменам высокие требования в отношении их физической подготовленности [15]. Эмоциональные и физические перенапряжения, сопровождающие тренировки, соревнования можно отнести к группе высокого риска заболеваемости. Все это диктует определенные требования к проведению восстановительных мероприятий, включая прием сбалансированных пищевых добавок т.к. даже усиленное и сбалансированное питание не может обеспечить спортсмена всем комплексом необходимых макро и микроэлементов, витаминов, аминокислот, ферментов, биофлавоноидов, адаптогенов, антиоксидантов [3, 10, 15]. Перспективным направлением в решении данного вопроса является введение в рацион питания спортсмена биологически активных добавок на основе растительного сырья антиоксидантного действия, включая водоросли, обогащенные микроэлементами (йодом, цинком, селеном и др.) Поддержание иммунного статуса организма спортсмена осуществляется при помощи универсальных препаратов, условно называемых адаптогенами (как растительного, так и животного происхождения) [5]. Сочетанное применение различных адаптогенов, их комбинаций значительно усиливают тонизирующий и адаптогенный эффект [6, 10]. Одни витаминные комплексы способствуют нормализации течения биохимических реакций в организме, предотвращение развития авитаминоза. Иногда применяется комплекс, содержащий кофакторы и субстраты цикла Кребса (липоевая кислота, кокарбоксилаза, рибофлавинмононуклеотид, пантотенат кальция), другие — являются специализированными спортивными препаратами, содержащими, наряду с комплексом витаминов, сбалансированный микроэлементный состав, поэтому их применение именно в подготовительном периоде является наиболее предпочтительным [10].

На фоне применения энергооптимизирующих препаратов происходит нормализация субклеточного и клеточного уровня, повышается физическая работоспособность, нормализуется биоэлектрическая активность миокарда, уменьшаются астеноневротические проявления [5, 12].

В данных литературы приведены сведения о возможности применения в качестве профилактического средства препаратов целенаправленного метаболического действия. «Сплато-холм» - биологически активная добавка, представляющая собой комбинированный продукт из спирулины (*Spirulina platensis*) и сухого экстракта солянки хромовой (*Salsola collina*) производства ПО «Конверсия», г. Москва. «Метовит» и «Кардиовит» созданы на основе результатов фундаментальных исследований по изучению взаимосвязи обмена витаминов между собой и с обменом других биологически активных соединений. Соединения, входящие в состав обоих препаратов, являются естественными компонентами живых клеток, легко усваиваются и быстро метаболизируются. Активирующий эффект, вызванный ведением препаратов, имеет пролонгированный характер [10].

Соотношение ингредиентов в этих препаратах строго подобраны с целью создать в тканях организма условия для активации обмена экзогенного метионина (компонента препарата) по пути транссульфирования трансметилювания. Указанные процессы являются лимитирующими, а клеточном обмене, и их активация приводит к активации биохимических реакций, генерирующих энергию (окисление жиров, углеводов) и, соответственно, процессов, нуждающихся в энергии (синтез белков и др.). Препараты предназначены для повышения жизнеспособности организма в неблагоприятных условиях. Активация процессов транссульфирования и трансметилювания способствует повышению синтеза глутатиона — природного пептида, который является важным компонентом биохимической системы антиоксидантной защиты организма и принимает участие в реакциях детоксикации чужеродных соединений. Созданные условия способствуют, в частности, более эффективному использованию в клетках витаминов, входящих в состав препарата (активирует синтез их биологически активных форм — коферментов), благодаря чему их дозы в препарате близки к физиологическим.

Цель исследования: провести анализ современных биологически активных добавок, используемых в питании человека.

Нами проведено анкетирование студентов-спортсменов факультета физической культуры УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы» для выявления их отношения к биодобавкам и употреблению их к пище. В анкете участник отмечал возраст, вид спорта, время приема, стоимость БАД и самочувствие после использования биологически активных добавок.

Основными причинами, по которым студенты-спортсмены принимали БАД, были получение дополнительной энергии, поддержание здоровья на фоне интенсивных нагрузок повышения эффективности тренировок, устранения болей в мышцах и суставах, улучшения настроения, изменения состава тела или прямое влияние на эффективность спортивного выступления за счет восполнения макро и микроэлементов, вследствие возникающего дисбаланса в водно-солевом обмене. При этом в основе выбора БАД участники данного опроса указывали на соответствие состава применяемой добавки виду спорта (характеру расходования энергии), индивидуальная потребность спортсмена, безопасность и эффективность. Приобретаются биологически активные добавки, которые содержат незаменимые аминокислоты, регулирующие синтез белка и способствующие не только наращиванию мышечной массы, но и увеличению силовых показателей.

К ним относятся **Протеин**, который изготовлен из концентрата сывороточного белка, **креатин**, который является естественным метаболитом в человеческом теле, усиливает анаболи-

ческие процессы, стимулирует рост мышечных белков, укрепляет силу мышц и увеличивает гидратацию мышечных клеток. Поддерживает быстрое развитие мускулатуры. **Л-Карнитин** является природным веществом, увеличивает выносливость организма, предотвращает усталость и значительно ускоряет снижение жира в организме [7, 10].

Заключение. Таким образом, следует заключить, что основными компонентами, которые входят в состав биодобавок являются витамины (например, витамин А); минералы (например, железо, магний); питательные вещества (например, аминокислоты, жирные кислоты); вещества физиологического действия (например, растительные экстракты, дрожжевые споры, молочнокислые бактерии).

На основании анкетных данных было выявлено 3 группы биологических активных добавок, которые использовали студенты. БАД можно разделить в зависимости от их происхождения и функции, а именно, нутрицевтики - вещества, применяемые для коррекции химического состава пищи человека; парафармацевтики - вещества, в которых основным действующим началом являются экстракты и травяные формулы (фитопрепараты); пробиотики - живые полезные бактерии, которые восстанавливают естественную микрофлору в организме.

По нашему мнению, население сейчас активно покупает биологически активные добавки, с целью сохранения здоровья, поэтому и рынок биодобавок значительно вырос, стали доступны разнообразные биодобавки с разным положительным действием на системы органов человека. Наиболее часто покупают Omega 3 Solgar, Пантовигар, Омега макс, Кальцемир, основными функциями которых является профилактика сердечно-сосудистых заболеваний, остеохондроза, улучшает работу головного мозга и т.д. Среди спортсменов наиболее часто приобретают: протеин, Л-карнитин, ВСАА, креатин применение которых способствует увеличению мышечной массы и силы мышц, а также укрепление связок и суставов.

### Список литературы

1. Активные компоненты БАД [Электронный ресурс] — Режим доступа: [https://fitomarket.ru/catalog/vitaminy\\_i\\_mineraly/zhenskoe\\_zdorove/](https://fitomarket.ru/catalog/vitaminy_i_mineraly/zhenskoe_zdorove/) — дата доступа: 14.04.2020.
2. Белоусова, О.В., Белоусов, Е.А., Иващенко, А.О. Биологически активные добавки как перспективное направление развития фармацевтического рынка// О.В. Белоусова, Е.А. Белоусов, А.О. Иващенко. — Белгород, 2016. — С. 17-20.
3. Беспалов, В.Г., Некрасова, В.Б. Биологически активные добавки к пище и возможности их использования в профилактической медицине// В.Г. Беспалов, В.Б. Некрасова — Санкт-Петербург, 2019. — 196 с.
4. Биологически активные добавки в спорте [Электронный ресурс] -Режим доступа: <https://re-sport.ru/articles/sportivnaya-meditsina/biologicheskii-aktivnye-dobavki-v-sporte/>— дата доступа: 10.06.2020.
5. Биологически активные добавки в спорте [Электронный ресурс]-Режим доступа: <https://re-sport.ru/articles/sportivnaya-meditsina/biologicheskii-aktivnye-dobavki-v-sporte/>— дата доступа: 14.04.2020.
6. Биологически активные добавки к пище. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://cgie.62.rospotrebnadzor.ru/info/gigiena-okryj-sredi/145639/>: 11.03.2021.
7. Врачи о пользе и вреде биодобавок [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://snob.ru/entry/167345/>- дата доступа: 10.05.2020.
8. Для чего нужны пищевые добавки [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://zdravcity.ru/blog-o-zdorovie/zachem-nuzhny-bady/>- дата доступа: 15.05.2020.

9. Как выбирать биодобавки спортсменам [Электронный ресурс]– Режим доступа: <https://market.yandex.by/journal/expertise/kak-vibrat-vitamini-dlja-sportsmenov?type=expertise&semanticId=kak-vibrat-vitamini-dlja-sportsmenov&lr=0&rtr=10274>- дата доступа: 10.06.2020.
10. Медицинская точка зрения о БАД [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://medconfer.com/node/11609>- дата доступа: 15.05.2020.
11. О безопасности биодобавок [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://studfile.net/preview/7268378/page:4/>- дата доступа: 10.05.2020.
12. Поляков, С., Корнеева, И., Петричук С., и др. Энергодефицитные состояния юных спортсменов и их профилактика метаболическими препаратами. / С. Поляков, И. Корнеева, С. Петричук //Актуальные проблемы здорового образа жизни в современном обществе. — Минск, 2017. –С.195-196.
13. Приказы и положения о реализации БАДов в Республике Беларусь [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://bii.by/tx.dll?d=283277> — дата доступа: 14.04.2020.
14. Рейтинг лучших производителей спортивного питания на 2020 г. [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://sledi-za-soboy.ru/opisaniye-marok-sportivnogo-pitaniya-d/> дата доступа: 20.10.2020.
15. Современные биологически активные добавки [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://studwood.ru/1702326/meditsina/vvedenie/>: 16.04.2021

## **BIOCHEMICAL BASIS FOR THE APPLICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUPPLEMENTS IN HUMAN HEALTH IMPROVEMENT**

---

*Velichko M. G.<sup>1</sup>, Kravchik E. G.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus*

<sup>2</sup>*Grodno State Agrarian University, Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *The literature data and corresponding studies on dietary supplements and their consumption in the food of sportsmen students are summarized. The main reasons for which students use biologically active substances are indicated, and the characteristics of the chemical composition of the main dietary supplements for increasing muscle mass and muscle strength are given.*

## ГОРМОНЫ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ

---

*Виноградов В. В.*

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

**Резюме.** Проведен аналитический обзор зависимости изменения гормонального гомеостаза от временных сдвигов физических параметров окружающей среды (сезонных ритмов).

Одним из наиболее удивительных свойств живой материи является ее способность к осцилляциям, которая в аспекте целого организма или его частей может расцениваться как фундаментальная всеобщая характеристика функционирования биологической системы и ее многоступенчатых механизмов управления. Считается, что процессы, происходящие на каждом уровне, характеризуется собственной периодичностью, определяемой, как эндо-, так и экзогенными факторами, формирующими специфический механизм данной системы.

Алгоритм управления может рассматриваться как некий циклический процесс, в котором определенные операции имеют конкретные временные характеристики. Временные связи существуют и между отдельными алгоритмами, поэтому задержка в выполнении хотя бы одной операции может привести к нарушению всего цикла (алгоритма), а также других, наиболее тесно связанных с ним. Это ведет к сбоям в работе систем и накоплению ошибок (шума).

Коррекция этих сбоев осуществляется путем внутренней перенастройки системы управления (ее алгоритма) либо путем внешних управляющих воздействий за счет реализации алгоритма управления более высокого уровня. Рассматривая физиологические процессы как функцию времени мы получаем возможность прогнозировать их течение. При этом чем точнее нам известен алгоритм того или иного процесса, тем на более длительный срок можно его прогнозировать. Исследование так называемых биологических ритмов дает в руки физиолога инструмент долговременного прогнозирования явлений, развивающихся на разных уровнях регуляций, и одновременно позволяет выявить самые ранние стадии отклонений, поскольку они проявляются из нарушений временных соотношений.

Еще во времена становления гелиоцентрического мировоззрения периодически повторяющиеся сезонные изменения в природе (смена времен года, изменение длительности дня и ночи и т. д.) встали на строгую научную основу непреложного факта — их обусловленности вращением Земли вокруг Солнца. Известны многочисленные проявления сезонной ритмики функционирования биологических систем, синхронизированной с временными сдвигами физических параметров окружающей среды.

Поиски внутренней связи между этими явлениями ведутся достаточно интенсивно, однако вопрос все еще остается открытым. Проблема сезонных физиологических изменений в организме необычно сложна. Видимо, поэтому до настоящего времени не появилось ни одной обобщающей работы, в которой была бы предпринята попытка рассмотреть интимные механизмы этих явлений и сделать общие теоретические выводы.

Сейчас показано, что клетки коры надпочечников в культуре ткани сохраняют циркадный ритм метаболизма и секреции кортикостероидов, а изолированные фибробласты — ритм митотической активности. Способность отдельно взятой клетки поддерживать циркадный ритм жизнедеятельности в постоянных условиях свидетельствует о том, что в ней присутствуют эндогенные осцилляторы, выполняющие функцию внутриклеточных часов. Актиномицин D, блокирующий транскрипцию, вносит существенные помехи в ритмическую функцию клеток, что свидетельствует о связи хода внутриклеточных часов с обменом нуклеиновых кислот.

Считается, что в процессе эволюции лишь на уровне клеток со структурно оформленным ядром возникла периодичность и организмы смогли жить по суточному графику [12]. В связи с тем, что основной и первичной единицей для выдачи информации в ядре является ген, то именно ему приписывают осцилляторные свойства. Пульсирующий характер транспорта из генома предполагает существование в органах биологического поля как интегрального эффекта взаимодействия совокупности осцилляторных систем однородных клеток. Известно, что реализация генетической информации происходит в процессе образования белков и прежде всего белков-ферментов. Следовательно, в первом приближении каждый циркадный ритм представляет собой генетически обусловленные колебания уровня белковой массы специфических ферментов в органе, которые лимитируют биохимическую основу его изменяющейся функции. Не исключено, что это допущение может оказаться справедливым и по отношению к биоритмам с более длинным периодом, поскольку многие авторы представляют себе их механизм как развертывание во времени некой генетической программы, которая содержится в генофонде организма при его рождении [7].

Вместе с тем имеются данные, что сезонные изменения многих физиологических функций являются приобретенными, т. е. формируются в процессе жизни животного под влиянием светового режима, температуры, условий питания и других факторов окружающей среды. Если у животных дикой фауны часто не удастся оценить значимость экологических факторов для возбуждения сезонных биоритмов, то в опытах на лабораторных животных большинство из них можно контролировать. Целью настоящей работы было исследование сезонных колебаний кортикостероидов в крови и активности окислительных ферментов пентозофосфатного пути превращения углеводов крыс, содержащихся весной, летом, осенью и зимой при температуре +20 °С и постоянной продолжительности освещения (12 ч).

В качестве лабораторных животных использовали белых крыс, линия которых (5-е поколение) была выведена ранее в нашей виварии от пары беспородных производителей Рапполовского питомника. В опыт брались самцы среднего возраста, достигшие веса 160–180 г. Все эксперименты проводились в блокированной комнате с двойным раздельно-заземленным экраном, которая ранее использовалась для электрофизиологических исследований мозга. Здесь исключались электростатические наводки промышленных частот. Воздухообмен и температурный режим помещения (+20 °С) и режим освещения (с 8.00 до 20.00 свет, в остальное время темнота) поддерживались автоматически. Кормление животных и уборка помещения всегда проводились в одно и то же время — 14:00–15:00. Состав рациона был максимально стандартизирован: зерно (ячмень), черный хлеб, молоко, творог и вода. Каждый эксперимент рассчитывался таким образом, чтобы забой животных приходился на середину соответствующего месяца и совершался точно посреди периода освещения — между 14 и 15 часами.

Поскольку физиологическое время лишь синхронизировано с астрономическим и в течение сезона от него может отличаться, исследования проведенные в одно и то же время астрономических суток, можно сравнивать лишь при условии синхронизации внутренних часов с вне-

шним 24-часовым режимом [11]. По этой причине суть экспериментов с двухнедельным содержанием животных в изолированной от окружающей среды камере заключается в строгой стандартизации принятых постоянных условий относительно астрономического времени и воспитания эндогенных ритмов, полностью синхронизированных с однажды установленным нами режимом действия внешних раздражителей. Эта процедура избавляла от необходимости находить в каждом эксперименте акрофазу суточного ритма, что обычно требует большого количества стандартных животных и, по условиям нашего опыта, было бы трудновыполнимым.

Согласно полученным данным [1], сезонные изменения скорости исследованных дегидрогеназных реакций носят отчетливо выраженный волновой характер с максимумом в летне-осенние месяцы и минимумом — в зимне-весенние. Поскольку определение энзиматической активности проводилось в оптимальных условиях инкубационной среды, содержащей в избытке субстраты и все необходимые кофакторы, можно думать, что обнаруженные сдвиги обусловлены сезонными колебаниями в органах белковой массы ферментов.

Учитывая тесные, многофункциональные связи пентофосфатного пути превращения углеводов с биосинтезом, легко допустить, что с летне-весенней стимуляцией дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата связано усиление липогенеза, которое в это время имеет выраженное приспособительное значение для многих видов животных. Увеличение жировых запасов отчетливо прослеживается у зимоспящих животных в подготовительный к зимовке период [6]. В последней связи интересно отметить, что сезонный ритм секреции кортикостероидов не накладывается на ритмическую функцию исследованных ферментов.

Из полученных данных следует [1], что подъем гормонообразования в коре надпочечников имеет место в промежутке с апреля по октябрь, а активация дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата в периферических тканях — с июня-июля по декабрь-январь. Известно, что кортикостероиды активируют окисление липидов и угнетают их биосинтез. Весной на фоне повышенного стероидогенеза многие виды животных удовлетворяют свои возросшие энергетические потребности за счет утилизации липидов. Видимо, с этим обстоятельством связано запаздывание сезонного ритма ферментов, функционально сопряженных с липогенезом, по сравнению с сезонным ритмом секреторной активности надпочечников. Можно полагать, что некоторое относительное снижение уровня кортикостероидов в крови в летние месяцы (июнь-август) сравнительно с весенними (апрель) является одной из предпосылок к стимуляции липогенеза и накоплению жира [1].

Таким образом, между сезонными изменениями отдельных биохимических показателей гомеостаза наблюдается определенный «фазовый угол», когда при одинаковом периоде и частоте колебаний отсутствует фазовая синхронизация ритмов. В этом отношении ритмы с длинным шагом напоминают короткие ритмы. Так, большинство суточных изменений физиологических функций согласуется между собой по частоте колебаний, но не по фазе, т. е. максимумы и минимумы циркадных ритмов не совпадают по времени. По мнению Питтендрая [9], такое согласование объясняется структурой циркадной организации биологических систем, когда их более центральные элементы не возбуждают колебаний в более периферических, а лишь синхронизируют ритмическую активность отдельных подсистем друг с другом. На наличие центральных механизмов синхронизации сезонных изменений активности вышеозначенных ферментов указывает качественное сравнение характеристик индивидуальных ритмов по частоте и фазе колебаний во всех исследованных тканях [1].

В конструкции биологических часов обычно различают три иерархически соподчиненных звена: центральное находится предположительно в гипоталамусе; гомеостатическое — это функ-

ционально связанные с гипоталамусом эндокринные железы; периферическое представлено гормонально-чувствительными тканями [15]. Считается, что в рамках этой конструкции надпочечники могут выполнять роль метронома некоторых периферических процессов. Ранее нами было показано, что сезонные колебания активности глюкозо-6-фосфатазы в печени крыс в качественном (фазовом) и количественном (амплитудном) отношениях строго коррелируют соответствующими изменениями уровня кортикостероидов в крови. Наличие же фазового сдвига сезонных колебаний активностей обеих дегидрогеназ в органах крыс относительно сезонного ритма секреции кортикостероидов позволяет предположить, что функцию метронома в отношении этих ферментов выполняют другие железы, например инсулярный аппарат поджелудочной железы, который также находится под регулирующим влиянием гипофиза и гипоталамуса. Именно для инсулина показано стимулирующее влияние на синтез апофермента дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата, в то время как глюкокортикостероиды здесь обычно оказывают противоположное действие [16].

Широко известны контринсулярные свойства гормонов коры надпочечников точно так же, как и способность инсулина уравновешивать метаболические эффекты кортикостероидов. Экзогенные кортикостероиды вызывают гипертрофию островков Лангерганса и повышение секреции инсулина. Инсулин стимулирует липогенез у крыс, а гидрокортизон и кортизон тормозят его действие. Однако липогенетический эффект инсулина всегда преобладает над противоположным действием кортикостероидов, поэтому не стоит искать противоречия в таком факте, что на фоне осеннего пика содержание кортикостероидов в крови активность сопряженных с липогенезом ферментов не только не угнетается, но и даже достигает максимальных значений [1].

Можно полагать, что при гиперкортицизме происходит увеличение образования инсулина, который максимально стимулирует липогенез и способствует развитию ожирения. Согласно принятым представлениям влияние гормонов на клетки гормонально-чувствительных тканей реализуется через их геном. Гормоны способны включать и выключать синтетическую активность генов и тем самым изменять качественно или количественно синтез специфических белков-ферментов. Инсулин, равно как и кортикостероиды, повышает синтез ДНК и различных типов РНК в клетке [3, 13]. Это предполагает прямое действие гормонов на ее асцилляторные системы. Отсюда следует важный для последующих рассуждений вывод, что сезонные изменения активности ферментов экстраэндокринных органов являются гормонально обусловленными ритмами, а потому их период должен быть соразмерен с периодом колебаний в более центральных звеньях биологических часов. По мнению Шноля [10], высокая точность хода биологических часов объясняется наличием в их основе относительно высокочастотного процесса, который затем преобразуется в ритм с большей длительностью периода.

Устранение сезонного ритма эструса у животных с нарушенным гипоталамусом [8], а также исчезновение сезонного ритма развития формалинового воспалительного отека у гипофизэктомированных крыс свидетельствуют о том, что периодичность указанных функций определяется ритмической деятельностью данных образований. В свете современных представлений о главенствующей роли гипоталамоадренальной системы в механизмах адаптации остро встает вопрос об эндогенности сезонных ритмов: действительно ли они исходно запрограммированы в геноме или все же возбуждаются внешними факторами, являясь по сути дела отображением своеобразной периодически повторяющейся стресс-реакции. Основанием для такого допущения могут служить результаты потоморфологических исследований, которые установили полную тождественность развития морфофункциональных изменений во всех звеньях этой системы, при ее весенней стимуляции, а также после длительного ведения АКТГ или хронического стресса [17].

Опыты *in vitro*, имевшие решающее значение для установления эндогенности циркадных ритмов, оказались малопригодными для исследования сезонных колебаний. Дело в том, что

биологический материал (кусочек ткани или культура клеток), взятый от животных в разные периоды года, уже исходно содержит неодинаковую белковую массу специфических ферментов, определяющих тестируемую биологическую функцию, и потому при исследовании будет давать разные результаты. Например, двухчасовая инкубация аликвоты АКТГ с тканью надпочечников, взятой у сусликов весной, летом и осенью, дает различный стероидогенный эффект [7]. В опытах с [<sup>3</sup>H]-лейцином, а также электронно-микроскопически было установлено существование четкой сезонной зависимости между уровнем биосинтеза белка в адреналовых железах и степенью выраженности морфологических структур, ответственных за этот процесс [17].

Следовательно, сезонные изменения функциональной активности коры надпочечников на протяжении годового цикла — это отражение внутриклеточных процессов биосинтеза белка, имеющих тот же ритмический характер [7]. Последним, очевидно, и объясняется разный функциональный ответ изолированной ткани желез на добавку АКТГ.

Среди методических приемов элементарного изучения сезонных ритмов важнейшим считается воспроизведение их у животных, находящихся в течение всего года в постоянных условиях. Так, в качестве классического примера эндогенности сезонных сдвигов приводят ритм залегания сусликов в спячку, который устойчиво сохраняется в постоянных условиях температуры (0 °С), освещения (12 ч) и пищевого режима. Однако данный ритм вряд ли может быть врожденным уже в силу того, что он не воспроизводится у адреналэктомированных животных [18], т. е. оказывается связанным с деятельностью гипоталамо-адреналовой системы, отдельные звенья которой начинают активно функционировать только в постоянном периоде [4].

Гораздо более труден для выяснения пример кажущейся спонтанной подготовки зимоспящих животных к просыпанию [6]. Здесь нужно иметь в виду, что в спячке при понижении температуры тела до +2...+4 °С у животных выключается большинство известных нам рецепторов, способных воспринимать известные раздражения. Это обстоятельство естественно приводит к мысли, что процесс просыпания запускается эндогенным механизмом. Поскольку хронологически весенняя стимуляция гипоталамуса происходит раньше, чем стимуляция надпочечников, считается, что сезонные ритмы функциональной активности зимоспящих определяются ходом внутригипоталамических часов. Вместе с тем не исключено, что сам гипоталамус является своеобразным рецептором, функция которого полностью не выключается при гибернации, как и функция других подкорковых структур жизнеобеспечения.

Известно, что во время спячки «работает» поджелудочная железа, избирательно сохраняется продукция липоактивных стероидов [7], «идут» другие подконтрольные гипоталамо-гипофизарной регуляции процессы. Следовательно, функциональная готовность гипоталамуса к восприятию каких-либо раздражений во время спячки очевидна. Принципиальная же возможность рецепции гипоталамусом отдельных раздражений доказывается опытом с освещением различных участков мозга предварительно ослепленных уток с помощью кварцевого светодиода [8]. Оказывается, что освещение именно гипоталамуса вызывает четкий гонадостимулирующий эффект, который обычно воспроизводится при воздействии света на зрячих птиц. По мнению Брауна [14], гипоталамус способен улавливать также сверхслабые по физиологическим меркам раздражения, вызываемые колебаниями магнитного поля Земли. В этой связи легко допустить, что центральная роль гипоталамуса в обеспечении сезонной ритмики определяется прежде всего его рецепторными свойствами, т. е. способностью возбуждаться под влиянием внешних воздействий. В таком случае механизм развития сезонных ритмов не должен принципиально отличаться от механизма развития неспецифической стрессорной реакции.

Предположение о стрессорном характере сезонных ритмов проще всего было проверить, исключив в годовом эксперименте действие на организм всех факторов, которые могли иметь сигналь-

ное значение (условно-рефлекторный стресс) или являться непосредственными раздражителями. Поскольку технически эта задача представляется исключительно сложной, даже едва ли выполнимой, мы в своем эксперименте решили пойти по пути сопоставления сезонной динамики некоторых геофизических факторов с активностью надпочечников у крыс, адаптированных к одинаковому суточному графику. При такой постановке опыта устранялось воздействие на животных многих экологических раздражителей, которые имеют отчетливый сезонный ритм. Сведения о состоянии магнитного поля в Минске (ближайшая магнитная обсерватория) мы получали из бюллетеней «Космические данные» ИЗМИРАН АН СССР. Рассматривалась связь функционального состояния коры надпочечников со среднемесячными значениями магнитной характеристики суток ( $K_i$ ).

Согласно [1], повышение секреторной активности надпочечников (апрель, сентябрь) отчетливо совпадает с весенними и осенними максимумами геомагнитных возмущений. В соответствии с гипотезой Брауна можно предположить, что годовой ритм функционирования гипоталамо-адреналовой системы задается извне организма, т. е. не является эндогенным. Вместе с тем мы не склонны переоценивать роль геомагнитного поля в определении сезонного гормонального гомеостаза, полагая, что его следящие устройства (рецепторы) могут быть настроены на весь комплекс геофизических факторов. Например, известно, что существует эффект разности скоростей движения Земли вокруг Солнца летом и зимой —  $V_{\min} = 29,27$  км/с;  $V_{\max} = 30,27$  км/с. Данные скорости дают для протонов квантовые частоты  $V_1 = 2,16 \cdot 10^{-15}$ , т. е. величины, близкие к частоте колебаний электрона в основном состоянии атома водорода ( $V = 6,54 \cdot 10^{-15}$ ). Резонанс между этими частотами может привести к ионизации и возбуждению атома водорода в молекулах воды, входящей в состав тканей организма, а следовательно, индуцировать соответствующие биологические эффекты.

Специфической рецепцией такого рода раздражений должны обладать прежде всего насыщенные на 85–90 % водой структуры головного мозга, в том числе и гипоталамус конкретным примером зависимости функции гипоталамоадреналовой системы от колебаний гравитационного поля, вызванных движением Земли вокруг Солнца или положения Луны, может служить тот факт, что в новолуние и полнолуние (сизигии), когда приливообразующие силы достигают наибольшей величины, в суточном ритме выделения 17-оксикортикостероидов у людей наблюдаются статистически достоверные изменения по сравнению с лунными фазами [18].

Таким образом, на основании вышеприведенных данных, вполне может сложиться впечатление, что временное согласование годового цикла изменений комплекса геофизических параметров окружающей среды с циклом активности гипоталамо-адреналовой системы осуществляется по стрессорному механизму.

Даже если геофизические факторы не являются непосредственными стрессорами, а имеют только сигнальное значение, т. е. способствуют развитию рефлекторной реакции на мощные экологические раздражители (длина светового дня, температура, режим питания и т. д.), то это обстоятельство не противоречит такому механизму, поскольку известно, что однажды выработанная активация надпочечников на действие условного раздражителя затем сохраняется многие месяцы без подкрепления [2].

Вызванные внешними причинами сезонные колебания гормонального гомеостаза в конечном итоге координируют многие ритмы внутриклеточных процессов в периферических тканях и органах, обеспечивая адекватное приспособление организма к закономерно меняющимся условиям среды обитания. Таким образом, сейчас скорее можно говорить не о генетической программе сезонных ритмов, а о их генетической реализации, подразумевая здесь результат специфического действия гормонов.

## Список литературы

1. Виноградов, В.В. Гормоны и адаптация и системные реакции организма / В.В. Виноградов. — Минск, 1989. — 224 с.
2. Гельгорн, Э. Эмоции и эмоциональные расстройства / Э. Гельгорн, Д.Ж. Луфборроу. — М.: Мир, 1966. — 672 с.
3. Германюк, Л.Л. Роль инсулина в биосинтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот / Л.Л. Германюк. — Киев, 1973. — 196 с.
4. Диксон, М. Ферменты / М. Диксон, Л. Уэбб. — М., 1966. — 814 с.
5. Зверев, М.Е. Приливной компонент суточного ритма мочевой экскреции 17-оксикортикостероидов у человека / М.Е. Зверев // Проблемы эндокринологии. — 1973. — Т. 18, № 4. — С. 40–42.
6. Калабухов, Н.И. Спячка животных / Н.И. Калабухов. — Харьков, 1956. — 183 с.
7. Механизмы сезонных ритмов кортикостероидной регуляции зимоспящих / М.Г. Колпачков [и др.]. — Новосибирск : Наука, 1974. — 160 с.
8. Лобашев, М.Е. Физиология суточного ритма животных / М.Е. Лобашев, Б.Б. Савватеев. — М.: Л., 1969.
9. Питтендрей, К. Циркадные ритмы и циркадная организация живых систем / К. Питтендрей // Биологические часы. — М.: Мир, 1984. — С. 263–306.
10. Шноль, С.Э. Проблемы биофизики / С.Э. Шноль // Биология и медицина. — 1965. — № 12. — С. 55–59.
11. Циркадные ритмы и механизмы циркадной организации / В.И. Губский [и др.] // Успехи современной биологии. — 1969. — Т. 68, вып. 1. — С. 23–44.
12. Эмме, А.М. Часы живой природы / А.М. Эмме. — М.: Советская Россия, 1962. — 149 с.
13. Юдаев, Н.А. Биохимия гормонов и гормональной регуляции / Н.А. Юдаев. — М., 1976. — 379 с.
14. Brown, F.A.Jr. Biological Chronometry / F.A.Jr. Brown // J. Amer. Naturalist. — 1957. — Vol. 91, № 858. — P. 129–133.
15. Richter, C. Biological clocks in medicine and psychiatry: shock-phase hypothesis / C. Richter // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. — 1960. — Vol. 46, № 11. — P. 1506–1530.
16. Sie, H.G. Depletion of glycogen synthetase and increase of glucose 6-phosphate dehydrogenase in livers of ethionine-treated mice / H.G. Sie, A. Hablaniian // Biochem. J. — 1965. — Vol. 97, № 1. — P. 32–36.
17. Stoeckel, M.E. Ultrastructural study of the adrenal cortex in a hibernant, the common hamster (*Cricetus cricetus*), during the seasonal cycle / M.E. Stoeckel, A. Petrovic // J. Physiol. — 1964. — Vol. 56, № 3. — P. 442–443.
18. Vidovic, V. Studies on the adrenal and thyroid glands of the ground squirrel during hibernation / V. Vidovic, V. Propovic // J. Endocrinol. — 1954. — Vol. 11, № 2. — P. 125–133.

---

## HORMONES AND BIOLOGICAL CLOCK

---

*Vinogradov V.V.*

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

**Summary.** *This article gives a short review of the dependence of hormonal homeostasis on temporal shifts in physical parameters of the environment (seasonal rhythms).*

## РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОСНОВАНИЯМИ ШИФФА ГЕСПЕРЕТИНА

*Гречко В.М.<sup>1</sup>, Чещевик В.Т.<sup>1</sup>, Дзейкало А.<sup>2</sup>, Сыкула А.<sup>2</sup>,  
Блажиньска П.<sup>2</sup>, Лодыга-Хрущиньска Е.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Учреждение образования «Полесский государственный университет»,  
г. Пинск, Республика Беларусь;*

<sup>2</sup>*Лодзинский технический университет, г. Лодзь, Республика Польша*

**Резюме.** В данной работе исследованы антиоксидантная активность и рассмотрены эффекты гесперетина, его основания Шиффа с изониазидом (HIN) и комплекса с ионами меди (II) (CuHIN) на активность белков множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) в клеточных линиях, а также выявлена их антиоксидантная активность. Производное гесперетина (HIN) оказывает сильный ингибирующий эффект на активность МЛУ белков при концентрации 5 мкМ и обладает значительной антиоксидантной активностью в отношении к свободному радикалу DPPH• по сравнению с гесперетином. Введение в структуру основания Шиффа ионов меди приводит к незначительному стимулирующему действию на активность МЛУ белков в клеточных линиях. Способность основания Шиффа гесперетина (HIN) ингибировать активность МЛУ белков может иметь потенциал в разработке противоопухолевых и антимикробных лекарств низкой токсичности.

**Введение.** ABC-транспортеры — это группа белков, которая осуществляет как импорт, так и экспорт широкого ряда компонентов в эукариотических клетках [1]. С одной стороны, ABC-транспортеры обеспечивают поддержание сбалансированного метаболизма клетки, с другой — некоторые из них участвуют в реализации механизма множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), что снижает эффективность лекарственной терапии [2].

В ABC-белках человека присутствуют трансмембранные домены (TMDs) и нуклеотид-связывающие домены (NBDs), которые входят в структуру активного центра белка, в котором и происходит связывание молекулы АТФ и ее гидролиз. Домены могут существовать в разных комбинациях, а именно — в «прямом» порядке TMD1-NBD1-TMD2-NBD2, но также могут быть в «обратном порядке» — NBD1-TMD1-NBD1-TMD2. При этом ABC белки могут быть представлены в виде полноразмерных (TMD6-NBD)<sub>2</sub> или (NBD-TMD6)<sub>2</sub> или половинчатых транспортеров (TMD6-NBD), а также у них могут отсутствовать отдельные домены (TMD, NBD или NBD2) [4].

В настоящее время были разработаны различные модуляторы МЛУ-белков (Р-гликопротеина, MRP1 и BCRP), которые могут ингибировать их активность. Среди них оказались производные хинакрин, фенотиазина, резерпин, феноксазин, колхицин, верапамил, пренилцистеин, пропафенон, стауроспорин или пептиды [3, 4]. Для большинства из этих ингибиторов характерны три общих параметра: гидрофобность, большую молекулярную массу и положительно заряженный атом азота при нейтральном рН [5]. Клинические исследования данных препаратов выявили высокую токсичность в тех концентрациях, которые приводили к реверсии МЛУ. В связи с этим поиск новых соединений-ингибиторов активности МЛУ-белков, которые не обладали бы цитотоксичностью, сохраняет свою актуальность. [6, 7]. Одними из таких перспективных соединений

являются полифенольные соединения — флавоноиды. Известно, что флавоноиды обладают рядом полезных свойств для здоровья человека, а именно проявляют антиоксидантные, противовирусные, противораковые свойства. Предполагается, что они способны действовать как на АТФ-связывающий домен, так и на трансмембранные домены МЛУ-белков путем аккумуляции в гидрофобной части липидного бислоя мембран [8]. В то же время известно, что структурные изменения флавоноидов и других молекул, связанные с модификацией Шиффа, приводят к значительному усилению антиоксидантной, противомикробной и противоопухолевой активности. Например, модификации Шиффа нарингенина приводят к усилению антиоксидантных свойств, а гесперетина — антимикробной активности [9]. Ранее было показано, что основание Шиффа гесперетина с изониазидом обладает антимикробной активностью по отношению к грамотрицательным штаммам бактерий семейства Энтеробактерий (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) и грамположительным штаммам *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes* [10, 11]. В то же время механизмы, обуславливающие усиление биологической активности флавоноидов, в случае модификации Шиффа практически не исследованы.

Помимо активности МЛУ-белков широко обсуждаются и исследуются разнообразные факторы (фармакокинетические, метаболические, генетические, клеточные и др.), с которыми связывают первичную резистентность или снижение их чувствительности к цитостатикам в процессе лечения при повторных курсах или циклах химиотерапии. Новые представления о роли окислительно-восстановительных процессов в регуляции клеточных процессов, появившиеся в последние годы, позволили выделить в качестве ключевой характеристики трансформированных тканей нарушения клеточного и тканевого редокс-гомеостаза [12]. Однако роль редокс-механизмов в формировании химиорезистентности до сих пор не обоснована и требует дальнейших исследований.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование эффектов флаванона гесперетина и его модификации в форме оснований Шиффа с изониазидом и их комплексов с металлами непосредственно на активность МЛУ-белков и жизнеспособность культур клеточных линий HeLa (аденокарцинома шейки матки), С6 (глиобластома), а также оценка антиоксидантных свойств *in vitro* исследуемых флавоноидов и их модификаций [13, 14].

**Материалы и методы исследования.** Структура и физико-химические свойства НИН и его комплекса с медью охарактеризованы с помощью масс-спектропии, ядерного магнитного резонанса ядер  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , инфракрасной спектроскопии и абсорбционной спектрофотометрии партнерами из Лодзинского технического университета (Польша).

Культивирование клеток HeLa и С6 осуществляли в среде DMEM (Sigma Aldrich, США) с добавлением 10%-й эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина при температуре  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%-го  $\text{CO}_2$ .

Для исследования активности МЛУ-белков использовали метод проточной цитофлуориметрии с использованием в качестве флуоресцентного зонда кальцеина-АМ в концентрации 0,2 мкМ, время инкубации — 30 мин при  $+37\text{ }^\circ\text{C}$ .

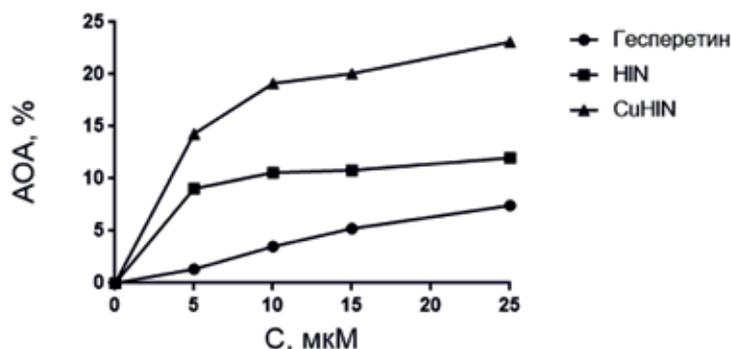
Для определения антиоксидантной активности были использованы флавоноиды в концентрации 5 мкМ, 10 мкМ, 15 мкМ, 25 мкМ. В качестве системы, генерирующей свободные радикалы, использовали 2,2-дифенил-1-пикрилгидразильный радикал (DPPH•) в концентрации 57 мкМ, который содержит неспаренный электрон.

Статистическую обработку результатов осуществляли с применением критерия Стьюдента в случае нормального распределения выборки или непараметрического критерия Манна-Уитни. Нормальность распределения выборки определяли методом Шапиро-Уилка. Различия

между средними арифметическими сравниваемых групп принимались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** В состав молекулы вновь синтезированного соединения HIN входят молекула гесперетина, которая соединена с молекулой изониазида в соотношении 1:1.

В связи с тем что коррекция редокс-свойств опухолевых клеток является перспективным подходом для модуляции их химиорезистентности, была проверена антиоксидантная активность гесперетина, его основания Шиффа (HIN) и комплекса основания Шиффа гесперетина с ионами меди (II) (CuHIN) в отношении к свободному радикалу DPPH•. Данные, полученные по исследованию антиоксидантных свойств флавоноидов, представлены на рис. 1.



**Рисунок 1 — Антиоксидантная активность гесперетина, его основания Шиффа с изониазидом (HIN) и комплекса с ионами меди (II) (CuHIN)**

Примечание: АОА — антиоксидантная активность

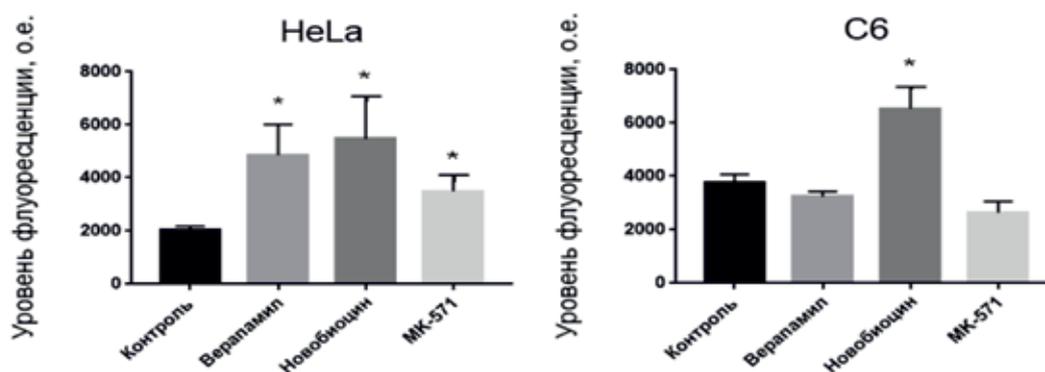
Из приведенных данных следует, что в диапазоне концентраций от 0 до 25 мкМ, модификация флаванона гесперетина по типу основания Шиффа с изониазидом (HIN) приводила к увеличению антиоксидантной активности в среднем в 3,4 раза по сравнению с гесперетином в концентрации 25 мкМ. Введение ионов меди в состав комплекса оказывало более сильный эффект, по сравнению с гесперетином и его модификацией по типу основания Шиффа с изониазидом (HIN) в 5,8 и 1,8 раз соответственно. Таким образом, антиоксидантная активность гесперетина значительно усиливалась при модификации по типу основания Шиффа и введении ионов меди в состав комплекса в результате изменения их химической структуры.

В результате применения ингибиторного анализа нами были определены наличие функциональной активности основных типов МЛЮ-белков в исследуемых линиях клеток HeLa и С6 (рис. 2).

При применении специфических ингибиторов МЛЮ белков (верапамил — ингибитор Р-гликопротеина, новобиоцин — ингибитор BCRP, МК-571 — ингибитор MRP) было установлено наличие трех типов белков в клетках HeLa, тогда как в случае клеток линии С6 присутствует только белок BCRP.

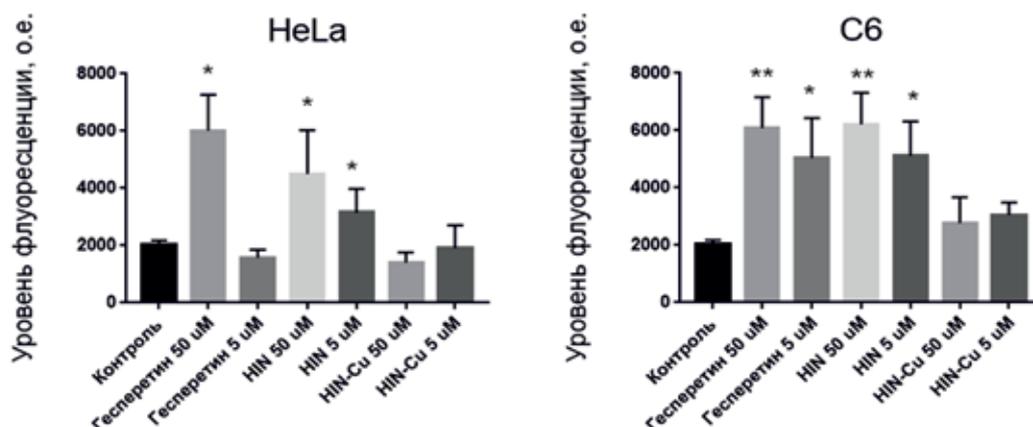
При краткосрочном воздействии гесперетина, его основания Шиффа (HIN) и комплекса основания Шиффа гесперетина с ионами меди (II) (CuHIN) на клетки линии HeLa, было установлено, что гесперетин в концентрации 50 мкМ приводит к увеличению уровня флуоресценции в 3 раза по сравнению с контрольной группой, что связано с ингибированием активности МЛЮ-белков (рис. 3). При модификации флаванона по типу основания Шиффа (HIN) в концентрации 50 мкМ также наблюдалось значительное повышение уровня флуоресценции в 2,3 раза

в сравнении с контрольной группой. В свою очередь, гесперетин в концентрации 5 мкМ не оказывал влияния на интенсивность флуоресценции зонда в клетках HeLa.



**Рисунок 2 — Уровень функциональной активности белков множественной лекарственной устойчивости в клетках HeLa и C6**

При исследовании влияния гесперетина, его Шиффового основания и комплекса с металлом на активность белков множественной лекарственной устойчивости в клетках C6 было установлено, что исследуемые флавоноиды проявляли такие же эффекты, как в линии клеток HeLa. Основание Шиффа гесперетина с изониозидом (HIN) в концентрации 5 мкМ также приводило к статистически достоверному повышению интенсивности флуоресценции кальцеина в 2,5 раза в клетках по сравнению с контрольной группой. Введение ионов меди в структуру оснований Шиффа гесперетина в случае HIN приводило к снижению интенсивности флуоресценции кальцеина в клетках C6 при обеих используемых концентрациях по сравнению с группой HIN и незначительному повышению по сравнению с контролем (см. рис. 3).



**Рисунок 3 — Эффект гесперетина, его основания Шиффа с изониозидом и комплекс с ионами меди (II) на кальцеин-зависимую флуоресценцию клеток HeLa и C6**

**Заключение.** Флавоноид гесперетин оказывает сильное ингибирующее воздействие на белки МЛУ в концентрации 50 мкМ и 5 мкМ, но обладает незначительной антиоксидантной активностью в отношении радикала DPPH•. В то же время модификация гесперетина изониозидом по типу основания Шиффа не оказывала или незначительно снижала ингибирующий эффект гесперетина в отношении МЛУ-белков обеих исследуемых клеточных линий за исклю-

чением концентрации 5 мкМ, при которой проявлялся значительный ингибирующий эффект НН на активность МЛЮ-белков HeLa клеток при сравнении с гесперетином. Введение в структуру молекулы Шиффова основания гесперетина ионов меди приводило к практическому полному нивелированию ингибирующего эффекта на активность МЛЮ-белков при исследовании на обеих клеточных культурах.

Таким образом, высокая антиоксидантная активность и способность оказывать ингибирующее действие на активность МЛЮ-белков при низких концентрациях обуславливает возможность использования основания Шиффа гесперетина с изоионизидом в качестве перспективного средства модуляции активности отдельных МЛЮ-белков в опухолевых клетках.

Научно-исследовательская работа выполнялась при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ М19МС-033 от 02.05.2019), ГР № 20200121.

### Список литературы

1. Ames, G.F.-L. Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human traffic ATPases / G.F.-L. Ames, C. Mimura, V. Shyamala // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1990. — Vol. 75. — P. 429–446.
2. Davidson, A.L. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems / A.L. Davidson, E. Dassa, C. Orelle // *Mol. Biol. — Rev.* 2008. — Vol. 72. — P. 317–364.
3. Suppression of TWIST1 enhances the sensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil / M. Sakowicz-Burkiewicz [et al.] // *J Biochem Cell Biol.*, 2016. — Vol. 78. — P. 268–278.
4. Chelating ability and biological activity of hesperetin Schiff base / E. Lodyga-Chruscinska [et al.] // *J. Inorganic Biochemistry.* — 2014. — Vol. 143. — P. 387–398.
5. Structural determinants of phenoxazine type compounds required to modulate the accumulation of vinblastine and vincristine in multidrug resistant cell lines / K. N. Thimmaiah [et al.] // *Cancer Commun.* — 1990. — Vol. 2. — P. 249–259.
6. Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance / G. Toffoli [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* — 1995. — Vol. 50. — P. 1245–1255.
7. Interaction of bioactive hydrophobic peptides with the human multidrug transporter / B. Sarkadi [et al.] // *FASEB J.* — 1994. — Vol. 8. — P. 766–770.
8. Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport / F. J. Sharom [et al.] // *J. Biochem.* — 1996. — Vol. 320. — P. 421–428.
9. The nitrogen of the acetamido group of colchicine modulates P-glycoprotein-mediated multidrug resistance / D. F. Tang-Wai [et al.] // *Biochem. J.* — 1996. — Vol. 32. — P. 6470–6476.
10. Kim, H.S. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate / H.S. Kim, M.J. Quon, J.A. Kim // *Redox Biol.* — 2014. — Vol. 2. — P. 187–195.
11. Flavonoids: promising anticancer agents / W. Ren [et al.] // *Med. Res. Rev.* — 2003. — Vol. 23, № 4. — P. 519–534.
12. Hydrogen peroxide mediates EGCG-induced antioxidant protection in human keratinocytes / L. Elbling [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* — 2010. — Vol. 49. — P. 1444–1452.
13. Kibria, G. Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system / G. Kibria, H. Hatakeyama, H. Harashima // *Arch. Pharm. Rs.* — 2014. — Vol. 37, № 1. — P. 4–15.
14. Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: role of NFκB, p38 and caspase-3 / P.P. Trivedi [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* — 2011. — Vol. 49. — P. 838–847.

## REGULATION OF THE MULTIDRUG RESISTANCE PROTEINS ACTIVITY USING HESPERETIN SCHIFF BASES

---

*Crechko V.M.<sup>1</sup>, Cheshchevik V.T.<sup>1</sup>, Dzeikala A.<sup>2</sup>, Sykuła A.<sup>2</sup>,  
Blazinska P.<sup>2</sup>, Łodyga-Chruścińska E.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>Lodz University of Technology, Lodz, Poland*

**Summary.** *In this study, we considered the effect of hesperetin, its Schiff base with isoniazid (HIN) and the complex with copper ions (II) (CuHIN) on MDR activity in cells lines, as well as their antioxidant activity.*

*The Schiff base of hesperetin (HIN) had a strong inhibitory effect on MDR activity at a concentration of 5 μM and possessed a strong antioxidant activity with respect to free radical DPPH• compared with hesperetin. The introduction of copper ions into the Schiff base structure led to a less stimulating effect on the activity of MDR proteins in the cell lines. The ability of Schiff base of hesperetin (HIN) to inhibit MDR proteins may have the potential to develop low-toxicity antitumor and antimicrobial drugs.*

## ПРЕПОДАВАНИЕ ОСНОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ НУТРИЦИОЛОГИИ В КУРСЕ БИОХИМИИ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА

*Грицук А.И.<sup>2</sup>, Коваль А.Н.<sup>1</sup>, Никитина И.А.<sup>1</sup>, Логвинович О.С.<sup>1</sup>, Громыко М.В.<sup>1</sup>,  
Скрыпникова Л.П.<sup>1</sup>, Мышковец Н.С.<sup>1</sup>, Мазаник М.Е.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, г. Одесса, Украина

**Резюме.** Изучение основ нутрициологии предполагает знание биохимических процессов, происходящих на молекулярном уровне и включающих в себя превращение веществ, энергии и информации. Рассмотрение этого вопроса в курсе биохимии происходит после изучения студентами метаболизма основных нутриентов, роли витаминов, гормонов и микроэлементов в биохимически превращениях. На этой основе у студентов формируется понимание роли питания для поддержания своего здоровья.

При проведении опроса студентов самые простые, на первый взгляд, вопросы, ответ на которые очевиден, оказываются самыми глубокими и сложными. Например, о роли питания студенты часто дают ответ: «Для получения энергии и веществ для жизнедеятельности». Такой ответ не является полным. В курсе биологической химии на нашей кафедре мы даем такое определение биохимии:

*«Биохимия — это наука, изучающая качественный и количественный состав, а также пути, способы, закономерности, биологическую и физиологическую роль превращения вещества, энергии и информации в живом организме».*

Все живые организмы являются открытыми системами, поэтому обмен с окружающей средой осуществляется главным образом путем обмена вещества, энергии и информации.

Один из главных каналов этого обмена — питание. Следовательно, поступление пищи в организм — это поступление и вещества, и энергии, и информации.

Например, самой первой поступает информация о качестве и количестве пищи с помощью зрительных, обонятельных и вкусовых ощущений. Превращения вещества начинаются в ротовой полости (фермент амилаза слюны). Энергетический обмен происходит главным образом в митохондриях каждой клетки, но часть энергии уже выделяется в ходе переваривания пищи и обмена основных пищевых составляющих в цитоплазме клеток.

Таким образом, задаваясь вопросом о ценности питания и важности его для сохранения и поддержания здоровья, необходимо подчеркнуть комплексность и системность этого вопроса. Уже с первых занятий по биологической химии у студентов должно сформироваться представление об основополагающей роли биохимии в понимании механизмов питания.

Изучая энзимологию и энергетический обмен, студенты уже знают, что кроме главных веществ пищи (белков, углеводов, жиров) необходимы также витамины, макро- и микроэлементы, в том числе для обеспечения нормального метаболизма в качестве коферментов. В ходе изучения биохимии углеводов, липидов, белков и нуклеиновых кислот преподаватель разъясняет особенности химических превращений, лежащих в основе нормального и метаболизма и некоторых случаев патологии. Таким образом, студенты готовы воспринимать информацию о роли питания в здоровье человека уже на базе сформировавшихся представлений о тканевом и клеточном метаболизме, что способствует пониманию роли питания в развитии и формировании здоровья.

Нутрициологию часто определяют как науку о питании человека, хотя толкование этого термина у разных авторов неоднозначное.

**Нутрициология** (от лат. *nutricium* — питание) — наука о питании человека. В ее основе лежит концепция так называемого оптимального (рационального) питания — необходимость потребления пищевых и биологически активных веществ, обеспечивающая оптимальную реализацию физиолого-биохимических процессов, закрепленных в генотипе человека. Согласно этой концепции, энергетическая ценность рациона человека должна соответствовать энерготратам организма; величины потребления основных пищевых веществ (белков, жиров и углеводов) должны находиться в пределах физиологически необходимых соотношений между ними; содержание макроэлементов и так называемых эссенциальных микроэлементов должно соответствовать физиологическим потребностям человека; содержание минорных (действующих негативно) компонентов пищи должно быть адекватным уровням их потребления. [2]. Другие авторы определяют нутрициологию как «...новую, пограничную между диетологией и фармакологией область знаний, которая получила название нутрициология, или наука о лечении отдельными микронутриентами и их сбалансированными комплексами» [1].

Современная нутрициология тесно интегрирована с геномикой, протеомикой, метаболомикой, биоинформатикой, нанобиотехнологией, молекулярной биологией, биохимией и базируется на новейших достижениях в этих науках [3].

В рамках нутрициологии можно условно выделить два направления.

**1. Общая нутрициология** — включает в себя информацию о еде, продуктах, нутриентах, их видах, сведениях о количестве пищевых веществ в продуктах и о метаболизме (витаминный, жировой, белковый и т. д.).

**2. Практическая нутрициология** — практические аспекты проблемы питания, развитие различных видов заболеваний из-за неполноценного и несбалансированного питания, а также лечебное и профилактическое влияние здоровой пищи и здорового образа жизни на организм человека.

Эти направления тесно связаны и взаимодополняют друг друга [4].

Более углубленно студенты нашего университета изучают роль питания на занятии по нутрициологии в курсе «Основы медицинской биохимии», на котором рассматриваются вопросы энергетических потребностей организма, принципы рационального питания, калорийность, регуляция пищевого поведения, обмен веществ в различные периоды жизнедеятельности, в том числе и при разных уровнях физической активности. Также рассматриваются альтернативные теории питания (вегетарианство, лечебное голодание, сыроедение, сухоедение, концепция раздельного питания, концепция главного пищевого фактора — их плюсы и минусы), расстройства пищевого поведения (анорексия и булимия), патологические состояния, связанные с нарушениями пищевого поведения.

Практическая часть занятия включает в себя решение ситуационных задач по расчету своего индекса массы тела по формуле Кетле, величины своего основного обмена (ВОО) по формуле Mafflin-St.Jeor. Исходя из полученных данных, с помощью табличных коэффициентов физической активности, студенты могут рассчитать необходимое суточное количество калорий для поддержания нормальной массы тела, а также сделать вывод о рациональности своего питания.

Такие занятия формируют глубокое понимание роли питания в поддержании здоровья и ответственное отношение студентов к своему здоровью.

**Заключение.** Понимание биохимии необходимо будущим врачам как основа формирования компетенций в области нутрициологии, которую можно рассматривать как интеграционную дисциплину, включающую в себя знания из смежных современных научных направлений. Практические занятия способствуют также формированию у студентов ответственного отношения к своему здоровью.

### Список литературы

1. Роль биологически активных добавок в системе подготовки спортсменов: метод. пособие / В.А. Курашвили [и др.] // Центр инновационных спортивных технологий Москомспорта, 2008. — 114 с.
2. Мартинчик, А.Н. Общая нутрициология: учеб. пособие / А.Н. Мартинчик, И.В. Маев, О.О. Янушевич. — М.: Медпресс-информ, 2005. — 392 с.
3. Маталыгина, О.А. Современные научные направления в нутрициологии и их влияние на развитие рынка детских продуктов / О.А. Маталыгина // Вопросы современной педиатрии. — 2010. — Т. 9, № 2. — С. 82–86.
4. Основы здорового питания: пособие по общей нутрициологии / А.В. Скальный [и др.] — Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005. — 117 с.

## TEACHING THE FUNDAMENTALS OF MOLECULAR NUTRICIOLOGY IN THE COURSE OF BIOCHEMISTRY OF MEDICAL UNIVERSITY

---

*Gritsuk A.I.<sup>2</sup>, Koval A.N.<sup>1</sup>, Nikitina I.A.<sup>1</sup>, Logvinovich O.S.<sup>1</sup>,  
Gromyko M.V.<sup>1</sup>, Skrypnikova L.P.<sup>1</sup>, Myshkovets N.S.<sup>1</sup>, Mazanik M.E.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Gomel State Medical University,  
Gomel, Republic of Belarus;  
<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Odessa National University,  
Odessa, Ukraine*

**Summary.** *Studying the fundamentals of nutritiology involves knowledge of biochemical processes taking place at the molecular level and including the conversion of substances, energy and information. Consideration of this issue in the biochemistry course occurs after students study the metabolism of the main nutrients, the role of vitamins, hormones and trace elements in biochemical transformations. On this basis, the understanding of the role of nutrition in maintaining of students' health is formed.*

## ОЦЕНКА БИОДОСТУПНОСТИ ВИТАМИНА D ПРИ БОЛЮСНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА И КОМПЛЕКСА ВИТАМИНОВ

*Гуринович В.А., Хвесько И.С., Мойсейнок А.Г.*

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

**Резюме.** Сопоставлены уровни традиционного биомаркера D-витаминного статуса — 25(OH)D и нетрансформированного кальциферола в крови и в тканях органов при болюсном введении холекальциферола, что дает возможность изучать биодоступность витамина D при различных условиях и в разных схемах введения. Не отмечена модуляция эффекта 3-х кратного введения холекальциферола при одновременном назначении витаминов B2 и K.

**Введение.** Состояния недостаточности и дефицита потребления витамина D носят распространенный характер, подтверждены многочисленными исследованиями и укрепляют мнение о существовании пандемии D-витаминного дефицита [8]. Актуализируется увеличение рекомендуемых норм потребления витамина D в питании людей различного возраста, а также доз D-витаминной профилактики и коррекции витаминного статуса, что обуславливает широкий поиск рациональных подходов на основе применения таких субстанций как эргокальциферол (D<sub>2</sub>), холекальциферол (D<sub>3</sub>), кальцидиол (25(OH)D) или кальцитриола (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) — как высокоэффективной и быстро метаболизируемой формы. Определенное предпочтение отдается мицеллярной форме холекальциферола, тогда как кальцитриол является малодоступной формой для витаминпрофилактики.

Критичность существующей ситуации отягощается отсутствием сведений о биодоступности витамин D-содержащих субстанций на фоне растущих показаний к назначению кальциферола в связи с его оценкой как витамина-гормона и множественностью внекостных функций, определяющих недостаток витамина D в качестве фактора риска сердечно-сосудистых, онкологических, эндокринных и неврологических заболеваний [9, 10, 12]. Лечебно-профилактическое применение кальциферола показывает его плеiotропность, что наряду с риском избыточного применения порождает возможность побочных эффектов. Стремление к достижению лечебно-профилактического эффекта влечет увеличение доз кальциферолов и угрозу возникновения гипervитаминозного состояния, присущего всем жирорастворимым витаминам. Одним из основных проявлений избыточного применения D-витаминных субстанций является гиперкальциемия вследствие абсорбции кальция из костного аппарата [1]. Между тем, полученные фундаментальные знания, указывают на первостепенное значение межвитаминных взаимосвязей в обеспечении эндокринного и кальцийтропного потенциала кальцитриола, оптимизации регуляции количества и лигандирования рецепторов VDR [7]. Новые знания о гормональных функциях кальциферолов, поиск оптимизации их плеiotропного действия, оценки D-витаминного статуса при различных физиологических и патологических состояниях организма недостаточно учитывают взаимодействие холекальциферолов с другими микронутриентами и предопределяют угрозу неадекватного и неэффективного их применения [3].

Возникает вопрос: не может ли «межвитаминный» баланс быть серьезным оптимизирующим фактором биодоступности витамина D и реализации его разносторонних функций? С другой стороны, достаточны ли дозировки витамина D в составе поливитаминных или витаминно — минеральных комплексов для удовлетворения потребности организма в кальцифероле? Сопоставление рецептур и технологий применения приводит к неудовлетворительному выводу: эффективность предлагаемых комплексов требует серьезных доказательств и выверенных схем применения [2]. С учетом фактора межвитаминных связей предполагается, что потребность в витамине D (как и других витаминах) может быть модулирована балансом других витаминных факторов, особенно функционально связанных. Это подчеркивается в цикле работ, выполненных в Институте питания РАМН под руководством В.Б. Спиричева и положенных в основу концепции «Витамин D3 + 12 витаминов», предлагаемой к реализации в различных технологиях фортификации пищевых продуктов [4-6].

Таким образом, роль межвитаминных взаимоотношений, выявленная и обоснованная многолетним опытом поливитаминопрофилактики, может иметь и приобретает первостепенное значение в предупреждении недостаточности витамина D. В этой связи и с учетом распространенности D-витаминного дефицита особое внимание должно быть обращено на фортификацию пищевых продуктов и рационов с учетом факторов межвитаминных взаимосвязей для реализации плейотропных свойств витамина D как полифункционального микронутриента (витамина-гормона) в предупреждении неблагоприятных последствий экстремальных состояний и риска развития важнейших неинфекционных заболеваний человека.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты проводили на 72 крысах-самцах массой 280-290 г. линии Wistar CRL: (WI) WUBR, содержащихся в стандартных условиях вивария при постоянном доступе к полноценному корму и питьевой воде.

Животных разделяли на 4 экспериментальные группы по 18 особей в группе: 1 группа — контрольные животные; 2 группа — болюсное введение витамина D<sub>3</sub>; 3 группа — болюсное введение композиции витамина D<sub>3</sub> и витаминов B<sub>2</sub> + K; 4 группа — витамин B<sub>2</sub> + витамин K.

Длительность введения препаратов витамин B<sub>2</sub> в/ж, 4 мг/кг + витамин K (препарат «Викасол») в/ж 1,3 мг/кг составила 6 дней, введение витамина D<sub>3</sub> (препарат 100 SD/S DSM, вододиспергирующая форма) осуществляли на 3 день эксперимента в течение 3-х дней по 20000 МЕ/кг (суммарная доза 60000 МЕ/кг).

Животные из каждой группы были разделены на 3 подгруппы, соответственно периодам декапитации. Декапитацию животных осуществляли на 7, 14, 21-ый день от начала введения витаминов B<sub>2</sub> + K, т.е. на 1-й, 8-й и 15-й день после отмены введения витамина D<sub>3</sub>. Животных выводили из эксперимента путем декапитации, забирали образцы крови (для получения плазмы крови) и тканей (печень, почки) для дальнейшего анализа.

В плазме крови определяли уровень неорганического фосфора и общего кальция, используя наборы «Анализ-Х» и активность щелочной фосфатазы («Анализ Мед Про», РБ).

Для определения 25(OH)D<sub>3</sub> в плазме крови применяли модифицированный нами метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [11]. К 0,5 мл плазмы добавляли 10 мкл ретинил ацетата (внутренний стандарт) и 0,4 мл этанола и после перемешивания на вортексе проводили экстракцию гексаном, который упаривали в потоке газообразного азота. К сухому остатку добавляли 130 мкл метанола, после перемешивания и фильтрации через фильтр 0,45 мкм пробы использовали для УВЭЖХ на колонке Poroshell 120 EC-C18 размером 2,2 x 150 мм; 1,9 мкм (хроматограф Agilent Infinity II 1290 с диодно-матричным детектором).

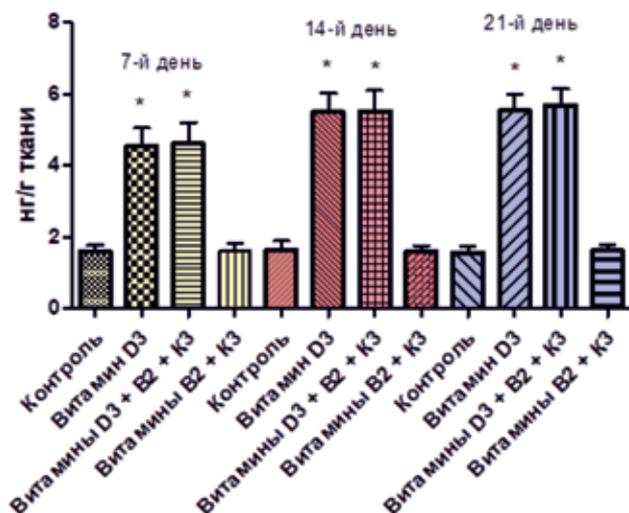
Условия хроматографического анализа: подвижная фаза метанол-вода (95:5)/ацетонитрил в объемном соотношении 75/25; детектирование при 265 нм; скорость подачи подвижной фазы

0,3 мл/мин, объем вводимой пробы — 5 мкл. В качестве стандартов применяли 25-гидроксивитамин D<sub>3</sub>, (Cayman Chemical) и витамины D<sub>3</sub>, D<sub>2</sub> (Sigma).

Метод анализа витамина D<sub>3</sub> в тканях белых крыс включал стадию щелочного гидролиза. Навеску ткани массой 0,3 г помещали в стеклянный гомогенизатор, добавляли 12 см<sup>3</sup> этилового спирта, 50 мг аскорбиновой кислоты. К полученному гомогенату добавляли 4 см<sup>3</sup> свежеприготовленного 60% раствора КОН. После добавления щелочи образцы встряхивали в темноте 15 ч при комнатной температуре. Затем добавляли к содержимому последовательно 12 мл деионизованной воды и 7 мл гексана, встряхивали 5 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Гексановую фракцию отбирали и фильтровали медленно через слой безводного сернокислого натрия на бумажном обеззоленном фильтре. Аликвоту гексановой фракции (5 мл) переносили в стеклянные центрифужные пробирки и упаривали досуха в потоке газообразного азота при температуре 40 °С. Остаток растворяли в метаноле и 5 мкл вводили в хроматограф.

Все полученные количественные данные обрабатывали с помощью статистической программы GraphPad Prism (Version 6.0). Для оценки достоверности различий между средними использовали ANOVA, тест Тьюки. Достоверно считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** В нашем эксперименте по оценке биоэффективности и биодоступности витамина D<sub>3</sub> при его применении в дозе 60000 МЕ/кг и его композиции с витаминами В<sub>2</sub> и К отмечена стабильность показателей минерального обмена в крови на протяжении всего эксперимента. С использованием ультра-ВЭЖХ установлена схожесть показателей печени и почек по биодоступности витамина D в условиях болюсного назначения высоких доз холекальциферола и его композиции с функционально связанными витаминами и устойчивость насыщенности тканевых структур как кальцидиолом так и нетрансформированным витамином D (рисунок 1).

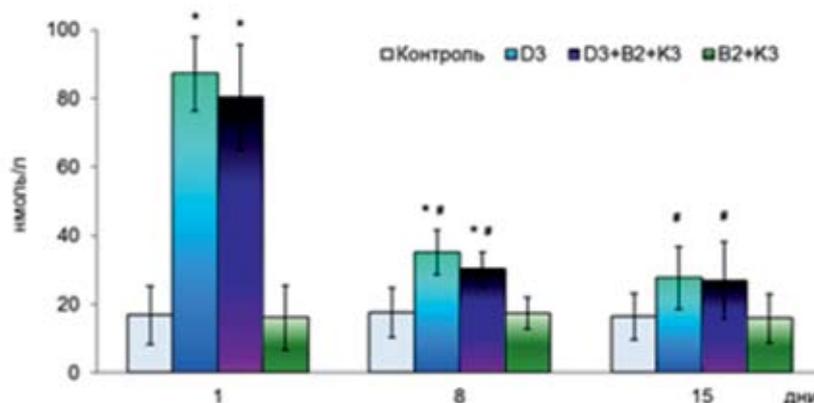


**Рисунок 1 — Содержание 25(OH)D<sub>3</sub> в печени крыс при болюсном введении холекальциферола и комплекса витаминов на 7, 14 и 21 день эксперимента.**

Примечание — \* —  $p < 0,05$  по отношению к группам «Контроль» и «B<sub>2</sub>+K<sub>3</sub>».

Определена динамика изменения уровня витамина D и его биотрансформированной (кальцидиол) формы в крови, проявившаяся в снижении их концентрации в 2,5 раза через 8 дней и стабилизации содержания гидроксилированной формы через 15 дней после отмены введения витамина D<sub>3</sub> (рисунок 2).

В отличие от плазмы крови, в которой при введении холекальциферола в наблюдаемый период эксперимента обнаружено прогрессивное снижение уровня нетрансформированного витамина D от  $65,6 \pm 8,7$  нмоль/л до  $10,5 \pm 3,6$  нмоль/л, в тканях печени и почек выявлен высокий и стабильный его уровень в пределах  $9,2-7,1$  нг/г.



**Рисунок 2 — Содержание 25(OH)D в плазме крови крыс при болюсном введении холекальциферола и витаминов В<sub>2</sub>+К через 1, 8 и 15 дней после отмены введения витамина D<sub>3</sub>.**

Примечание — \* —  $p < 0,05$  по отношению к группам «Контроль» и «В<sub>2</sub>+К<sub>3</sub>», # —  $p < 0,05$  по отношению к группам «D<sub>3</sub>» и «D<sub>3</sub>+В<sub>2</sub>+К<sub>3</sub>» (1 день после отмены введения D<sub>3</sub>), (ANOVA, тест Тьюки).

**Заключение.** Сопоставлены уровни традиционного биомаркера D-витаминного статуса — 25(OH)D и нетрансформированного кальциферола в крови и в тканях органов при болюсном введении холекальциферола, что дает возможность изучать биодоступность витамина D при различных условиях и в разных схемах введения. Не отмечена модуляция эффекта 3-х кратного введения холекальциферола при одновременном назначении витаминов В<sub>2</sub> и К, а также у животных, которым вводили только викасол и рибофлавин. Следовательно, эффект функционально-связанных витаминов не проявляется при использовании водорастворимой формы кальциферола.

### Список литературы

1. Безопасность витаминов: возможные и мнимые угрозы / А.Г. Мойсеенок, Т.С. Морозкина, Е.А. Мойсеенок и др. // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. — 2013. — № 1. — С. 29–32.
2. Коденцова, В.М., Вржесинская О.А. Научно обоснованные принципы выбора витаминно-минеральных комплексов для их рационального применения // Сборник науч. статей «Питание и обмен веществ» (ред. А.Г. Мойсеенок). Минск, 2016. — Вып. 4. — С. 67–83.
3. Мойсеёнок, А.Г. Межвитаминные взаимоотношения — развитие идеи академика Ю. М. Островского в медицинской науке // Материалы междунар. науч. конф. «Биологически активные соединения в регуляции метаболического гомеостаза» (ред. Л.И. Нефедов). — Гродно: ГрГУ, 2000. — Ч.2. — С. 52–56.
4. Спиричев, В.Б. О биологических эффектах витамина D // Педиатрия. — 2011. — Т. 90, № 6. — С. 8
5. Спиричев, В.Б., Громова О.А. Витамин D и его синергисты // Земский врач. — 2012. — № 2. — С. 33–38.

6. Спиричев, В.Б., Шатнюк Л.Н. Научная концепция «D3+12 витаминов» — эффективный путь обогащения пищевых продуктов // Пищевые ингредиенты: сырье и добавки. — 2013. — №1. С. 24–32.

7. Genetic and epigenetic factors influencing vitamin D status / A. Bahrami, H.R. Sadeghnia, S.A. Tabatabaeizadeh et al. // J. Cell. Physiol. — 2018. — Vol. 233, №5. — P. 4033–4043. Громова О.А., Торшин И.Ю. Витамин D — смена парадигмы / М., ГэотарМед. — 2017, 750 с.

8. Holick, M. Vitamin D is not as toxic as was once thought: a historical and an up-to-date perspective // Mayo Clin. Proc. — 2015. — Vol. 90, №5. — P. 561–564.

9. Relationship between vitamin D status and vitamin D receptor gene polymorphisms with markers of metabolic syndrome among adults / T. Karonova, E. Grineva, O. Belyaeva et al. // Front. Endocrin. (Lausanne). — 2018. — Vol. 9. — P. 1–7.

10. The vitamin D receptor gene polymorphisms in asthmatic children: a case-control study / M. Kilic, S. Ecin, E. Taskin et al. // Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol. — 2019. — Vol. 32, №2. — P. 63–69.

11. Turpeinen, U., Hohenthal U., Stenman U-H. Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay // Clin. Chem. — 2003. — Vol. 49, №9. — P. 1521–1524.

12. Vitamin, D receptor gene polymorphism: an important predictor of arthritis development / M. Mukhtar, N. Sheikh, S.K. Suqaina et al. // Biomed. Res. Int. — 2019. — Vol. 2019. — P. 1–8.

## EVALUATION OF BIOAVAILABILITY OF VITAMIN D AFTER ADMINISTRATION OF BOLUS DOSE OF CHOLECALCIFEROL AND VITAMIN COMPLEX

---

*Gurinovich V.A., Khvesko I.S., Moiseenok A.G.*

*Republican Scientific Research Unitary Enterprise  
«Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds  
of the National Academy of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *The levels of the traditional biomarker of D-vitamin status, blood and tissue 25(OH)D and untransformed cholecalciferol, determined after administration of a bolus dose of cholecalciferol, were compared. This makes it possible to study bioavailability of vitamin D under different conditions and administration schedules. No modulation in the effect of the 3-fold administration of cholecalciferol was found after concomitant treatment with vitamins B2 and K.*

## ЭФФЕКТЫ ЭПИГАЛЛОКАТЕХИНГАЛЛАТА И РЕСВЕРАТРОЛА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ И АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ, КОНТАКТИРОВАВШИХ С СИГАРЕТНЫМ ДЫМОМ

---

*Девина Е.А., Принькова Т.Ю.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** Изучены эффекты эпигаллокатехингаллата (ЭГКГ) и ресвератрола на изолированных альвеолярных макрофагах (АМ) крыс, контактировавших с экстрактом сигаретного дыма (ЭСД) в течение 1 и 20 ч. ЭГКГ и ресвератрол снижают окислительную модификацию белков и препятствуют снижению активности ферментных антиоксидантов и глутатиона в АМ после 1 ч инкубации с ЭСД. Однако, длительный контакт АМ с ЭСД ослабляет действие ЭГКГ и изменяет эффект ресвератрола на прооксидантный.

**Введение.** В формировании воспалительного процесса в легких при вдыхании сигаретного дыма непосредственное участие принимают альвеолярные макрофаги (АМ) [5,15]. Сигаретный дым содержит большое количество высокорекреационных частиц, которые, попадая в альвеолярное пространство, способствуют протеканию свободно-радикальных реакций и усиливают генерацию активных форм кислорода (АФК) альвеолярными макрофагами и нейтрофилами. АФК, такие как супероксид анион ( $O_2^{\cdot-}$ ) и гидроксильный радикал ( $OH^{\cdot}$ ), обладают высокой реакционной способностью к окислению органических молекул. Особую роль в этих процессах отводят окислительной модификации белков (ОМБ), белков-ферментов, компонентов цитоскелета, транскрипционных факторов (NF- $\kappa$ B, p53, Nrf2 и AP-1), играющих важную роль в регуляции процессов пролиферации, апоптоза, межклеточного взаимодействия [3]. Необратимая модификация функциональных групп, приводящая к образованию карбонильных производных белков, изменению структуры их аминокислотных остатков, в частности цистеина, триптофана, тирозина, способствует появлению новых продуктов, которые являются причиной вторичного повреждения биомолекул [15].

Основу антиоксидантной защиты клетки составляют супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза (ГПО) и глутатион, так как они предотвращают цепные свободно-радикальные реакции посредством снижения концентраций радикалов, инициирующих этот процесс.

В настоящее время обсуждается целесообразность применения полифенольных соединений для воздействия на окислительный стресс и воспалительную реакцию в клетках легких [1,12].

Эпигаллокатехин галлат (ЭГКГ) — [(2*R*,3*R*)-5,7-дигидрокси-2-(3,4,5-тригидроксифенил)хроман-3-ил] 3,4,5-тригидроксибензоат, тип катехина, содержащийся в больших количествах в зеленом чае.

Ресвератрол (3,5,4'-тригидроксистилбен) представляет собой природный полифенол, который обнаружен во многих растениях, как вторичный метаболит. Впервые был выделен из *Veratrum grandiflorum*.

Ресвератрол и ЭГКГ ингибируют индуцибельную NO-синтазу (iNOS), циклооксигеназу-2, активаторный протеин-1 (AP-1) и факторы транскрипции (NF- $\kappa$ B, Nrf2) [8], а также обладают выраженным иммуномодулирующим действием [2, 4, 11].

Как полифенолы данные соединения обладают антиоксидантной активностью *in vitro* и *in vivo*, уменьшая концентрацию пероксида водорода, гидроксильных и супероксид анион радикалов [13], снижая интенсивность процессов перекисного окисления липидов [9,10]. Было показано, что ресвератрол уменьшал цитотоксичность и снижал продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ИЛ-8) в эпителиальных клетках легких человека, которые инкубировались в присутствии твердой фазы сигаретного дыма [6]. Прединкубация эпителиальных бронхиальных клеток человека с ЭГКГ значительно подавляла активацию ERK1/2, JNK и NF- $\kappa$ B, индуцированную конденсатом сигаретного дыма [11].

Однако, данные о влиянии полифенольных соединений на ОМБ и систему глутатиона немногочисленны и противоречивы. Olas B. и Nowak M. выявили, что ресвератрол снижает ОМБ, индуцированную пероксинитритом в тромбоцитах человека. Princen H., напротив, не обнаружил эффекта ЭГКГ и других полифенолов на скорость окисления липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в плазме крови у курильщиков.

**Цель исследования** — определить уровень окислительной модификации белков и состояние антиоксидантной системы в альвеолярных макрофагах крыс в условиях воздействия экстракта сигаретного дыма (ЭСД), а также оценить целесообразность использования ресвератрола и ЭГКГ для предотвращения изменений, вызванных сигаретным дымом.

**Материалы и методы исследования.** АМ получали из бронхоальвеолярного лаважа крыс (выполнено с соблюдением этических норм обращения с животными). Клеточную суспензию высеивали на чашки Петри в концентрации  $2 \cdot 10^6$  макрофагов, добавляли ресвератрол (10 мкмоль) или ЭГКГ (10 мкмоль) и помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор (температура  $37^\circ\text{C}$ , увлажненная атмосфера, 5%  $\text{CO}_2$ ) на 120 мин. После инкубации жидкую фазу удаляли, к адгезированным макрофагам добавляли ДМЕМ, обогащенную сигаретным дымом (0,7 и 2,1 г/л смол), инкубировали в течение 1 и 20 ч.

ЭСД 2,1 г/л был приготовлен путем пропускания дыма от трех сигарет («Корона», РБ; содержание смол в 1 сигарете — 14 мг) со скоростью 1 сигарета/мин через 20 мл среды ДМЕ с помощью вакуумного насоса. Концентрацию ЭСД 0,7 г/л получали путем разведения исходного экстракта. ЭСД-среду стерилизовали с помощью фильтра (диаметр пор 0,22 мкм).

После инкубации АМ соскребали с поверхности чашек скрепером, и клеточную суспензию гомогенизировали. Определение содержания глутатиона (G-SH) проводили спектрофотометрически с использованием реактива Элмана. Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали по количеству образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов в реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрофотометре. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) — по скорости окисления G-SH в присутствии гидроперекиси трет-бутила. Активность каталазы измеряли методом комплексообразования с солями молибдена. Отклонения определяемых показателей оценивали путем сравнения их значений с полученными при исследовании АМ, которые не контактировали с сигаретным дымом (контроль). Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica 10. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи U-теста Манна-Уитни для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Определение содержания карбонильных групп аминокислотных остатков рассматривается как показатель, характеризующий выражен-

ность химических изменений в структуре белка в зависимости от интенсивности свободнорадикальных процессов. Нами установлено, что в АМ, контактировавших в течение 1 ч с экстрактом сигаретного дыма, увеличивается содержание карбонильных производных в 2 раза (концентрация ЭСД 0,7 г/л) и в 2,5 раза (концентрация ЭСД 2,1 г/л). При увеличении длительности инкубации независимо от концентрации ЭСД содержание карбонильных производных в АМ возросло в 7 раз, по сравнению с контрольным значением (1,3 нмоль/мг) и составило 7,2 нмоль/мг белка.

Ресвератрол и эпигаллокатехин галлат не оказывали влияния на окислительную модификацию белков в интактных АМ. Однако, если клетки контактировали с ЭСД в течение 1 часа, то прединкубация их с ресвератролом и ЭГКГ приводила к уменьшению содержания карбонильных производных на 32,1 и 43,7%, соответственно. При длительной инкубации клеток с ЭСД в присутствии ресвератрола содержание карбонильных производных не только не снижалось, а напротив, увеличивалось на 18,8 % по сравнению с АМ, которые инкубировались без ресвератрола, но контактировали с ЭСД. В то же время ЭГКГ достоверно уменьшал окисление белков в АМ, длительно контактировавших с ЭСД.

Содержание восстановленного Г-SH в АМ, предварительно обработанных ЭГКГ и ресвератролом, через 1 ч инкубации не отличалось от уровня этого показателя в интактных АМ (12,5: 11,8-16,4 нмоль/мг белка). Более длительная инкубация этих клеток сопровождалась статистически значимым повышением Г-SH. Так, после инкубации клеток с ресвератролом содержания Г-SH в них увеличивалось на 18,7%, при инкубации с ЭГКГ – на 23,1%, по сравнению с контрольным значением.

При контакте АМ с экстрактом сигаретного дыма в клетках уменьшается содержание восстановленного Г-SH, причем, данные демонстрируют прямую концентрационную зависимость от дозы ЭСД и времени экспозиции. Так, содержание восстановленного Г-SH в АМ, контактировавших непродолжительно с ЭСД низкой концентрации (0,7 г/л) составило 10,2 нмоль/мг белка. Длительный контакт клеток с ЭСД высокой концентрации (2,1 г/л) приводил к резкому снижению количества восстановленного глутатиона, до 5,8 нмоль/мг белка.

Инкубация клеток с ЭГКГ, как и с ресвератролом, препятствовала снижению Г-SH в АМ, контактировавших с ЭСД, как при кратковременной, так и длительной инкубации, но показатель оставался ниже контрольных значений.

Установленное нами увеличение содержания карбонильных производных белков и снижение количества восстановленного Г-SH в АМ после их совместной инкубации с ЭСД свидетельствует об окислительном повреждении клеточных протеинов и небелковых SH-соединений, к которым относится Г-SH. Известно, что в сигаретном дыме содержится большое количество свободных радикалов, таких как  $O_2^{\cdot-}$ ,  $NO_2^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $OONO^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ . В работе Ciolino H. и соавт. получены экспериментальные доказательства того, что инкубация клеток с АФК, в частности, инкубация эндотелиальных клеток аорты с  $H_2O_2$  приводит к многократному повышению карбонильных производных. Белки являются эффективными ловушками АФК, и их окислительная модификация рассматривается как один из маркеров окислительного повреждения в тканях.

Обнаруженное нами снижение окислительной модификации белков, как и уменьшение степени снижения уровня Г-SH в условиях воздействия ЭСД, если этому предшествовала обработка клеток ресвератролом или ЭГКГ, вероятнее всего связано с потенциальной возможностью полифенолов улавливать свободные радикалы. Ранее было выявлено, что в присутствии ресвератрола снижается продукция супероксидных анион радикалов ( $O_2^{\cdot-}$ ) и  $H_2O_2$  в перитонеальных макрофагах. А анализ данных проточной цитометрии показал, что ресвератрол снижает

ет в митохондриях эндотелиальных клеток коронарных артерий продукцию АФК, что в свою очередь в значительной степени ослабляет окислительный стресс [13].

Также, на модели электронно-спинового резонанса была показана способность ЭГКГ улавливать  $O_2^{\cdot-}$ , синглетный кислород ( $^1O_2$ ), пероксильный радикал ( $RO_2^{\cdot}$ ), и пероксинитрит ( $OONO^{\cdot-}$ ). Полагают, что в структуре ЭГКГ наличие галлатной группы в 3 положении ОН-группы в 5г положении В-кольца играет главную роль в антирадикальной защите клеток [11].

Полагаем, что действие полифенолов на клетки не ограничивается только их участием в окислительно-восстановительных реакциях. Так, в АМ, обработанных ресвератролом или ЭГКГ, концентрация Г-SH не изменялась через 1 ч инкубации, а через 20 ч наблюдалось значительное увеличение его содержания. В клетках, предварительно обработанных ресвератролом или ЭГКГ и впоследствии контактирующих с ЭСД, содержание Г-SH было выше, по сравнению с клетками без прединкубации с антиоксидантами. Есть основания предполагать, что это связано с возможностью оказывать влияние на синтез Г-SH в альвеолярных макрофагах. Показано, что ресвератрол способен через редокс-зависимый транскрипционный фактор увеличивать синтез Г-SH в эпителиальных клетках легких человека [8]. Описана способность ЭГКГ увеличивать активность  $\gamma$ -глутамилцистеинлигазы, ключевого фермента синтеза глутатиона в звездчатых клетках печени крыс [7].

Нами установлено, что инкубация АМ в течение 1 ч с ресвератролом и ЭГКГ достоверно приводит к увеличению активности каталазы и ГПО в этих клетках. Так, после инкубации с ресвератролом активность каталазы увеличилась на 24,6%, а активность ГПО возросла на 23,1% от контрольного значения (контроль 54,7:53,6-54,8 мкмоль/мин/мг белка). При инкубации с ЭГКГ активность каталазы и ГПО возрастала на 15,8% и 28,5%, соответственно. Напротив, через 20 ч в клетках, которые инкубировались с ресвератролом отмечалось снижение активности каталазы, в то время как ЭГКГ не изменял активность этого фермента. Ресвератрол и ЭГКГ незначительно увеличивали (на 12,1 %) активность ГПО.

Активность каталазы и ГПО значительно снижалась после экспозиции с ЭСД.

В макрофагах, которые инкубировались с ЭСД 0,7 г/л в течение 1 ч, активность каталазы и ГПО существенно выросла под влиянием ресвератрола и ЭГКГ, достигнув контрольных значений (которые были получены в клетках, не подвергавшихся действию ЭСД и полифенолов). Ресвератрол и ЭГКГ также препятствовали снижению активности каталазы и ГПО в АМ при концентрации ЭСД 2,1 г/л, хотя контрольный уровень активности не был достигнут. При длительной инкубации особенность заключалась в том, что в клетках, обработанных ЭГКГ, активность ГПО и каталазы оставалась сниженной под влиянием ЭСД, а в клетках, обработанных ресвератролом, и контактировавших с ЭСД, активность каталазы и ГПО была еще более низкой, чем в клетках без ресвератрола, но контактировавших с ЭСД.

Показано, что внутриклеточной концентрацией Г-SH определяется активность и эффективность защитного действия ГПО. Поэтому, представляется логичным наблюдаемое нами параллельное увеличение концентрации восстановленного Г-SH в АМ, обработанных ресвератролом или ЭГКГ и пропорциональный рост активности ГПО. Причем, аналогичное явление происходило в контрольных АМ и в АМ, контактировавших с ЭСД.

Есть сведения, что ресвератрол ингибирует активность каталазы и увеличивает активность ГПО и глутатионтрансферазы в изолированных лимфоцитах человека в условиях окислительного стресса, индуцированного  $H_2O_2$ . Полученные нами результаты, напротив, показали увеличение активности каталазы в АМ после обработки их ресвератролом, и этот эффект был более выражен в макрофагах, которые кратковременно контактировали с ЭСД. При длительной ин-

кубации (20ч) с ресвератролом, наоборот, активность каталазы в АМ еще более снижалась. Обнаруженный неоднозначный эффект ресвератрола зависел от концентрации ЭСД и длительности инкубации клеток с ним. В литературе имеются указания на проявление прооксидантных свойств ресвератролом в присутствии металлов переменной валентности, таких как медь. Доказательством чего служит увеличение количества  $O_2^{\cdot-}$  и  $OH^{\cdot}$  в микросомах печени крыс в присутствии ресвератрола и  $Cu^{2+}$  [8]. Другие исследователи наблюдали повреждение ДНК при взаимодействии ресвератрола с АДФ- $Fe^{3+}$  в культуре опухолевых клеток [14].

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют об активации свободнорадикального окисления белков и снижении антиоксидантной защиты в условиях воздействия сигаретного дыма в альвеолярных макрофагах. Эпигаллокатехингалат и ресвератрол оказывают выраженное влияние на состояние окислительного метаболизма альвеолярных макрофагов, обеспечивая защиту путем поддержания активности ферментов антиоксидантной системы при непродолжительном контакте клеток с сигаретным дымом. Длительное взаимодействие клеток с сигаретным дымом ограничивает протекторное действие эпигаллокатехингалата и изменяет действие ресвератрола на прооксидантное.

Таким образом, использование ресвератрола с целью коррекции изменений свободно-радикального метаболизма в альвеолярных макрофагах, вызванных воздействием сигаретного дыма, нецелесообразно.

### Список литературы

1. Abdullah, S. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review / S. Abdullah, A.M. Posadino // *Int. J. Mol. Sci.* — 2020. — Vol. 21, №6. — P. 1–26.
2. Aggarwal, B. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies / B. Aggarwal, A. Bhardwaj // *Anticancer Res.* — 2004. — Vol. 24. — P.2783–2840.
3. Aoshiba, K. Oxidative stress, cell death, and other damage to alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke / K. Aoshiba, A. Nagai // *Tob. Induc. Dis.* — 2003. — Vol. 1. — №3. — P. 219–226.
4. Carrizzo, A. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases / A. Carrizzo, M. Forte // *Food Chem. Toxicol.* — 2013. — Vol. 61. — P. 215–226.
5. Cosio, M.G. Evasion of COPD in smokers: at what price? / M.G. Cosio, M. Saetta // *Eur. Respir. J.* — 2012. — Vol. 39. — №6. — P. 1298–1303.
6. Culpitt, S.V. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD / S. V. Culpitt, Rogers D.F // *Thorax.* — 2003. — Vol. 58. — P. 942–946.
7. Fu, Y. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of activated hepatic stellate cells by enhancing the capacity of glutathione synthesis / Y. Fu, S. Zheng // *Mol. Pharmacol.* — 2008. — Vol. 7, №5. — P. 1465–1473.
8. Lastra, A. C. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications / A. Lastra, I. Villegas // *Biochem. Society Transact.* — 2007. — Vol. 35. — P.1156–1160.
9. Leonard, S. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses / S. Leonard, C. Xia, B. Jiang // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2003. — Vol. 309. — №4. — P. 1017–1026.
10. Pinyaev, S. I. Influence of resveratrol on oxidation processes and lipid phase characteristics in damaged somatic nerves // *BioMed Research International* // Vol. 2019. Article ID 2381907. — P. 1–9.

11. Syed, D. Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF-kappaB activation in normal human bronchial epithelial cells / D. Syed, F. Afaq // *Oncogene*. — 2007. — Vol. 26. — № 5. — P. 673–682.

12. Tabak, C. Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones: the MORGEN Study / C. Tabak, I.C. Arts, H.A. Smit // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 164. — P. 61–64.

13. Ungvari, Z. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells / Z. Ungvari, N. Labinsky, P. Mukhopadhyay // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2009. — Vol. 297. — № 5. — P. 1876–1881.

14. Wu, J.M. Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues / J.M. Wu, T.C. Hsieh, Z. Wang // *Am. J. Cardiovasc. Dis.* — 2011. — Vol. 1. — № 1. — P. 38–47.

15. Zheng, D.J. Role of apoptotic cell clearance in pneumonia and inflammatory lung disease / D.J. Zheng, M. Abou Taka, B. Heit // *Pathogens*. — 2021. — Vol. 10. - № 2. — P. 1–32.

---

## **EFFECTS OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE AND RESVERATROL ON THE OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF ALVEOLAR MACROPHAGES BEING IN CONTACT WITH CIGARETTE SMOKE**

---

*Devina E.A., Prinkova T.Y.*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *The effects of resveratrol and epigallocatechin gallate (EGCG) on isolated alveolar macrophages (AM) of rats exposed to cigarette smoke extract (CSE) during 1 and 20 hours were studied. EGCG and resveratrol decrease the oxidative modification of proteins and prevent the reduction of enzymatic antioxidant activity and glutathione in AM after 1 h of incubation with CSE. However, prolonged contact of AM with CSE attenuates the effect of EGCG and changes the effect of resveratrol to a prooxidant one.*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТУШЕНИЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОСФОРНОГО ДЕНДРИМЕРА CPDG4

*Живицкая С.С.<sup>1</sup>, Абашкин В.М.<sup>2</sup>, Мажораль Ж.-П.<sup>3</sup>, Щербин Д.Г.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии  
Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Лаборатория координационной химии CNRS, г. Тулуза, Республика Франция

**Резюме.** В данной работе было исследовано тушение флуоресцентного излучение белков AST и LDH фосфорным дендримером CPDG4. На эффективность тушения влияло значение pH: тушение флуоресценции было тем выше, чем ниже было значение pH. При низких и средних значениях pH тушение шло менее интенсивно. Под действием CPDG4 наблюдался небольшой сдвиг спектра флуоресценции AST и LDH в коротковолновую область. CPDG4 сильно подавлял интенсивность флуоресценции обоих белков, однако глобула белка AST проявила большую стабильность в присутствии дендримера по сравнению с LDH.

**Введение.** В настоящий момент нанобиотехнологии широко используются для разработки носителей, способных доставлять лекарственные средства в целевые ткани и органы. Это особенно актуально для лечения онкологических заболеваний, патологий сердечно-сосудистой и нервной систем. Направленный транспорт лекарственных веществ в очаг развития патологического процесса способствует повышению эффективности уже существующего лечения. В экспериментальной и клинической медицине для этих целей широко исследуется возможность использования дендримеров. Дендримеры имеют гиперразветвленную структуру с поливалентными поверхностными функциональными группами, которые играют важную роль в контроле свойств дендримеров, а также в доставке терапевтических агентов, которые инкапсулируются в полости дендримеров или образуют с ними устойчивые комплексы [1].

**Материалы и методы исследования.** В данной работе исследовано влияние фосфорсодержащего дендримера 4-й генерации (CPDG4) на белки плазмы крови, флуоресценцию AST (Аспаратаминотрансфераза) и LDH (Лактатдегидрогеназа).

Аспарататрансаминаза (AST) или аспаратаминотрансфераза, также известная как AspAT / ASAT / ААТ или (сывороточная) глутаминовая щавелевоуксусная трансаминаза, представляет собой эндогенный фермент из группы трансфераз, подгруппы аминотрансфераз. AST катализирует обратимый перенос  $\alpha$ -аминогруппы между аспаратом и глутаматом и, как таковой, является важным ферментом в метаболизме аминокислот. AST содержится в печени, сердце, скелетных мышцах, почках, головном мозге и эритроцитах. AST представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц, каждая из которых имеет примерно 400 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу примерно 45 кДа [3].

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ / LDH) - это фермент, обнаруженный почти во всех живых клетках. ЛДГ катализирует превращение лактата в пируват и обратно, поскольку он превращает НАД + в НАДН и обратно. ЛДГ широко экспрессируется в тканях организма, таких как клетки крови и сердечная мышца. Поскольку он высвобождается при повреждении тканей, он

является маркером распространенных травм и заболеваний, таких как сердечная недостаточность [5]. Лактатдегидрогеназа катализирует взаимное превращение пирувата и лактата с одновременным взаимным превращением НАДН и НАД<sup>+</sup>. Он превращает пируват, конечный продукт гликолиза, в лактат, когда кислород отсутствует или его не хватает, и он выполняет обратную реакцию во время цикла Кори в печени [4]. Лактатдегидрогеназа состоит из четырех субъединиц (тетрамера). Двумя наиболее распространенными субъединицами являются белок LDH-M и LDH-H, кодируемые генами LDHA и LDHB соответственно [2].

В данной работе использовался классический фосфорный дендример 4-й генерации - CPDG4, синтезированный на базе Университета Тулузы (Тулуза, Франция). Молярная масса составила 33700 г/моль, поверхностный заряд — 96. Так как приведенные числовые значения были рассчитаны теоретически, практические значения могут несколько отличаться.

Стоковые растворы AST, LDH и CPDG4 были подготовлены в PBS буфере. Непосредственно для исследования был использован универсальный буфер Бриттона-Робинсона (UBRB), который возможно использовать в широком диапазоне pH. Растворы белков в концентрации 10 мМ инкубировались 10 минут для достижения белком равновесной конформации, раствор тщательно ресуспендировался. Кварцевую кювету с раствором, с длиной оптического пути 1 см, помещали в флюориметр при 25 градусах Цельсия. Параметры измерения: длина испускаемой волны — 295 нм; диапазон регистрации флуоресценции - 310-380 нм; ширина щели для испускаемого света — 10; ширина для принимаемого света — 5; чувствительность средняя. Измерения проводились при трёх значениях pH: 7.4, 5.7, 8.2.

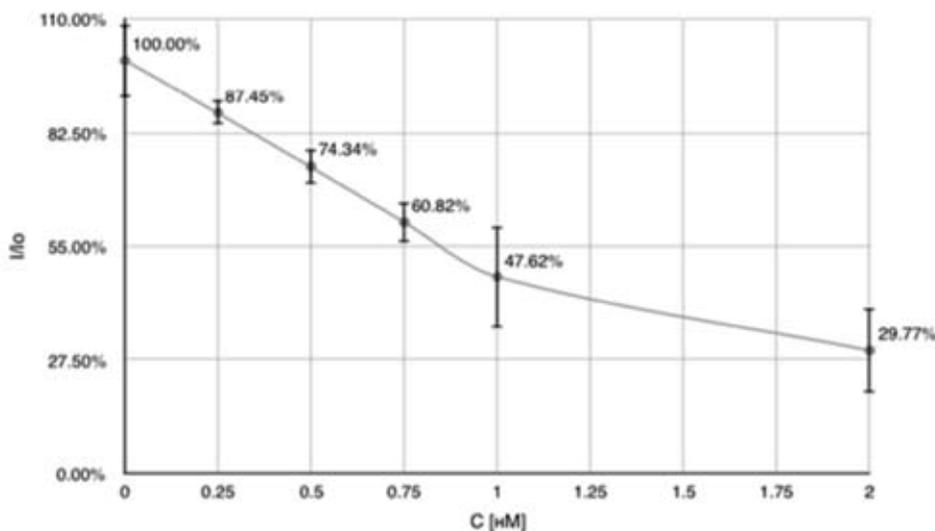
После измерения флуоресценции белка в кювету вносился раствор PPI-CPDG4. Белок титровали в диапазоне 0,25-2,0 мкМ. До измерения белок инкубировали в течении 3-5 минут. Все измерения были сделаны не менее, чем в трёх повторках.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Основными группами в белках, ответственными за их флюоресцентные свойства, являются ароматические остатки триптофана, тирозина, фенилаланина. Триптофан, благодаря наиболее высокому квантовому выходу в белках, часто доминирует в спектрах флуоресценции отдельных белков. В отличие от триптофана, спектры флюоресценции (СФ) тирозина очень мало зависят от условий среды. Значительно более низкая, в сравнении с триптофаном, роль тирозина в анализе флуоресцентных свойств белков, в особенности, содержащих триптофан, обусловлена его меньшей молярной экстинкцией и низким квантовым выходом, который зависит от способности многих акцепторов водородной связи тушить его флуоресценцию, а также от его свойства передавать энергию электронного возбуждения на триптофан.

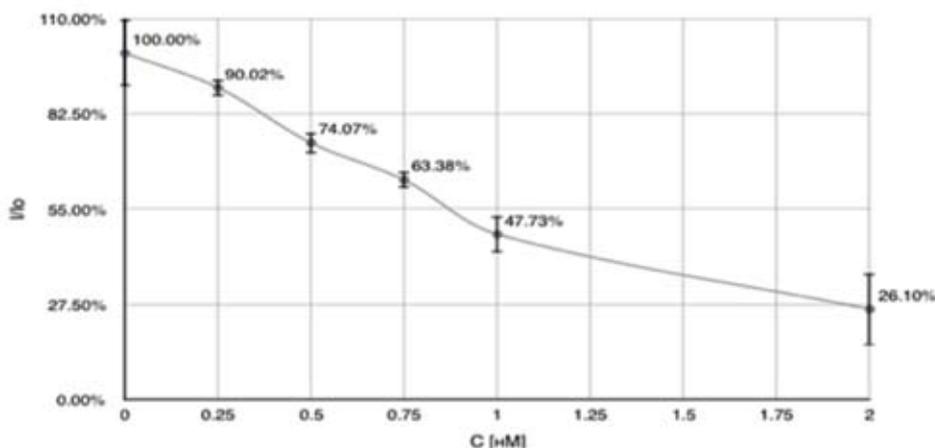
Факторы, действующие на белковые молекулы: низкие температуры, изменение pH, ионной силы растворителя, органические добавки, оказывают влияние прежде всего на четвертичную и третичную структуры белков. Чувствительность основных параметров СФ белков к таким характеристикам как подвижность, полярность и гетерогенность состава ближайшего микроокружения хромофоров позволяет судить о разнообразных изменениях структурного состояния белков: конформационных, предденатурационных и денатурационных, что наблюдается в ходе снижения флюоресценции белка. Задача существенно упрощается, если в состав белковой молекулы входит один триптофановый остаток. И, хотя чаще всего такой остаток располагается внутри белковой глобулы и мало реагирует на внешние воздействия, применяемые к белковой молекуле, тем не менее, в ряде случаев он, являясь фактически природной «флуоресцентной меткой», может предоставлять ценную информацию о конформационных изменениях белка.

Взаимодействие фосфорных дендримеров с липидным бислоем обеспечивается за счет положительного заряда терминальных аминогрупп. Это взаимодействие приводит к образованию пор в липидной мембране клетки. Как и другие катионные полимеры, дендримеры, содержащие терминальные аминогруппы, образуя такие поры, оказывают неспецифическое токсическое воздействие, которое может подразумевать и негативное влияние на белки. Однако поверхность дендримера, использованного в нашей была модифицировать таким образом, что это воздействие снижается.

На рисунках 1-2 представлены графики зависимости относительной интенсивности флуоресценции AST и LDH от концентрации дендримера PDG4 при pH=7,35 соответственно.

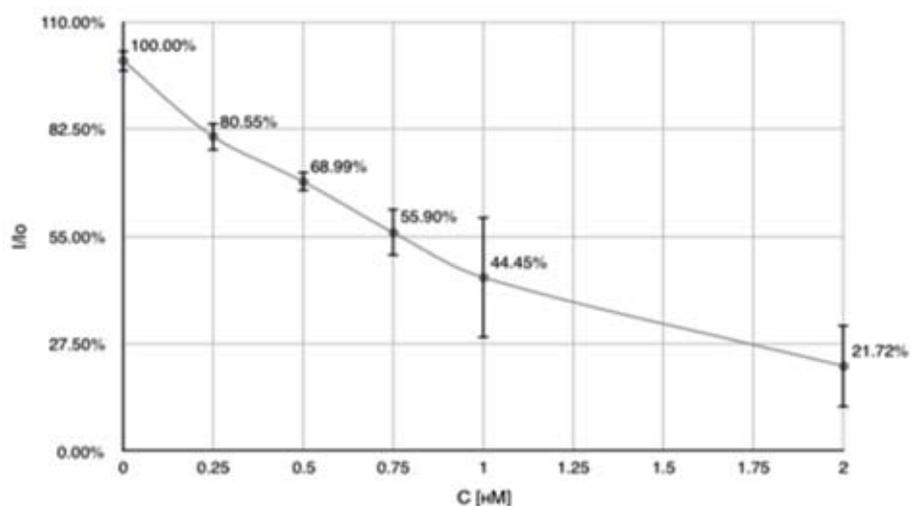


**Рисунок 1 - зависимость относительной интенсивности флуоресценции AST от концентрации CPDG4 [нМ], pH=8,52**

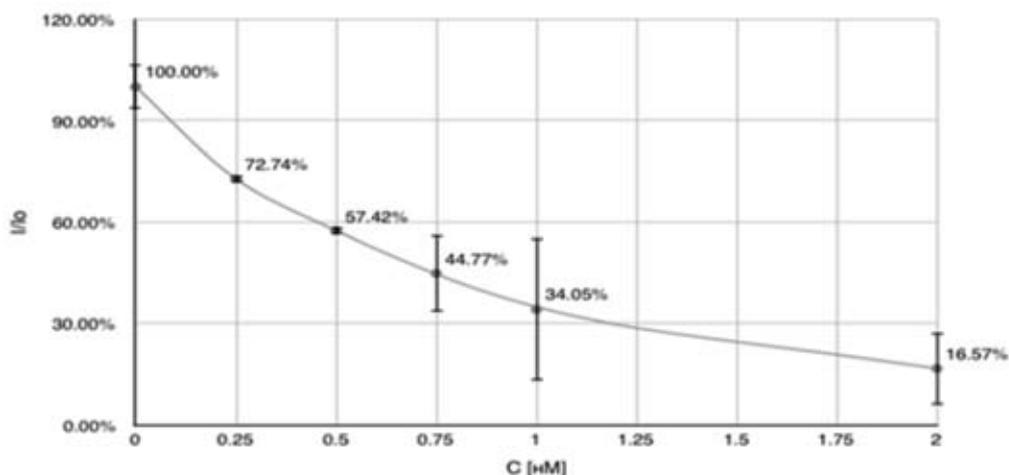


**Рисунок 2 - зависимость относительной интенсивности флуоресценции LDH от концентрации CPDG4 [нМ], pH=8,52**

Из приведенных графиков можно сказать что при pH=8,5 раствора, происходит сильное тушение флуоресценции белков AST и LDH дендримером PPI-CPDG4, результаты находятся в одинаковом диапазоне. Результаты измерений при pH=7,35 представлены на рисунках 3–4.



**Рисунок 3 - зависимость относительной интенсивности флуоресценции AST от концентрации CPDG4 [нМ], pH=8,52**

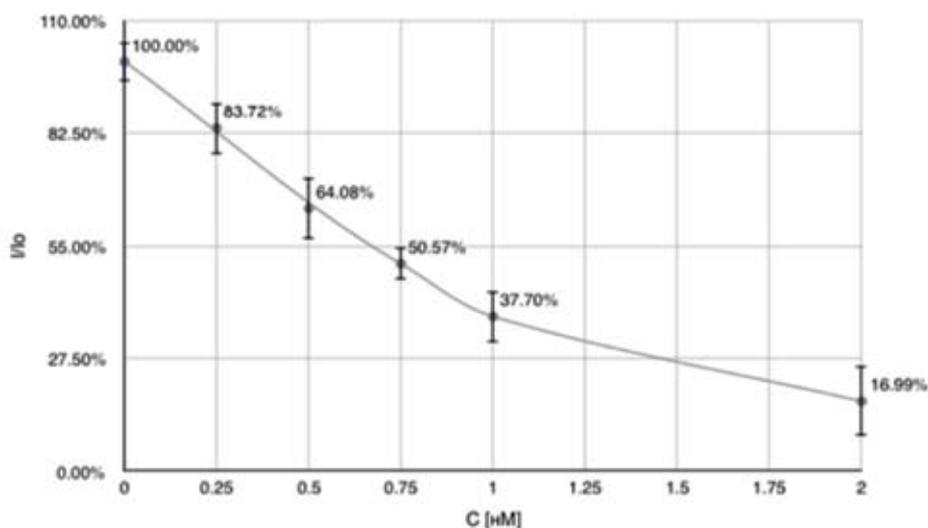


**Рисунок 4 - зависимость относительной интенсивности флуоресценции LDH от концентрации CPDG4 [нМ], pH=8,52**

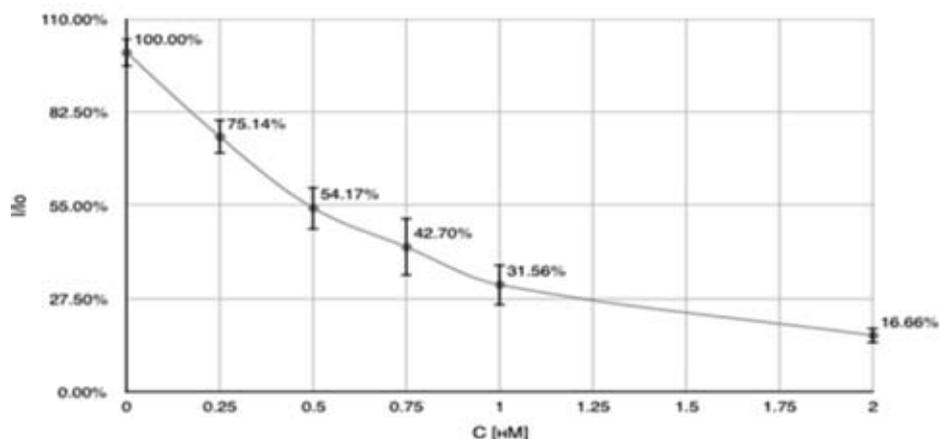
На приведенных графиках можно видеть, что PPI-CPDG4 сильно снижает относительную интенсивность флуоресценции AST и LDH. Однако у AST выше относительная интенсивность флуоресценции (остается в пределах 22%) чем у LDH (опускается ниже 17%). В связи с этим можно сделать вывод, что при pH=7,35 раствора дендример PPI-CPDG4 сильно подавляет интенсивность флуоресценции обоих белков, но у белка AST резистентность к действию дендримера выше чем у LDH. Результаты измерений при pH=7,35 представлены на рисунках 5–6

По приведенным графикам можно вывод, что при pH=5,7 раствора, происходит сильное тушение флуоресценции белков AST и LDH дендримером PPI-CPDG4, результаты находятся в одинаковом диапазоне.

**Заключение.** Тушение флуоресцентного излучение белков AST и LDH дендримером CPDG4 было изучено в различных условиях путем варьирования экспериментальных параметров, таких как значение pH и концентрация. На эффективность тушения повлияло значение pH: чем ниже pH, тем активней шло тушение флуоресценции. В низких и средних pH тушение шло хуже.



**Рисунок 5 - зависимость относительной интенсивности флуоресценции AST от концентрации CPDG4 [нМ], pH=5,7**



**Рисунок 6 - зависимость относительной интенсивности флуоресценции LDH от концентрации CPDG4 [нМ], pH=5,7**

На основании вышеизложенных данных можно предполагать, что свою роль в тушении флуоресценции сыграл также и тирозин, имеющий сам по себе низкий квантовый выход, вызванной способностью многих акцепторов водородной связи тушить его флуоресценцию, а также от его способности передавать энергию электронного возбуждения на триптофан.

При тушении флуоресценции дендримерами наблюдался небольшой сдвиг спектра флуоресценции AST и LDH в коротковолновую область. Это обусловлено остатками триптофана, находящимися в гидрофобном окружении в центре белка, которые дают смещение спектра его флуоресценции в коротковолновую сторону.

Также CPDG4 сильно снижает относительную интенсивность флуоресценции AST и LDH. Однако у AST выше относительная интенсивность флуоресценции (остаётся в пределах 22%) чем у LDH (опускается ниже 17%).

Таким образом, можно сделать вывод, что фосфорный дендример CPDG4 сильно подавляет интенсивность флуоресценции обоих белков, но глобула белка AST более устойчива к действию дендримера чем молекула LDH.

**Благодарности.** Данная работа поддержана Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь (ГКНТ РБ) и Белорусским Республиканским Фондом Фундаментальных Исследований (БРФФИ), гранты Б20СЛКГ-002, Б21ТЮБ-001, Б21КОРГ-001, Б21АРМГ-002, Б21РМ-045, Б21М-001.

### Список литературы

1. Роко, М.К., Уильямс, Р.С., Аливисатос П. Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз, направления развития. — М.: Мир, 2002. — 292 с.
2. Eventoff, W. et al. Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1977. — Т. 74. — №. 7. — С. 2677-2681.
3. Hayashi, H. et al. Recent topics in pyridoxal 5'-phosphate enzyme studies // Annual review of biochemistry. — 1990. — Т. 59. — №. 1. — С. 87-110.
4. Holmes, R. S., Goldberg E. Computational analyses of mammalian lactate dehydrogenases: human, mouse, opossum and platypus LDHs // Computational biology and chemistry. — 2009. — Т. 33. — №. 5. — С. 379-385.
5. Wilks, H. M. et al. A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework // Science. — 1988. — Т. 242. — №. 4885. — С. 1541-1544.

## INVESTIGATION OF THE FLUORESCENCE QUENCHING OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE AND LACTATE DEHYDROGENASE UNDER THE ACTION OF THE CPDG4 PHOSPHORUS DENDRIMER

---

*Zhivitskaya S.S.<sup>1</sup>, Abashkin V.M.<sup>2</sup>, Majoral J.-P.<sup>3</sup>, Shcharbin D.G.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Science of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

*<sup>3</sup>Laboratory of Coordination Chemistry CNRS, Toulouse, Republic of France*

**Summary.** *In this work, we investigated the fluorescence quenching of AST and LDH proteins by the phosphorus dendrimer CPDG4. The pH value influenced the quenching efficiency the more, the lower the pH was. At low and medium pH, quenching was less intense. The effect of CPDG4 led to a slight shift in the fluorescence spectrum of AST and LDH into the shortwave region. CPDG4 strongly reduced the fluorescence intensity of both proteins; however, the AST protein globule exhibited greater stability in the presence of a dendrimer as compared to LDH.*

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ДИАБЕТЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ

*Заводник И.Б.<sup>1, 2</sup>, Чещевик В.Т.<sup>3</sup>, Лапшина А.Е.<sup>1</sup>, Чещевик Н.Г.<sup>3</sup>, Коваленя Т.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Учреждение образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», г. Гродно, Республика Беларусь*

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

<sup>3</sup>*Учреждение образования «Полесский государственный университет», г. Пинск, Республика Беларусь*

**Резюме.** Цель настоящей работы — оценить развитие метаболических нарушений, сопутствующих стрептозотоцин-индуцируемому диабету, во времени и выяснить возможность коррекции нарушений. При экспериментальном диабете I типа у крыс с увеличением длительности диабета (18, 30, 60 дней) мы наблюдали увеличение степени гликозилирования белков, ингибирование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (на 55%) в ткани печени, рост уровня NO в плазме крови и ткани аорты. Введение мелатонина (10 мг/кг) не влияло на уровень глюкозы, нормализовало уровень NO, предотвращало ингибирование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

**Введение.** Сахарный диабет представляет собой сложное полифункциональное заболевание, характеризующееся многообразными метаболическими нарушениями, имеющими значительный неферментативный, химический компонент [2]. Гипергликемия является основной причиной метаболических нарушений и повреждения тканей при сахарном диабете, макро- и микрососудистых осложнений [4]. Повреждения тканей при диабете определяются процессами, происходящими на молекулярном и клеточном уровнях (сахарный диабет I типа и его проявления связан с дисфункцией  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и нарушением секреции инсулина, сахарный диабет II типа обусловлен резистентностью тканей к инсулину).

Гипергликемия стимулирует также ряд стресс-зависимых сигнальных каскадов, участвующих в повреждении клеток и приводящих к развитию отдаленных осложнений при сахарном диабете, в частности, каскад, связанный с фактором транскрипции NF- $\kappa$ B [1].

В литературе представлено значительное количество зачастую противоречивых данных, описывающих метаболические изменения ткани печени при сахарном диабете.

Ранее мы обнаружили выраженные нарушения редокс-баланса клеток печени, активности ферментов системы антиоксидантной защиты, детоксикации ксенобиотиков, пентозо-фосфатного пути, изменения уровня оксида азота при стрептозотоцин-индуцируемом диабете крыс. Нами также показано, что гормон эпифиза мелатонин, вводимый в фармакологических дозах, восстанавливал активность транскетолазы, регулировал уровень оксида азота [6]. Цель настоящей работы — оценить развитие метаболических нарушений, сопутствующих стрептозотоцин-индуцируемому диабету, во времени и выяснить возможность коррекции нарушений мелатонином.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали: N-ацетил-5-метокситриптамин (мелатонин), сахароза, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-HCl), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), 5,5'-дитиобис (2-нитробензойную кислоту) (реактив Элмана), трихлорук-

сусную кислоту (ТХУ), НАДФ<sup>+</sup> и динатриевую соль глюкозо-6-фосфата, стрептозотоцин (STZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США или Steinheim, Германия).

Моделирование сахарного диабета I типа осуществляли, используя крыс-самцов линии Wistar вивария Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. При работе с животными соблюдали правила Европейской конвенции по защите животных, используемых в научных целях и рекомендации Этической комиссии Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. Животным однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотоцин в дозе 45 мг/кг массы тела. Диабетическими считали животных с уровнем глюкозы в крови, превышающим 200 мг/дл (Blood Glucose Sensor Electrodes, MediSense, Abbot Laboratories, Bedford, UK). Животные были разделены на 4 группы: 1) животные, получавшие ежедневно физиологический раствор (в/б), (контроль); 2) диабетические животные, получавшие ежедневно физиологический раствор (в/б) (диабет); 3) диабетические животные, получавшие ежедневно мелатонин (10 мг/кг, в/б) (диабет+мелатонин). Животных декапитировали через 18, 30 и 60 дней после начала введения мелатонина.

Активности маркеров поражения печени АлТ и АсТ в плазме гепаринизированной крови крыс, содержание гликозилированного гемоглобина GHb в эритроцитах, определяли с использованием наборов реагентов (Pliva-Lachema, Чехия). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы регистрировали спектрофотометрически по скорости восстановления НАДФ<sup>+</sup> [5]. Содержание белка оценивали по методу Lowry и др. [7].

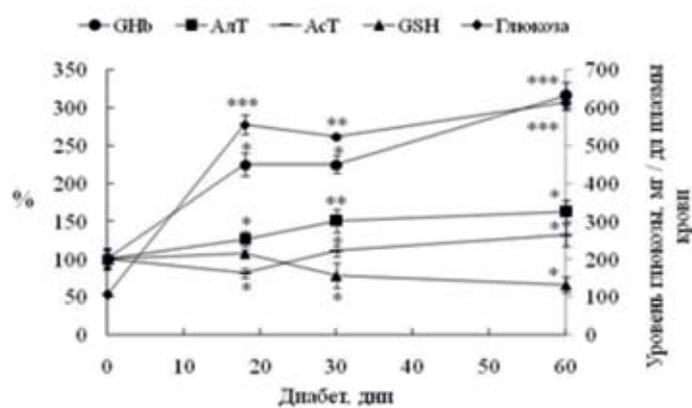
Полученные результаты были проанализированы параметрическим методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента. Анализ результатов проводили с помощью пакета GraphPad (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contMenu/>).

**Результаты исследования и их обсуждение.** В наших экспериментах развитие диабета регистрировали по характерным признакам гипергликемии: возрастанию уровня глюкозы в плазме крови в 6 раз (18, 30 и 60 дней диабета) и гликозилированного гемоглобина (в 2-3 раза) с увеличением длительности диабета. Длительная гипергликемия приводила к росту активности ферментов АлТ и АсТ в плазме крови, что характеризует развитие диабетического поражения ткани печени, и уменьшению уровня GSH в эритроцитах (рисунок 1). Степень повреждения зависит от длительности диабета.

Мы наблюдали достоверное увеличение уровня NO в плазме крови животных (на 50%,  $p < 0,05$ ) при 18-дневном диабете, тогда как через 30 дней развития диабета содержание NO не отличалось от уровня в группе контроля. В ткани аорты уровень NO также возрастал с увеличением длительности диабета, что может быть непосредственно связано с сосудистыми осложнениями, тогда как в ткани печени мы не обнаружили изменения содержания оксида азота. Следует отметить, что содержание NO в ткани аорты значительно выше, чем в печени.

Введение мелатонина в течение 30 дней (10 мг/кг, ежедневно) животным при диабете не оказало влияния на повышенный уровень глюкозы в плазме крови (данные не представлены). Следует отметить, что мелатонин нормализовал повышенный уровень NO в ткани аорты и плазме крови при диабете.

Мы обнаружили значительное (в 2,2 раза) уменьшение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в ткани печени диабетических животных. Введение мелатонина частично предотвращало ингибирование фермента. Возможными причинами нарушений ферментативной активности при диабете могут быть либо изменения экспрессии генов соответствующих ферментов [3], либо пост-трансляционная модификация белков-ферментов (гликозилирование). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы коррелировала с уровнем гликозилирования белков (с уровнем GHb).



- \* - статистически достоверно по отношению к контролю,  $p < 0,05$
- \*\* - статистически достоверно по отношению к контролю,  $p < 0,01$
- \*\*\* - статистически достоверно по отношению к контролю,  $p < 0,001$

**Рисунок 1 — Уровень глюкозы, гликозилированного гемоглобина (GHb) и глутатиона эритроцитов (GSH), активность ферментов АлТ и АсТ в плазме крови крыс при экспериментальном стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете различной продолжительности (18, 30, 60 дней)**

**Заключение.** При экспериментальном диабете I типа на фоне высокого уровня глюкозы в плазме крови с увеличением длительности диабета мы наблюдали увеличение степени гликозилирования белков. Развивающийся окислительный стресс в результате аутоокисления глюкозы и гликозилирования белков приводил к снижению уровня глутатиона в эритроцитах, к повреждению ткани печени, что отражалось в прогрессирующем возрастании активности АлТ и АсТ в плазме крови (маркеров повреждения ткани печени), ингибированию ферментов пентозофосфатного пути (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы). На фоне гипергликемии и развивающегося окислительного стресса на ранних этапах диабета (18 дней) наблюдали рост уровня NO в плазме крови и ткани аорты, который на более поздних этапах диабета (30 дней) отмечали лишь в ткани аорты. Введение мелатонина нормализовало уровень NO в плазме крови и ткани аорты, частично предотвращало ингибирование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ключевого фермента пентозо-фосфатного пути, играющего значительную роль в поддержании редокс-состояния клетки, обеспечивая ее НАДФН и нормальный уровень [GSH]/[GSSG], и препятствовало снижению уровня глутатиона в эритроцитах.

### Список литературы

1. Barnes P.J., Karin M. Nuclear factor kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — V. 336. — I. 15. — P. 1066–1071.
2. Baynes J.W. The clinical chemome: A tool for the diagnosis and management of chronic disease // *Clin. Chem.* — 2004. — V. 50. — I. 7. — P. 1116–1117.
3. Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats/ J. Bojunga [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — V. 316. — I. 3. — P. 771–780.
4. Brownlee M. Banting Lecture 2004. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism // *Diabetes.* — 2005. — V. 54. — I. 6. — P. 1615–1625.
5. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O<sub>2</sub> metabolism. Evidence for cyclic AMP-

dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP<sup>+</sup>-dependent 'malic' enzyme/ L.F. Costa Rosa [et al.] // *Biochem. J.* — 1995. — V. 310. — P. 709–714.

6. Antioxidative enzymes and glutathione S-transferase activities in diabetic rats exposed to long-term ASA treatment/ E.A. Lapshina [et al.] // *Life Sci.* — 2006. — V. 79. — I. 19. — P. 1804–1811.

7. Protein measurement with the Folin phenol reagent/ O.H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193. — P. 265–275.

## METABOLIC DISORDERS DURING DIABETES AND THEIR CORRECTION

---

*Zavodnik I.B.<sup>1,2</sup>, Cheshchevik V.T.<sup>3</sup>, Lapshina E.A.<sup>1</sup>, Cheshchevik N.G.<sup>3</sup>, Kovalenya T.A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Educational institution «Grodno State University named after Yanka Kupala»,  
Grodno, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Republican Scientific Research Unitary Enterprise «Institute of Biochemistry  
of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus»,  
Grodno, Republic of Belarus*

<sup>3</sup>*Polessk State University, Pinsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *The aim of the work is to evaluate the development of metabolic disorders during diabetes and assess the possibility to attenuate the diabetic impairments by melatonin. During streptozotocin-induced type I diabetes we observed enhancement of blood glucose, glycated haemoglobin, decrease in erythrocyte level of glutathione as well as increase in plasma aminotransferase activities and glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition (by 55%) along with diabetes duration (18, 30, 60 days), and an increase NO levels. Treatment by melatonin, a known antioxidant, (10 mg/kg) did not influence the level of hyperglycemia, prevented an increase in nitric oxide levels in blood plasma and aortic tissue, and markedly reversed the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase.*

## НЕЙРОМОРФОЛОГИЯ И НЕЙРОХИМИЯ АЛКОГОЛИЗМА

*Зиматкин С.М.*

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

**Резюме.** В работе представлен обзор собственных исследований автора, проведённых, или начатых в 1980-90-е годы в лаборатории биохимии спиртов и альдегидов и лаборатории морфологии и нейрохимии Института биохимии АН БССР (НАН РБ), совместно с коллегами из Финляндии и США. В них гистохимическими и биохимическими методами изучалось окисление этанола и ацетальдегида в мозге и их роль в механизмах влечения и устойчивости к алкоголю. Эти работы более 1200 раз цитировались в международных изданиях, индекс Хирша по Scopus 18.

Исследования метаболизма этанола в мозге были начаты нами в 1981 г. в лаборатории биохимии спиртов и альдегидов Института биохимии АН БССР с разработки гистохимического метода исследования активности альдегиддегидрогеназы (АльДГ), основного фермента, окисляющего АА в мозге [6]. С помощью этого метода было детально изучено региональное и клеточное распределение АльДГ во всех структурах мозга крысы [4, 18] и человека [10]. Иммуногистохимическое исследование показало аналогичное топографическое распределение в структурах мозга белка высокоаффинной митохондриальной АльДГ. Обнаружена значительная гетерогенность распределения АльДГ и предположено, что, наряду с другими факторами, она определяет неодинаковую устойчивость разных структур мозга к токсическому метаболиту этанола, АА.

В этих гистохимических исследованиях было также установлено существование нескольких метаболических барьеров для альдегидов: между кровью, ликвором и нейронами мозга [2]. Это объясняет низкую проницаемость гемато-энцефалического и гемато-ликворного барьеров для АА [4, 18]. Показано, что характер топографического распределения АльДГ в нейронных и барьерных структурах мозга обеспечивает её участие в механизмах контролирующих поведенческую устойчивость (толерантность) и влечение животных к этанолу. Сравнительный гистохимический анализ продемонстрировал повышенную активность АльДГ в отношении АА в функционально важных структурах мозга беспородных и линейных крыс с повышенной врождённой устойчивостью к наркотическому действию и двигательным нарушениям вызываемым этанолом [12, 13].

**АльДГ в развивающемся мозге.** Гистохимически установлена крайне низкая активность АльДГ в нейронных и барьерных структурах мозга крысы в эмбриональный и ранний постнатальный период развития. Только к 20-40-ому дню после рождения она достигает дефинитивного уровня [3]. Это объясняет повышенную чувствительность развивающегося мозга ко всем воздействиям повышающим образование альдегидов, в том числе к повреждающему действию АА, образуемому из потребляемого матерью этанола. Это является одной из причин развития алкогольного синдрома плода [7]. Интересно, что структуры развивающегося мозга отвечают на хроническую алкоголизацию более значительной адаптационной активацией АльДГ, по сравнению со зрелым мозгом [4]. Это объясняет быстрое развитие алкоголизма при потреблении алкоголя в раннем возрасте [7].

**Морфофункциональные нарушения в нейронах коры мозга у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности.** Хорошо известно, что потребление алкоголя во время беременности вызывает глубокие нарушения функций мозга у их потомства, входящих в алкогольный синдром плода [7]. Представляло интерес выяснить, какие структурные и метаболические изменения нейронов лежат в основе этих функциональных нарушений. Для этого нами проведено сравнительное комплексное гистологическое, электронно-микроскопическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование постнатального развития нейронов коры головного мозга крыс в норме и после антенатального воздействия алкоголя.

Установлено, что потребление алкоголя крысами во время беременности вызывает глубокие гистологические нарушения в цингулятной, фронтальной и париетальной коре головного мозга их потомства. Так, на 2-е и 5-е сутки выявлено увеличение, а затем уменьшение на 10-е и 90-е сутки толщины коры, снижение количества и размеров нейронов, уменьшение числа нормохромных и увеличение числа патологических форм нейронов (гиперхромные, гиперхромные сморщенные, гипохромные, клетки-тени) во все сроки после рождения, по сравнению с контролем, остановка роста и прогрессивное сморщивание нейронов коры мозга с 20-го дня постнатального развития [7].

Антенатальное воздействие алкоголя приводит к значительным нарушениям органеллогенеза в пирамидных нейронах коры мозга крыс. Так, на 20-е, и особенно на 45-е сутки, после рождения происходит снижение относительного числа митохондрий, количества и длины их крист, что свидетельствует о нарушении энергетического обеспечения нейронов. Относительное количество свободных рибосом в цитоплазме нейронов с возрастом не уменьшается, а количество связанных рибосом не нарастает. Это свидетельствует о нарушении возрастной перестройки процесса биосинтеза белка (от такового для собственных нужд тел нейронов к биосинтезу белка на экспорт, в их отростки и терминали). При этом количество и размеры лизосом увеличиваются, что отражает нарастание процессов аутофагии в этих нейронах [7].

Антенатальное воздействие алкоголя вызывает изменения окислительного метаболизма развивающихся нейронов коры мозга. На 20-е и 45-е сутки после рождения в их цитоплазме снижена активность маркерных ферментов митохондрий СДГ и НАДН-дегидрогеназы, что соответствует ультраструктурным нарушениям митохондрий, угнетены Г-6-Ф-дегидрогеназа и НАДФН-дегидрогеназа, что указывает на торможение пентозофосфатного пути и немитохондриальных энергетических процессов, соответственно. Увеличение активности ЛДГ свидетельствует о компенсаторном усилении в нейронах поздних этапов гликолиза. Увеличение активности маркерного фермента лизосом кислой фосфатазы подтверждает ультраструктурные данные о гиперплазии и гипертрофии этих органелл [7].

Замедление развития пирамидных нейронов коры мозга у этих животных проявляется в повышенной экспрессии молекулярного маркера незрелых нейронов даблкортина и отставании нарастания экспрессии маркера зрелых нейронов NeuN. Иммунореактивность синаптофизина в коре мозга антенатально алкоголизированных крыс значительно снижена, что указывает на замедление в ней синаптогенеза [7]. Эти микроскопические изменения нейронов мозга могут лежать в основе известных нарушений функций нервной системы у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности.

**Нейроны центра жажды в условиях алкогольной мотиваций.** При формировании алкогольной мотивации на базе питьевого поведения, в центре жажды латерального гипоталамуса было обнаружено повышение электроимпульсной активности нейронов, что вызывает алкогольную мотивацию, запускает влечение к алкоголю. Морфометрия этих нейронов выявило

увеличение размеров тел, их ядер и особенно ядрышек, что продемонстрировала микроскопические признаки их гиперактивности в условиях алкогольной мотивации [9].

**Недостаточность тиамина в организме, как предрасположенность и последствие повышенного потребления алкоголя.** Это экспериментальное исследование на крысах показало, что крысы с врождённым повышенным влечением к алкоголю имеют дефицит тиамина, особенно в мозге, моделирование гиповитаминоза В1 в организме усиливает влечение крыс к алкоголю, а хроническое потребление алкоголя вызывает недостаточность тиамина в организме животных [11].

**Роль АльДГ в защите мозга от ацетальдегида.** Полученные топографические данные позволяют оценить способность разных микроструктур мозга к окислению АА и, соответственно, их потенциально разную чувствительность к этанолу/АА [4, 18]. Это предположение прямо подтверждено нашими данными о том, что этанол и АА на фоне угнетения АльДГ дисульфирамом и, особенно, цианамидом вызывают более значительное повреждение нейронов мозга. При этом более выраженное потенцирующее действие оказывает цианамид, значительнее угнетающий АльДГ мозга и вызывающий большее накопление АА в нервной ткани. Это свидетельствует о важной роли данного фермента в защите мозга от алкогольных (альдегидных) повреждений [1].

**АльДГ мозга связана с врожденной поведенческой устойчивостью животных к алкоголю.** В исследовании проведённом с доктором Линдросом в лабораториях Финской государственной алкогольной монополии (АЛКО, Хельсинки), у крыс специальных генетических линий, устойчивых к двигательным нарушениям вызываемым алкоголем (АТ), по сравнению с линейными животными с низкой устойчивостью (АНТ), активность АльДГ в отношении АА значительно выше в нейронах наружного зернистого слоя сенсомоторной коры и латерального гипоталамуса, которые тесно связаны с регуляцией двигательных реакций у животных [13].

В исследовании, проведённом с профессором Дитрихом в Центре по исследованию алкоголизма Университета Колорадо (Денвер, США) у линейных крыс LAS и мышей SS с высокой врождённой устойчивостью к наркотическому действию алкоголя, в клетках Пуркинье мозжечка обнаружена повышенная активность АльДГ, по сравнению с соответствующими линейными крысами HAS и мышами LS с низкой устойчивостью к наркотическому действию этанола. Между тем, именно эти нейроны участвуют в координации движений и поддержания равновесия, в частности, рефлекса переворачивания, по продолжительности отсутствия которого судят о длительности алкогольного наркоза [12].

В совокупности вышеизложенные данные указывают на тесную связь АльДГ структур зрелого и развивающегося мозга с устойчивостью к алкоголю. АльДГ, защищая функционально важные структуры мозга от повреждающего действия альдегидов, обеспечивает, наряду с другими факторами, врожденную и приобретенную поведенческую устойчивость (толерантность) животных к алкоголю.

**Связь АльДГ мозга с влечением к алкоголю.** АльДГ может принимать участие и в системе запуска алкогольной мотивации - в функционировании пейсмекерных нейронов латерального гипоталамуса. Нами установлено, что эти нейроны обладают максимальной в переднем мозге активностью АльДГ, особенно высокой у животных с выраженной алкогольной мотивацией [Зиматкин, 2008]. Гистохимически нами обнаружены значительные генетически обусловленные локальные различия в активности АльДГ структур мозга крыс линий АА (с высоким влечением к алкоголю) и АНА (без влечения) [13].

**Активность каталазы в структурах мозга.** Установлено, что каталаза, является основным ферментом, окисляющим этанол в мозге до АА, который опосредует большинство эффектов этанола [8, 16]. Гистохимическое исследование распределения каталазы, проведенные в исследовательской лаборатории фирмы АЛКО (Хельсинки), выявило её максимальную активность в аминергических нейронах ствола мозга, особенно в телах дофаминергических нейронов, обеспечивающих положительное подкрепляющее действие этанола [8, 15].

**Соотношение активностей каталазы/АльдГ в структурах мозга.** Сравнительный гистохимический анализ топографического распределения каталазы, основного фермента окисляющего этанол до АА в мозге, и АльД, окисляющей АА, позволил выявить структуры мозга с потенциально высоким и низким уровнем окисления этанола и накопления АА и предложить механизм действия этанола в мозге и развития алкогольной зависимости [8, 15]. В частности, обнаружена высокая активность каталазы и низкая активность АльДГ в телах аминергических нейронов, что создаёт условия для локального повышенного окисления в них этанола и накопления АА. Это может быть одним из механизмов активации аминергических систем мозга этанолом (через АА) и последующих известных нарушений поведения животных. В настоящее время этот механизм признаётся ключевым в патогенезе алкоголизма.

**Окисление алкоголя в мозге.** Далее, в Институте Биохимии НАН РБ, совместно с профессором Дитрихом из Университета Колорадо, нами подтверждена способность гомогенатов мозга животных окислять этанол с образованием и накоплением АА. При этом удалось зарегистрировать накопление АА при очень низких концентрациях этанола (1 мМ). Этот уровень этанола появляется в мозге уже при минимальном потреблении этанола. Накопление АА в гомогенатах мозга возрастает более чем в 10 раз при увеличении концентрации этанола до 50 мМ (определяется в мозге при внутрибрюшинном введении животным этанола в дозе 3,5 г/кг). Установлена кинетика этих процессов в мозге крысы.

Ингибитор каталазы, аминотриазол (8 мМ, преинкубация гомогената 20 мин) на 27-57% угнетал этот процесс в изученных отделах мозга, при почти полном угнетении в них каталазы [14]. Это свидетельствует о том, что не вся продукция и накопление ацетальдегида является следствием окисления этанола каталазой. По-видимому, и другие ферментные системы могут участвовать в окислении этанола до АА в мозге. Эта возможность подтверждается и присутствием этанолокисляющей способности мозга у мутантных, безкаталазных мышей.

Особый интерес представили наши пионерские исследования, доказавшие возможность прижизненного окисления алкоголя в мозге [17].

**Связь окисления этанола в мозге с толерантностью животных к алкоголю.** Для выяснения роли АА мозга в центральных (поведенческих) эффектах этанола мы использовали беспородных половозрелых белых крыс-самцов. Им вводили этанол (в/б, в дозе 3,5 г/кг) и регистрировали продолжительность этанол-индуцированного сна (длительность потери рефлекса переворачивания). Животных забивали спустя две недели и в гомогенатах мозга измеряли накопление АА после добавления этанола. Таким же образом измеряли продолжительность этанол-индуцированного сна, а спустя 5 дней определяли скорость накопления в гомогенатах их мозга АА из этанола, у генетически гетерогенных (HS) мышей. В обоих экспериментах в гомогенатах мозга долгоспящих животных обнаружена более высокая этанолокисляющая способность мозга и скорость накопления АА, по сравнению с короткоспящими. При этом среднеспящие животные имели промежуточный уровень метаболизма этанола и накопления АА в мозге. Выявлена положительная корреляция между продолжительностью этанол-индуцированного сна и накоплением образовавшегося из этанола АА *in vitro* в мозге этих животных

( $r=0,4-0,8$ ;  $P<0,05$ ). Обнаружено также, что Км процесса накопления АА был значительно ниже у долгоспящих, по сравнению с короткоспящими крысами. При этом корреляция между продолжительностью этанол-индуцированного сна и индивидуальными значениями Км для накопления АА в мозге у этих животных была:  $r=-0,71$ ;  $P<0,001$  [19].

Установлено также, что накопление АА образовавшегося из экзогенного этанола в гомогенатах мозга долгоспящих HAS крыс и LS мышей было значительно выше, чем у короткоспящих LAS крыс и SS мышей. Особенно важным было обнаружение достоверной положительной корреляции между врождённой продолжительностью этанол-индуцированного сна и накоплением АА в мозге у мышей 16 рекомбинантных SS x LS линий [20]. В этих исследованиях впервые показана корреляция между скоростью накопления АА образовавшегося в мозге из этанола и чувствительностью животных к этанолу, что прямо подтверждает важную роль АА мозга в центральных эффектах алкоголя.

**Теория структуроспецифического действия алкоголя в мозге.** Структуроспецифическое действие алкоголя в мозге обусловлено неодинаковой способностью клеток мозга окислять экзогенный этанол и его первый, высокотоксичный метаболит ацетальдегид (АА). При этом, фермент каталаза в клетках мозга обеспечивает локальное образование АА из этанола, а альдегиддегидрогеназа - локальное окисление (элиминацию) АА. Нарушение баланса этих ферментов приводит как к повышенному накоплению АА в одних структурах мозга, нарушению их функции, повреждению и гибели. Данная теория объясняет причины неодинаковой чувствительности разных структур мозга к алкоголю.

**Окислительная теория патогенеза алкоголизма.** Потребляемый этанол биологически инертен и опосредует своё действия через продукты своего окисления в организме: ацетальдегид (АА) и ацетат, а также продукты конденсации АА с биогенными аминами, обладающих морфиноподобным действием [5, 8]. Специфическое (подкрепляющее) действие алкоголя в мозге обусловлено неодинаковой способностью его клеток окислять экзогенный этанол и его первый, высокоактивный метаболит АА. При этом, основной этанолюкисляющий фермент мозга, каталаза, обеспечивает локальное образование АА в аминергических (дофаминергических) нейронах и его накопление в связи с низкой активностью АльДГ в этих нейронах. Это приводит к возбуждению дофаминергических нейронов и запуску каскада реакций, ведущих через возбуждение опиоидной системы мозга, к развитию эйфории и положительного подкрепления повторного потребления алкоголя, индуцирующего каталазу и дальнейшее, патологическое влечение к алкоголю.

Далее, хроническое потребление алкоголя вызывает активацию АльДГ, которая защищает мозг от токсического действия экзогенного АА, но может вызывать дефицит эндогенного АА в мотивационных зонах гипоталамуса, инициирующих влечение к этанолу, как метаболическому предшественнику АА.

В целом, предлагаемая теория объясняет и объединяет многочисленные разрозненные данные о действии алкоголя в мозге, указывает на важные нейрохимические механизмы патогенеза алкоголизма и возможные пути его метаболической коррекции.

### Список литературы

1. 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.
2. Зиматкин, С. М. Активность альдегиддегидрогеназы в барьерных структурах мозга / С. М. Зиматкин, Ю. М. Островский // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 1988. — № 9. — С. 183–184.

3. 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.
4. Зиматкин, С. М. Альдегиддегидрогеназы мозга и их роль в патогенезе алкоголизма: монография / С. М. Зиматкин. — Гродно: ГрГМУ, 2008. — 308 с.
5. Зиматкин, С. М. Ацетатзависимые механизмы толерантности к этанолу / С. М. Зиматкин, Н. А. Оганесян, Ю. В. Киселевский. — Гродно: ГрГМУ, 2010. — 252 с.
6. Зиматкин, С. М. Гистохимический метод определения активности альдегиддегидрогеназы в центральной нервной системе / С. М. Зиматкин, Ю. М. Островский, М. Н. Садовник // *Доклады АН БССР.* — 1985. — № 5. — С. 466–469.
7. Зиматкин, С. М. Нарушения в мозге после антенатальной алкоголизации: монография / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. — Гродно: ГрГМУ, 2017. — 192 с.
8. Зиматкин, С. М. Окисление алкоголя в мозге: монография / С. М. Зиматкин. — Гродно: ГрГМУ, 2006. — 200 с.
9. Зиматкин, С. М. Результаты морфометрии нейроцитов гипоталамуса у крыс с искусственной алкогольной мотивацией / С. М. Зиматкин, Ю. М. Островский, М. Н. Садовник // *Доклады АН БССР.* — 1984. — № 4. — С. 364–368.
10. Мотавкин, П. А. Локализация алкоголь- и альдегиддегидрогеназы в спинном и головном мозге человека / П. А. Мотавкин, В. Е. Охотин, С. М. Зиматкин // *Арх. анат., гистол. и эмбриол.* — 1988. — Т. 4. — С. 32–38.
11. Zimatkin, S. M. Thiamine deficiency as predisposition to and consequence of increased alcohol consumption / S. M. Zimatkin, T. I. Zimatkina // *Alcohol and Alcoholism.* — 1996. — Vol. 31, № 4. — P. 421–427.
12. 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 // *Alcoholism: Clinical and experimental research*, Oct. — 1995. — Vol. 19. — № 5. — P. 1300–1306
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. Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain / S. M. Zimatkin, A. V. Liopo, R. A. Deitrich // *Alcohol Clin and Exp Res.* — 1998. — Vol. 22. — P. 1623–1627.
15. Zimatkin, S. M. Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects / S. M. Zimatkin, K. O. Lindros // *Alcohol & Alcoholism.* — 1996. — Vol. 31. — P. 167–174.
16. Zimatkin, S. M. Ethanol metabolism in brain / S. M. Zimatkin, R. A. Deitrich // *Addiction Biology.* — 1997. — Vol. 2. — P. 387–399.
17. Zimatkin, S. M. Ethanol oxidation in the living brain / S. M. Zimatkin, A. L. Buben // *Alcohol and Alcoholism.* — 2007. — Vol. 42, № 6. — P. 529–532.
18. Zimatkin, S. M. Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in rat CNS / S. M. Zimatkin // *J. Neurochem.* — 1991. — Vol. 56. — P. 1–11.
19. Zimatkin, S. M. Relationship of brain ethanol metabolism to the hypnotic effect of ethanol I: studies in outbred animals / S. M. Zimatkin, A. V. Liopo, R. A. Deitrich // *Alcohol Clin and Exp Res*, 2001. — Vol. 25. — P. 976–981.
20. Zimatkin, S. M. Relationship of brain ethanol metabolism to the hypnotic effect of ethanol II: studies in selectively bred rats and mice / S. M. Zimatkin, A. V. Liopo, R. A. Deitrich // *Alcohol. Clin. Exp Res.* — 2001. — Vol. 25. — P. 982–988.

# NEUROMORPHOLOGY AND NEUROCHEMISTRY OF ALCOHOLISM

---

*Zimatkin S.M.*

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

***Summary.*** *The paper presents an overview of the author's own research conducted or started in the 1980s and 90s in the laboratory of biochemistry of alcohols and aldehydes and the Laboratory of Morphology and Neurochemistry of the Institute of Biochemistry of the Academy of Sciences of BSSR (NAS of Belarus), together with colleagues from Finland and the USA. In them, the oxidation of ethanol and acetaldehyde in the brain and their role in the mechanisms of craving and tolerance to alcohol were studied by histochemical and biochemical methods. These papers have been cited more than 1200 times in international editions, the Hirsch index according to Scopus 18.*

## ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАМИНА КАК РЕГУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ТИАМИНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

*Зиматкина Т.И.*

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

**Резюме.** В результате проведенного нами комплекса исследований найдены среди неизвестных ранее синтетических производных тиамин эффективные регуляторы активности основных тиаминзависимых ферментов в органах и тканях экспериментальных животных. Применение данных соединений открывает перспективный путь целенаправленного воздействия на обменные процессы в организме.

**Введение.** Важной задачей современной биологии и медицины является поиск среди производных витаминов новых высокоэффективных регуляторов активности основных тиаминзависимых ферментов в органах и тканях. Применение данных веществ расширяет арсенал средств направленного воздействия человека на живые организмы и окружающую среду, открывает перспективные пути эффективной регуляции обменных процессов в организме в норме и при различных заболеваниях, а также при действии разнообразных, в том числе неблагоприятных для здоровья, экологических факторов. Особую актуальность исследования такого плана приобрели в связи с осложнением современной экологической обстановки как у нас в стране, так и за рубежом. Как правило, вредные для здоровья факторы окружающей среды действуют на человека в сочетаниях и комбинациях с негативными факторами внутренней среды организма [15,22]. К последним можно отнести широко распространенную среди детского и взрослого населения витаминную недостаточность, которая является постоянно действующим во все сезоны года фактором, носит характер полигиповитаминозов и нередко служит причиной развития тяжелых нарушений обменных процессов в организме и роста предпатологических и патологических состояний, а также снижает неспецифическую резистентность, способствует нарушению адаптивного иммунного и гормонального статуса, сужает диапазон адаптационных возможностей организма и отрицательно сказывается на здоровье людей, особенно детей, беременных женщин и пожилых людей.

Известно, что витамины и их производные являются активными регуляторами метаболических процессов в организме и широко используются для направленной регуляции отдельных звеньев обмена веществ в экспериментальной практике, а также при лечении целого ряда заболеваний у человека и животных [15,20, 22,23].

Витамин В<sub>1</sub> (тиамин) играет ключевую роль в организме в метаболизме глюкозы и энергетическом обмене, биосинтезе рибозо-5-фосфата (структурном компоненте нуклеиновых кислот) и занимает центральное место в системе современного питания и альтернативной медицине [20,23]. Учитывая важную метаболическую роль тиамин, тиаминтрифосфата и особенно его физиологически активной формы - тиаминдифосфата (ТДФ), а также ключевые позиции в обмене веществ ТДФ-зависимых ферментов, перспективным является поиск новых соединений с высокой биологической активностью среди различных новых синтетических аналогов тиамин, отражающих неизученные ранее типы модификации его молекулы.

На основании критического анализа известных литературных данных и результатов проведенных нами ранее экспериментальных исследований была высказана гипотеза и сформулирована концепция целенаправленного поиска новых биологически активных производных тиаминна с заданными свойствами [4]. При этом особый акцент был сделан на достижение повышенной избирательности их ингибирующего воздействия на ТДФ-зависимые ферменты и изучение механизмов действия. В период с 80-х годов и по настоящее время был проведен комплекс исследований по изучению влияния разных типов химической модификации молекулы витамина В<sub>1</sub> на различные биологические эффекты его производных и выяснение механизмов реализации их биологической активности в организме.

Знание основных атомов и группировок в молекуле витамина В<sub>1</sub>, ответственных за процесс его фосфорилирования в организме (образование коферментной формы), а также важных для самого акта тиаминного катализа или взаимодействия с апоферментными белками основных ТДФ-зависимых ферментов дало нам возможность провести отбор перспективных производных тиаминна с потенциальными биологическими свойствами среди различных новых синтезированных в Институте биохимии НАН Беларуси и НИИ физико-химических проблем БГУ под руководством академика, д.м.н., профессора Ю.М. Островского, академика, д.х.н., профессора Ф.Н. Капуцкого и д.х.н. Д.А. Опарина, а также высказать предположение о молекулярных механизмах их действия.

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 В<sub>1</sub> 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 самого углеродного скелета его молекулы (трициклические аналоги витамина В<sub>1</sub> - фосфорнокислые и сложные эфиры тиохрома, оксидгидроптиохром и его фосфорнокислые эфиры, оксотиохром);

*4-я группа* - химические аналоги витамина В<sub>1</sub> с необратимой глубокой модификацией самого углеродного скелета его молекулы (замена тиазолового цикла на тиадиазиновый, сложные эфиры тиадиазинового производного тиаминна).

Предполагалось, что для различных латентных форм гидроксильированного по пиримидину аналога витамина В<sub>1</sub>, окситиаминна (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 могут сохранять тот же характер взаимосвязи с ферментными белками, что и исходные соединения. При этом в качестве «ложного» реагента везде будет выступать тиохромдифосфат или окситиаминдифосфат, образующийся при диссоциации солей, гидролизе сложных эфиров, расщеплении дисульфидов с последующей тиолизацией. Различия в антивитаминных свойствах данных соединений будут в основном обусловлены изменением их физико-химических свойств, что скажется на всасы-

ваемости, проницаемости через клеточные мембраны, распределении и депонировании в организме, а также на скорости ретрансформации этих модифицированных производных в свободный окситиамин или тиохромдифосфат. Из-за более сильного сродства окситиаминдифосфата к транскетолазе (ТК), по сравнению с истинным коферментом, соединения 1-й группы могут проявлять повышенную избирательность антивитаминного действия в отношении данного фермента, а тиохромтрифосфат (3-я группа) — пируватдегидрогеназе (ПДГ) в связи с наличием выраженных антикоферментных свойств в опытах *in vitro* в отношении этого ТДФ-зависимого фермента у тиохромдифосфата.

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

Трициклические аналоги витамина В<sub>1</sub>, являющиеся продуктами окисления тиохрома (группа 3), могут значительно угнетать в опытах *in vivo* активность различных тиаминовых ферментов и проявлять смешанный, по отношению к ТДФ, тип ингибирования ферментативных реакций в связи с возможностью 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 - окситиамин и его фосфаты, которые, вероятно, могут выступать в качестве специфических ингибиторов по схеме, аналогичной для традиционных антиметаболитов тиамин.

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

В экспериментах, проведенных на базе Института биохимии НАН Беларуси и Гродненского государственного медицинского университета, использовали самцов беспородных белых мышей массой 20-22г и крыс массой 200-220г, которых содержали на стандартном рационе питания вивария и подкожно вводили водные растворы или суспензию в персиковом масле исследуемых соединений. Контрольные животные получали в равном объеме 0,85%-ый раствор NaCl или персиковое масло. Все исследования были проведены с учетом принципов биоэтики. В органах и тканях контрольных и опытных животных исследовали активность основных ТДФ-зависимых ферментов (ТК, ПДГ и 2-оксоглутаратдегидрогеназы –2-ОГДГ-), определение которых проводили по известным методикам [5,23]. Для расшифровки механизма действия производных витамина В<sub>1</sub> в опытах на очищенных тиаминовых ферментах исследовали характер ингибирования ими ферментативных реакций [5,11,18,23]. Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически [14]. Статистическую достоверность различий оценивали при уровне значимости  $P < 0,05$ .

Установлено, что соединения 1-й группы проявляют повышенную избирательность действия в отношении ТК и угнетают её активность по конкурентному, в отношении ТДФ, типу. Сильные ингибиторы данного фермента с пролонгированными свойствами найдены среди асимметричных дисульфидов окситиамина с нормальными и разветвленными углеводородными радикалами, симметричных О-ацилдисульфидов, полных эфиров с некоторыми дикарбоно-

выми кислотами [1,5-9,11,13,17,19,21]. Эти производные имеют значительные преимущества по сравнению с исходным соединением при транспорте и депонировании в организме. Наилучшие результаты получены в случае использования солевых форм окситиамина - различных полиангидроглюкуронатов, применение которых позволяет увеличить срок ингибирования ТК в органах и тканях экспериментальных животных на 60% по сравнению с исходным соединением [2,5,11]. Тиохромтрифосфат проявляет выраженное избирательное действие в отношении ПДГ [3,5,11,12]. Молекулярный механизм действия этого производного аналогичен другим соединениям 1-й группы.

Эффективные антагонисты витамина В<sub>1</sub> нейротропного действия обнаружены среди сложных эфиров окситиамина с замещенными индолил-, фталил-, дигидрофурилуксусной, аминопропионовой, аминифенилмасляной и никотиновой кислотами [5,11,16,17]. 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-ОГДГ [3,5,11,18]. Антивитаминный 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 В<sub>1</sub>, представляющая значительный интерес в теоретическом и практическом плане для экспериментальных исследований в области биохимии витаминов.

Производные тиамин с глубокой модификацией углеродного скелета молекулы (группы 2 и 4) в меньшей степени угнетают активность тиаминных ферментов в органах и тканях животных [5,10,11] и проявляют некоферментный механизм действия.

Закключение. В результате проведенного нами комплекса исследований найдены среди различных новых синтетических производных тиамин, отражающих неизученные ранее типы модификации его молекулы, эффективные регуляторы активности основных тиаминзависимых ферментов в органах и тканях экспериментальных животных.

Практическая значимость полученных результатов заключается в обретении новых тонких инструментов для направленной регуляции обменных процессов в различных органах и тканях и возможности успешного их применения как в экспериментальной витаминологической практике, так и для выработки научно-обоснованных путей и способов коррекции нарушений обеспеченности организма витамином В<sub>1</sub> при некоторых патологических состояниях, а также в условиях воздействия различных вредных для здоровья экологических и других факторов.

### Список литературы

1. Антивитаминная активность о-фталимидаоцетил и офталимидобутирил окситиаминов / Т. И. Зиматкина [и др.] // Весці АН БССР, сер. біял. навук. — 1981. — №4. — С. 70–73.
2. Антивитаминная активность препаратов иммобилизованного окситиамина / Т. И. Зиматкина [и др.] // Доклады АН БССР. — 1991. — Т. 35, №2. — С. 179–181.
3. Биологическая активность производных тиохрома / Островский Ю. М. [и др.] // Докл. АН БССР. — 1984. — Т. 28, №12. — С. 1127–1129.

4. Зиматкина, Т. И. Гипотеза биологических эффектов и механизмов действия некоторых новых производных тиаминина, взаимосвязь с модификациями химической структуры / Т. И. Зиматкина // Гродно: ГрГМУ, 2003. — С. 29–33.
5. Зиматкина, Т. И. Биологическая активность новых производных тиаминина / Т. И. Зиматкина, С. М. Зиматкин. — Гродно : ГрГМУ, 2008. — 200 с.
6. Зиматкина, Т. И. Ингибиторы транскетолазы пролонгированного действия среди полных эфиров дикарбоновых кислот с окситиаминном / Т. И. Зиматкина, Д. А. Опарин, Ю. М. Островский // Весці АН БССР, сер. біял. навук. — 1986. — №3. — С. 58–60.
7. Зиматкина, Т. И. Изучение антивитаминой активности О-ацил окситиаминдисульфидов / Т. И. Зиматкина, Д. А. Опарин, Ю. М. Островский // Укр. биохим. журн. — 1988. — Т. 60, №6. — С. 43–48.
8. Зиматкина, Т. И. Оптимизация режима использования окситиаминина в витаминологических исследованиях // Т. И. Зиматкина, Д. А. Опарин, Ю. М. Островский // Укр. биохим. журн. — 1989. — Т. 61, №6. — С. 105–108.
9. Зиматкина, Т. И. Сравнительная антивитаминая активность окситиаминдисульфида и его моносульфида / Т. И. Зиматкина, Д. А. Опарин // Укр. биохим. журн. — 1990. — Т. 62, №3. — С. 77–80.
10. Зиматкина, Т. И. Антивитаминая активность пиримидинил-1, 2, 4-тиадиазиннов / Т. И. Зиматкина, Д. А. Опарин // Весці АН Беларусі, сер. біял. навук. — 1990. — №5. — С. 92–94.
11. Зиматкина, Т. И. Биологическая активность синтетических производных антагониста витамина В<sub>1</sub> окситиаминина (обзор) / Т. И. Зиматкина, Д. А. Опарин, С. В. Забродская // Хим.-фарм. журнал. — 2000. — Т. 34. №6. — С. 5–19.
12. Избирательное ингибирование пируватдегидрогеназы печени и сердца мышей трифосфорными эфирами тиохрома и тетрагидротиаминина / Островский Ю. М. [и др.] // Биохимия. — 1983. — Т. 48, вып. 6. — С. 928–931.
13. Изучение биологической активности эфиров окситиаминина с дикарбоновыми кислотами / Т. И. Зиматкина [и др.] // Весці АН БССР, сер. біял. навук. — 1983. — №5. — С. 45–47.
14. Лаптенюк, С. А. Статистические методы в биологии и медицине: курс лекций / С. А. Лаптенюк, И. В. Лазар. — Мн.: МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2007. — 270 с.
15. Медицинская экология: учеб. пособие / А. Н. Стожаров [и др.]. — Мн.: Выш. шк., 2007. — 368 с.
16. Новые антагонисты нейротропного действия / Ю. М. Островский [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1982. — Т. 93, вып. 1. — С. 28–29.
17. Новые антиметаболиты тиаминина / Островский Ю. М. [и др.] // Весці АН БССР, сер. біял. навук. — 1982. — №6. — С. 102–108.
18. Особенности ингибирования тиаминдифосфатзависимых ферментов оксидигидротиохромом и его фосфорилированными производными / Т. И. Зиматкина [и др.] // Укр. биохим. журн. — 1991а. — Т. 63, №2. — С. 59–65.
19. Островский, Ю. М. Ингибиторы транскетолазы на основе дисульфидных производных окситиаминина с разветвленными цепями / Ю. М. Островский, Т. И. Зиматкина // Укр. биохим. журн. — 1984. — Т. 56, №6. — С. 666–668.
20. Островский, Ю. М. Антивитамины в экспериментальной и лечебной практике / Ю. М. Островский. — Минск: Беларусь, 1973. — 174 с.
21. Синтез и изучение некоторых новых дисульфидных производных окситиаминина / Т. И. Зиматкина [и др.] // Хим.-фарм. журнал. — 1982. — Т. 16, №11. — С. 73–76.

22. Экологическая медицина: учеб пособие / В. Н. Бортновский [и др.]. — Мн.: Новое знание; М.: ИНФРА-М, 2014. — 184 с.
23. Экспериментальная витаминология. Тиамин / Ю. М. Островский [и др.] Мн.: Наука и техника, 1979. — С. 176-223.

## **THIAMINE DERIVATIVES AS REGULATORS OF THIAMINE-DEPENDENT ENZYMES ACTIVITY**

---

***Zimatkina T.I.***

*Educational institution «Grodno State Medical University»,  
Grodno, Republic of Belarus*

*Summary. As a result of our complex studies, the effective regulators of the activity of the main thiamine-dependent enzymes in the organs and tissues of experimental animals were found among previously unknown synthetic thiamine derivatives. The use of these compounds opens up a promising way of purposeful influence on metabolic processes in the body.*

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ РЯДА ПРОИЗВОДНЫХ ТИАМИНА

*Зиматкина Т.И.*

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

**Резюме.** Установлено, что некоторые из аналогов гидроксильированного производного витамина В<sub>1</sub> окситиамина (соли с ферроценовым фрагментом, полиангидрогликоуроновой кислотой, дисульфиды с нормальными углеводородными радикалами, полные сложные эфиры с дикарбоновыми кислотами) оказывают сильное противоопухолевое действие в опытах *in vivo* и значительно увеличивают сроки жизни пролеченных животных. Под влиянием данных веществ в большей степени угнетается активность транскетолазы и снижается количество тиаминдифосфата в опухолевой, чем в других тканях организма опухоленосителей. Показана возможность усиления окситиамином и некоторыми его аналогами противоопухолевых свойств метотрексата.

**Введение.** Научно обоснованный поиск и целенаправленная разработка новых эффективных противоопухолевых средств является одной из важных задач современной биологии и медицины. Огромная значимость таких исследований обусловлена неуклонным ростом во всем мире онкологических заболеваний, служащих причиной высокой смертности и инвалидизации населения. Эколого-дестабилизированная обстановка, несоответствие её потребностям организма человека в различные периоды его жизни и широкая распространенность в воздухе, воде, почве и продуктах питания канцерогенов физической, химической и биологической природы способствуют усилению агрессивности окружающей среды и ослаблению защитных сил организма. Это в совокупности с увеличением продолжительности жизни и количества пожилых людей способствует канцерогенезу, в результате чего XXI век может стать веком рака [20].

Среди потенциальных противоопухолевых средств особого внимания заслуживают производные витамина В<sub>1</sub> или тиамин. Общеизвестным является факт наличия в организме экспериментальных животных и человека при злокачественном росте В<sub>1</sub>-недостаточности, усугубляемой по мере развития неоплазмы и свидетельствующей о повышенной потребности опухолей в данном витамине. Доказано наличие тесной взаимосвязи между обеспеченностью организма тиаминном и ростом злокачественных новообразований, а также способности последних накапливать значительные количества витамина В<sub>1</sub> в ущерб другим органам и тканям [10, 3, 18].

Известно, что недостаток витамина В<sub>1</sub> в пище подавляет прививаемость и тормозит рост злокачественных новообразований [3, 18]. Аналогичные с действием пищевого В<sub>1</sub>-гиповитаминоза результаты по торможению злокачественного роста были получены затем многими исследователями, в том числе и нами, при введении животным с перевиваемыми опухолями окситиамина (ОТ) - гидроксильированного по пиримидину производного тиамин с антивитаминами свойствами [3, 18, 12, 4, 5, 6, 8].

Роль витамина В<sub>1</sub> при злокачественном росте прежде всего определяется его тесной взаимосвязью с синтезом нуклеиновых кислот и белков, а именно - с функционированием пентозофосфатного цикла (ПФЦ), являющегося в клетках основным источником образования рибо-

зо-5-фосфата и восстановленных эквивалентов в форме НАДФ для активированных в опухолях биосинтетических процессов [10,3,18,23,24]. Ключевым ферментом ПФЦ служит тиаминзависимая транскетолаза (ТК), лимитирующая деятельность не только неокислительной ветви, но и всего цикла в целом [2,20].

Установлено, что характерной особенностью опухолевых клеток на всех стадиях развития неоплазмы является почти неизменный уровень в них коферментной формы витамина В<sub>1</sub> — тиаминдифосфата (ТДФ), высокая, т.е. сопоставимая с таковой в крови, печени, других органах и тканях, активность ТК и значительный ТДФ-эффект [10,3,5,18,23,24], свидетельствующий о наличии свободной, ненасыщенной витамином формы этого фермента. Так, по данным зарубежных ученых, которые полностью согласуются с нашими результатами [5,6,12], у экспериментальных животных с асцитным раком Эрлиха (АРЭ) в интенсивную фазу роста опухоли величина ТДФ-эффекта и содержание апо-ТК в онкоцитах составили, соответственно, 75 и 42% [24,25], что свидетельствует о высокой потребности опухолей в тиамине.

При введении животным-опухоленосителям тиамин наблюдала стимуляцию роста неоплазмы, увеличение в органах и тканях, особенно в опухолевых клетках, содержания витамина В<sub>1</sub>, его коферментной формы, активацию ТК и снижение ТДФ-эффекта, [3,18,23,24,25].

Показано, что антагонист витамина В<sub>1</sub> окситиамин вызывает преимущественное, по сравнению с другими тканями, ингибирование ТК, снижение уровня ТДФ и величины ТДФ-эффекта в опухолях, а также значительное торможение (от 30 до 80% по отношению к контролю) роста многих злокачественных новообразований. Поэтому нами, как и рядом других исследователей [5,6,8,12,23,24,25,26,27,28], предлагается в качестве перспективного направления в терапии опухолей угнетение в них транскетолазной реакции и активности ПФЦ с помощью различных производных тиамин. Именно ПФЦ и ТК рассматриваются в качестве основных мишеней при разработке нового метода лечения рака, основанного на угнетении утилизации в онкоцитах глюкозы и избирательного торможения биосинтеза рибозного компонента нуклеиновых кислот [5,6,24,26, 27, 28].

Правильность указанного предположения убедительно подтверждена результатами, полученными с использованием самых современных методов исследования, согласно которым в опухолях, в том числе человека, в отличие от других тканей, биосинтез рибозного компонента нуклеиновых кислот преимущественно (>70%) осуществляется через неокислительную ветвь ПФЦ с помощью транскетолазной реакции [23,24]. Определен высокий (0,9) коэффициент корреляции между скоростью пролиферации опухолевых клеток и активностью в них ТК, а также значительное угнетение данного фермента в онкоцитах (на 93%) и роста опухоли (на 82%) под действием ОТ [23,24,25].

На основании анализа имеющихся в литературе и полученных нами экспериментальных данных по изучению в качестве ингибиторов ТК химических аналогов тиамин с различными модификациями в тиазоловом, пиримидиновом циклах или 5-оксиэтильном радикале предпочтение в качестве базовой структуры для последующих синтезов и исследований отдано нами ОТ.

Данный аналог витамина В<sub>1</sub> является эффективным конкурентным ингибитором ТК и широко используется как регулятор её активности в экспериментальной практике [1,2,18,21]. При введении в организм ОТ подвергается фосфорилированию с образованием ложного кофермента — окситиаминдифосфата (ОТДФ), который затем взаимодействует со своими мишенями — ТДФ-зависимыми ферментами. На уровне тиаминпирофосфокиназы ОТ значительно уступает тиамину и этим обуславливает необходимость применения больших доз авитаминов [1,2,20]. Однако в условиях опустошения в организме тканевого депо тиамин, т.е. при В<sub>1</sub>-

гипо- и авитаминозах, что как раз и имеет место при опухолевой патологии, «тиамин-пирофосфокиназный фильтр» становится проницаемым уже для средних и даже малых доз данного соединения [1,18].

Специфическое антикоферментное действие ОТДФ в значительной степени определяется сродством его к апоформам ТДФ-зависимых ферментов. Установлено, что ложный кофермент имеет значительно более высокое, чем истинный, сродство к ТК [2,20]. Так, для фермента из печени крысы значения констант Михаэлиса для ТДФ и констант ингибирования для ОТДФ разнятся на четыре порядка в пользу антивитамина [2,20], что характеризует потенциальную возможность значительного угнетения ТК *in vivo*. Показано также, что высокоспецифическое действие ОТДФ как ингибитора ТК печени происходит только при синтезе *de novo* данного ферментного белка [2,20]. В отличие от печени и других органов это имеет принципиальное значение для быстропролиферирующих злокачественных клеток [18].

Показано, что ОТ, угнетая ТК в ПФЦ, вызывает апоптоз культивируемых опухолевых клеток [23]. Достоинствами его как канцеростатического средства являются широкий спектр противоопухолевого действия, гораздо меньшая, по сравнению с другими цитостатиками, токсичность, неспособность проникать в мозг [5,18,20]. К недостаткам ОТ следует отнести быстрое выведение его из организма и связанную с этим необходимость многократных введений, создающих неудобства при работе с данным соединением и являющихся причиной нежелательных перепадов уровня антивитамина в органах и тканях. Поэтому считаем перспективным и оправданным поиск новых противоопухолевых препаратов среди различных производных ОТ - ингибиторов ТК пролонгированного типа, а также комбинаций их с другими канцеростатиками. Наилучшие результаты, на наш взгляд [5,6], могут быть достигнуты при изучении таких типов химической модификации молекулы ОТ как этерификация оксиэтильного радикала циклической формы антивитамина (сложные эфиры с одноосновными amino-, гетерилкарбоновыми и двухосновными органическими кислотами), а также открытой формы (симметричные О-ацилоситиаминдисульфиды), неполное окисление дисульфидной связи (моносульфоксид ОТ-дисульфида), алкилирование тиольной формы (несимметричные ОТ-алкилдисульфиды), иммобилизация на полимерных носителях с образованием солей циклической формы ОТ.

В связи с вышесказанным, значительный интерес представлял анализ результатов изучения противоопухолевых свойств ряда соединений, являющихся, по нашим данным, более эффективными, чем ОТ, ингибиторами ТК, усиление их антибластомных свойств с помощью комбинаций с другими известными химиопрепаратами. Объектом исследования были различные формы и структурные аналоги ОТ, оригинальный синтез которых был осуществлен в НИИ физико-химических проблем БГУ и Институте биохимии НАН Беларуси.

Определение цитотоксического эффекта соединений осуществляли контактными методом [19] на клетках различных опухолей. Дальнейшие исследования противоопухолевых свойств наиболее активных аналогов ОТ проводили на беспородных белых мышах массой 19 - 23 г или крыс массой 140–160 г, содержащихся на полноценном рационе питания вивария, которым от животных-доноров перевивали по общепринятым методикам АРЭ, саркому-180 (С-180) или карциносаркому Уокер-256 (КСУ). Через сутки после перевивки опухолей контрольным животным вводили подкожно однократно или многократно физиологический раствор или персиковое масло, а животным опытных групп инъецировали со 2-х по 7-е сутки — водные или масляные растворы (суспензии) ОТ или его аналогов. Все исследования были проведены с учетом принципов биоэтики. В органах и тканях контрольных и опытных животных в начальный, интенсивный и терминальный период роста неоплазмы исследовали активность ТК и определяли

содержание ТДФ по известным методикам [5,20]. У животных с АРЭ асцитную жидкость собирали в пробирки с гепарином, опухолевые клетки отделяли низкоскоростным центрифугированием и измеряли объемы осадков. Проводили количественный микроскопический анализ онкоцитов. На основании полученных данных или средних значений массы опухоли (С-180; КСУ) и массы тела животных к концу исследуемого срока рассчитывали общепринятые индексы торможения роста неоплазмы (It), коэффициенты противоопухолевой активности (Ka) и индексы эффективности соединений (Iэ) [19,22]. В отдельном эксперименте исследовали продолжительность жизни контрольных и опытных животных. Сравнительную оценку противоопухолевых свойств соединений проводили комплексно на основании всех названных критериев и сравнивали с действием ОТ или метотрексата. Полученные данные обрабатывали статистически, достоверность различий оценивали на уровне значимости  $P < 0,05$ .

Установлено, что несимметричные эфиры ОТ с нормальными и разветвленными углеводородными радикалами, его сложные эфиры с одноосновными и двухосновными кислотами оказывают в опытах *in vitro* более значительное, по сравнению с исходным соединением, цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Наилучшие результаты получены при использовании окситиаминнонилдисульфида (ОТ-НДС), сложных эфиров ОТ с замещенными фталилукусной и аминопропионовой кислотами, полных сложных эфиров ОТ с пробковой, себаценовой и диметилглутаровой кислотами [5,6,8,12,16]. Количество нежизнеспособных злокачественных клеток при этом составило, по сравнению с контролем, соответственно, 100; 28; 53; 50; 100 и 100%, а в случае использования ОТ - 21%.

Показано, что некоторые из аналогов ОТ, такие как ОТ-НДС, сложные эфиры ОТ с аминопропионовой и себаценовой кислотами, а также его соли с ферроценовым фрагментом, полиангидроглюкуроновой кислотой и комбинированные препараты последнего соединения с метотрексатом проявляют более высокую, по сравнению с ОТ и метотрексатом, противоопухолевую активность в опытах *in vivo* и сильнее увеличивают продолжительность жизни пролеченных животных, соответственно, на 65, 25, 35, 150, 230 и 180%, по сравнению с контролем ( $P < 0,001$ ) [5,6,8,11,12,13,14,15,17]. Под действием данных веществ существенно снижается митотический индекс онкоцитов (в 2,5–3,8 раза), увеличивается число дегенерирующих (в 1,7–3,2 раза) и погибших (в 1,8–2,2 раза) опухолевых клеток, уменьшаются объемы асцита, количество злокачественных клеток в брюшной полости животных (АРЭ) и массы опухолей (С-180, КСУ), значительно тормозится рост неоплазмы.

Сопоставление величин It, Ka и Iэ в интенсивную фазу опухолевого роста у контрольных животных для исследуемых соединений, которые составили, соответственно: 69,2; 63,2 и 105,5 (ОТ-НДС), 62,1; 55,6 и 89,0 (эфир ОТ аминопропионовой кислотой), 74,1; 75,5 и 183,33 (соль ОТ с полиангидроглюкуроновой кислотой), 86,2; 80,8 и 256,0, а также 84,4; 76,5 и 211,9 (комбинированный препарат соли ОТ с полиангидроглюкуроновой кислотой и метотрексата), характеризует последние три производных как наиболее эффективные [5,8,11]. Отличительными особенностями их являются длительный противоопухолевый эффект, меньшее токсическое действие на организм и более высокая продолжительность жизни опухоленосителей по сравнению с ОТ и метотрексатом.

Установлено, что под влиянием данных веществ более сильно угнетается активность ТК и снижается количество ТДФ в опухолевой, чем в других тканях организма. При анализе полученных данных выявлена высокая степень связи ( $r = 0,964-0,999$ ) между ингибированием ТК в неоплазме и количественными параметрами антибластомного действия ОТ и его аналогов [5,6,8,11,12], что позволяет считать подавление активности этого фермента в злокачественных

новообразованиях одним из определяющих факторов в механизме их канцеростатического эффекта. Это подтверждает также отсутствие выраженных противоопухолевых свойств у окисленных аналогов тиамин [7,9], которые не являются эффективными ингибиторами ТК.

Полагаем, что основной биохимический механизм противоопухолевого действия ОТ и его производных заключается в избирательном угнетении ими активности ТК в онкоцитах как за счет специфического антикоферментного ингибирования фермента, которое является преимущественным, так и возможных кооперативных эффектов или подавления биосинтеза ферментного белка и уменьшения его массы, блокирования ПФЦ, приводящего к торможению поставки необходимого для синтеза РНК 5-фосфорибозилпирофосфата, и замедлению роста неоплазмы.

**Заключение.** Таким образом, в результате проведенного нами комплекса исследований показано, что некоторые из аналогов ОТ (соли с ферроценовым фрагментом, полиангидроглюкуроновой кислотой, дисульфиды с нормальными углеводородными радикалами, полные сложные эфиры с дикарбоновыми кислотами) оказывают сильное противоопухолевое действие в опытах *in vivo* и значительно увеличивают сроки жизни пролеченных животных.

Под влиянием данных веществ в большей степени угнетается активность ТК и снижается количество ТДФ в опухолевой, чем в других тканях организма.

Установлены простые линейные корреляционные зависимости с высокими статистическими показателями между степенью ингибирования ТК в опухолях и параметрами противоопухолевого действия соединений. Выявленные регрессии, с одной стороны, дают нам основание говорить о подавлении активности ТК в онкоцитах, как одном из определяющих факторов в механизме канцеростатического эффекта ОТ и его аналогов, а с другой - делают их, несомненно, полезными при целенаправленном поиске новых эффективных противоопухолевых средств среди других производных тиамин.

Показана возможность усиления некоторыми аналогами ОТ противоопухолевого действия метотрексата. Полученные данные дают нам основание считать, что на основе ряда производных ОТ, имеющих преимущества при транспорте и протеидизации в организме, и являющихся сильными, высокоспецифическими ингибиторами ТК в злокачественных новообразованиях, а также комбинации их с другими антибластомными препаратами, в том числе угнетающими окислительную ветвь ПФЦ, может быть получен новый класс эффективных канцеростатических средств антиметаболитного типа.

### Список литературы

1. Виноградов, В. В. Является ли окситиамин антивитамином / В. В. Виноградов, В. П. Водоевич, А. В. Рожко // Биохимия. — 1995. — Т. 60, № 10. — С. 1564–1574.
2. Горбач, З. В. Обмен кофермента в составе транскетолазы печени крысы / З. В. Горбач, В. Л. Кубышин, С. С. Маглыш // Биохимия. — 1986. — Т. 51, № 7. — С. 1093–1100.
3. Дьячкова, Л. В. Содержание тиамин в тканях, активность транскетолазы и развитие экспериментальных опухолей при различной обеспеченности организма тиамином / Л. В. Дьячкова, Е. В. Шамаева, Г. Н. Платонова // Вопр. питания. — 1972. — Т. 31, № 2. — С. 42–47.
4. Зиматкина, Т. И. Влияние окситиамин и его пиримидинового аналога на рост карциносаркомы Уокер-256 и обеспеченность ее тиамином / Т. И. Зиматкина, Д. А. Опарин, Т. В. Рудяк // Весці АН Беларусь. Сер. біял. навук. — 2000б. — № 1. — С. 83–86.
5. Зиматкина, Т.И. Концепция поиска разработки противоопухолевых препаратов среди производных тиамин / Т. И. Зиматкина // Эколого-профилактические проблемы здоровья населения: матер. междунар. научно-практ. конф. — Гродно, 2002. — С. 46–54.

6. Зиматкина, Т. И. О противоопухолевой активности продуктов окислительного превращения витамина В1 / Т. И. Зиматкина, С. В. Забродская, Д. А. Опарин // Весці АН Беларусі, Сер. біял. навук. — 1993. — №3. — С. 118–119.
7. Зиматкина, Т. И. Результаты экспериментального изучения противоопухолевого действия некоторых новых производных витамина В1 / Т. И. Зиматкина // Достижения медицинской науки Беларуси: сб. науч. трудов. — 2003. — Вып. 8. — С. 150–151.
8. Изучение канцеростатической активности оксодигидротиохрома / Т. И. Зиматкина [и др.] // Доклады АН БССР. — 1985. — Т. 29, № 10. — С. 945–947.
9. Исмагулова, Т. С. Обмен витамина В<sub>1</sub> у больных раком гортани / Т. С. Исмагулова, В. С. Погосов, В. Б. Спиричев // Вопр. мед. химии. — 1971. — Т. 17, №1. — С. 76–81.
10. Исследование в эксперименте противоопухолевого действия и физико-химических свойств нового иммобилизованного на окисленной целлюлозе препарата окситиамина и метотрексата / Т. И. Зиматкина [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси. — 2000. — Вып. 5. — С. 166–167.
11. Исследование в эксперименте противоопухолевого действия и физико-химических свойств нового иммобилизованного на окисленной целлюлозе препарата окситиамина и метотрексата / Т. И. Зиматкина [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси. — 2000б. — Вып. 5. — С. 166–167.
12. О канцеростатической активности некоторых производных окситиамина / Т. И. Зиматкина [и др.] // Доклады АН БССР. — 1986. — Т. 30, №9. — С. 850–852.
13. Противоопухолевая активность препаратов иммобилизованного окситиамина / Т. И. Зиматкина [и др.] // Вести БГУ. — 1991в. — №3. — С. 35–39.
14. Противоопухолевая активность препаратов иммобилизованного окситиамина / Т. И. Зиматкина [и др.] // Вести БГУ. — 1991в. — №3. — С. 35–39.
15. Противоопухолевая и антивитаминная активность окситиамина при полихимиотерапии его с метотрексатом / Т. И. Зиматкина [и др.] // Вести Белорусского ун-та, сер. 2: хим. биол. геогр. — 1995. — № 1. — С. 34–39.
16. Сравнительная оценка действия окситиамина и его производных на асцитный рак Эрлиха / Т. И. Зиматкина [и др.] // Экспериментальная онкология. — 1986. — №2. — С. 68–70.
17. Сравнительная оценка противоопухолевого действия препаратов свободного и связанного окситиамина / Т. И. Зиматкина [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 1992. — Т. 36, №6. — С. 552–557.
18. Требухина, Р. В. Обмен витамина В<sub>1</sub> и РР и их применение в онкологической практике / Р. В. Требухина, Т. А. Колтанюк, В. Г. Петушок // Вопр. мед. химии. — 1992а. — Т. 38, №5. — С. 33–36.
19. Чернов, В. А. Изучение противоопухолевой активности химиотерапевтических препаратов // Методы экспериментальной химиотерапии / В. А. Чернов; под ред. Г. И. Першина. — М.: Медицина, 1971. — С. 357–382.
20. Экологическая медицина: учеб пособие / В. Н. Бортновский [и др.]. — Мн.: Новое знание; М.: ИНФРА-М, 2014. — 184 с.
21. Экспериментальная витаминология / В. С. Шапот; под ред. Ю.М. Островского. — Минск: Наука и техника, 1979. — 552с.
22. Эммануэль, Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов / Н. М. Эммануэль. — Москва: Мир, 1977. — С. 45–134.
23. Boros, L. Thiamine supplementation to cancer patients: a double edged sword / L. Boros, J. Brandes, W. N. Lee // Anticancer Research. — 1998а. — Vol. 18. — P. 595–602.

24. Cascante, M. Role of thiamine (vitamin B-1) and transketolase in tumor cell proliferation / M. Cascante, J. J. Centelles, R. L. Veech // *Nutr. Cancer.* — 2000. — Vol. 36, №2. — P. 150–154.
25. Comin-Anduix, B. The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. A metabolic control analysis study / B. Comin-Anduix, J. Boren, S. Martinez // *Eur. J. Biochem.* — 2001. — Vol. 268. — P. 4177–4182.
26. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation / L. G. Boros [et al.] // *Cancer research.* — 1997. — Vol. 57. — P. 4242–4248.
27. Rais, B. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle / B. Rais, B. Comin, J. Puigjaner // *FEBS Lett.* — 1999. — Vol. 456. — P. 113–118.
28. Ramos-Montoya, A. Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer / A. Ramos-Montoya, W. N. Lee, S. Bassilian // *Int. J. Cancer.* — 2006. — Vol. 119. — P. 2733–2741.

## **RESULTS OF THE STUDY OF ANTITUMOR PROPERTIES OF A NUMBER OF THIAMINE DERIVATIVES**

---

*Zimatkina T. I.*

*Educational institution «Grodno State Medical University»,  
Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *It was found that some analogues of the hydroxylated derivative of vitamin B1 oxytyamine (salts with a ferrocene fragment, polyanhydroglucuronic acid, disulfides with normal hydrocarbon radicals, complete esters with dicarboxylic acids) have a strong antitumor effect in experiments in vivo and significantly increase the life span of treated animals. Under the influence of these substances, the activity of transketolase is more inhibited and the amount of thiamine diphosphate in the tumor is reduced than in other tissues of the body of tumor carriers. The possibility of enhancing the antitumor properties of methotrexate with oxytyamine and some of its analogues is shown.*

## ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА ИЗ СЕМЯН РАСТЕНИЙ *OENOTHERA BIENNIS* L., ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В БЕЛАРУСИ, НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН У КРЫС

Канделинская О.Л.<sup>1</sup>, Грищенко Е.Р.<sup>1</sup>, Левкович А.В.<sup>1</sup>,  
Огурцова С.Э.<sup>2</sup>, Таганович А.Д.<sup>3</sup>, Девина Е.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** Впервые установлено, что белковый комплекс из семян *Oenothera biennis* L. при включении в рацион крыс линии Wistar оказывал гипополипидемическое действие, способствуя снижению массы тела и увеличению уровня липопротеинов высокой плотности. Согласно данным электрофоретического анализа, в компонентном составе белкового комплекса семян *O. biennis* преобладали средне- и низкомолекулярные пептиды. Обсуждаются перспективы создания на основе *O. biennis* отечественных фитопрепаратов гипополипидемического действия.

**Введение.** Энотера двулетняя (ослиник двулетний) - *Oenothera biennis* L. рода *Oenothera* семейства Кипрейные — *Onagraceae* Juss. широко распространена в Беларуси и имеет статус инвазивного вида [1]. Вместе с тем, семена *O. biennis* являются источником ценного масла, которое характеризуется высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), таких как линолевая кислота (69,6–71,6%) и  $\gamma$ -линоленовая кислота (9,0–10,7%). Масло *O. biennis* признано официальным в США и ряде стран ЕС, где растение культивируется и интенсивно исследуется. Спектр биологической активности масла энотеры весьма широк [2, 3]. Нами также показано, что масло из семян *O. biennis*, собранных в различных регионах Беларуси, не уступает по содержанию  $\gamma$ -линоленовой кислоты мировым аналогам и характеризуется гипополипидемическим и иммуномодулирующим действием [4]. Необходимо отметить, что внимание исследователей привлекают и другие физиологически активные вещества семян энотеры, в частности, фенольные соединения [5]. Что касается белков энотеры, то сведения о них крайне скудны, и ограничиваются единичными публикациями [6, 7]. Однако в этих работах подчеркивается потенциальная биологическая ценность белка энотеры.

Учитывая, что в официальной медицине Беларуси *O. biennis* не используются, но, вместе с тем, имеет высокий лекарственный потенциал, представляется целесообразным разработать подходы для более широкого практического использования данного вида, что явится также основой ограничения его экспансии в нашей стране.

Целью настоящей работы явилось изучение некоторых физико-химических свойств и биологической активности белкового комплекса семян *Oenothera biennis* L., собранных в различных регионах Беларуси.

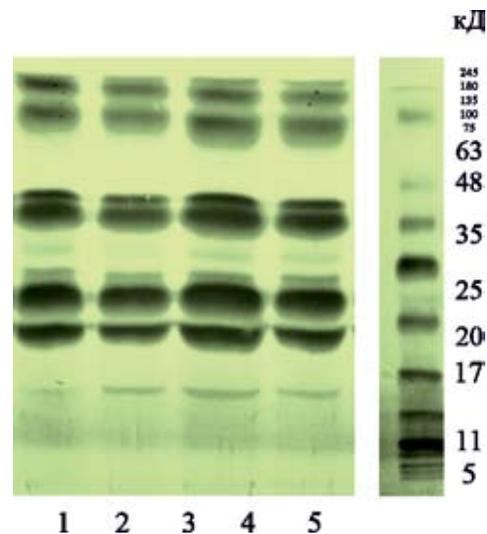
**Материалы и методы исследования.** В работе использовали семена *O. biennis*, собранные в различных регионах Беларуси (Лепельском районе Витебской области; Вилейском, Мо-

лодечненском, Солигорском районах Минской области). Семена перед экспериментами измельчали на лабораторной мельнице и обезжиривали гексаном. Выделение белкового комплекса из муки проводили в соответствии с методическими рекомендациями [8]. Электрофоретический анализ белкового комплекса из семян *O. biennis* проводили в диссоциирующих условиях с SDS по Laemmli [9]. Определение концентрации белка осуществляли по методу Bradford [10]. Исследование влияния белкового комплекса из семян *O. biennis* на показатель массы тела лабораторных животных проводили в экспериментах *in vivo* на молодых крысах самцах линии Wistar в возрасте 2 месяцев и массой тела 200-220 г. Предварительно животные были взвешены на весах Scout Pro SPU202 OHAUS (США) и рандомизированы на 2 группы. Общее количество крыс — 10 (по 5 в каждой группе). Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре воздуха 18-22 °С; относительной влажности 50-70%; световом режиме 12 часов света и 12 часов темноты; режимом проветривания, обеспечивающим около 15 объемов помещения в час. Перед началом эксперимента животных выдерживали в карантинных условиях в течение двух недель. Кормление животных в условиях субхронического эксперимента осуществлялось ежедневно на протяжении 15 дней по следующей схеме: группа 1 — контрольные животные содержались на стандартном корме; группа 2 — животные содержались на стандартном корме, в который добавляли белковый комплекс. Ежедневная доза белкового комплекса, содержащего не менее 500 мкг белка/мл, составляла 3 мл на 200 г массы тела. Для оценки динамики показателя массы тела в ходе эксперимента животных взвешивали на тех же весах 1 раз в неделю, натощак, в утреннее время. Для гематологических исследований забор крови животных осуществляли через 15 суток из боковой хвостовой вены в объеме 20 мкл и разводили в готовом растворе (Human GmbH, Германия) в соотношении 1:10. Анализ показателей проводили на гематологическом анализаторе Numасаunt (Германия). Определяли количество эритроцитов ( $Ч10^{12}/л$ ), лейкоцитов ( $Ч10^9/л$ ), тромбоцитов ( $Ч10^9/л$ ), величину гематокрита (%), концентрацию гемоглобина (г/л), средний объем эритроцитов ( $мкм^3$ ), количество лимфоцитов (%), моноцитов (%), гранулоцитов (%), среднее содержание гемоглобина в эритроците (pg), коэффициент вариации среднего объема эритроцитов (%). Для биохимического анализа забор крови осуществляли также спустя 30 суток в соответствии с Европейской директивой 2010/63 [11]. Кровь вносили в пробирку, выдерживали 30 минут при температуре 20 °С и центрифугировали со скоростью 1500 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму крови исследовали на автоматическом анализаторе «Hitachi-902» (Швейцария), адаптированном к реактивам «Rosh Diagnostics» (Германия) и «P.Z. Company» (Польша). Биохимический анализ крови включал определение следующих показателей: общий белок, альбумин, глюкоза, холестерин, липопротеины высокой (ЛПВП) и низкой (ЛПНП) плотности, триглицериды, глюкоза, иммуноглобулины IgG, IgM. Статистическую обработку проводили с использованием пакета анализа данных Excel. Достоверность оценивали по критерию *t*-Стьюдента с учетом дисперсии (F-тест), параметрического статистического метода при помощи программы Statistica 6,0. Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Данные представляли в виде  $X \pm S_x$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Мы провели электрофоретический анализ белкового комплекса из семян *O. biennis*, собранных в различных местообитаниях растений [рис. 1].

Согласно представленным данным, в белковом комплексе семян *O. biennis* собранных в различных регионах Беларуси, были идентифицированы пять основных белковых компонентов с молекулярной массой в диапазоне 5 - 48 кДа. Из них низкомолекулярные белковые компоненты находились в диапазоне молекулярных масс 5 - 11 кДа. Среднемолекулярные белковые

компоненты находились в диапазоне молекулярных масс 20 - 35 кДа, а также в области 35 - 48 кДа. Существенных различий по компонентному составу белкового комплекса семян, собранных в различных регионах Беларуси, не наблюдалось. Нельзя исключить некоторую вариабельность количества пептидных компонентов, что может быть обусловлено особенностями почвенно-климатических условий произрастания растений.



**Рисунок 1 — Электрофоретический спектр белкового комплекса семян *O.biennis* из различных регионов Беларуси: 1 — Лепельский район; 2 — Солигорский район; 3 — Молодечненский район, 4 — Вилейский район; 5 — белки-маркеры молекулярных масс в диапазоне 5–245 кДа (Blue elf prestained Protein Marker 5–245 kDa, Jena Bioscience)**

Показано, что в начале эксперимента лабораторные животные опытной и контрольной групп достоверно не различались между собой по исходной массе тела (таблица 1).

**Таблица 1 — Влияние белкового комплекса из семян *O.biennis* на массу тела крыс**

Группы	Масса тела, г, (M ± SD)		
	1 сутки	7 сутки	15 сутки
Группа 1	216,00±5,80	276,00±5,10	310,00±4,00
Группа 2	212,00±3,75	252,00±4,90*	285,00±5,24*

Примечание: \*- различия статистически достоверны,  $p < 0,05$

В течение 15 дней эксперимента увеличение массы тела было отмечено во всех исследуемых группах животных, однако в группе 2 этот процесс был менее выражен по сравнению с контрольной группой 1. У крыс, получавших белковый комплекс, на 7-е и 15-е сутки отмечалось статистически значимое снижение массы тела по сравнению с контрольной группой на 8,7% и 8,1%, соответственно. При этом общее состояние крыс опытной группы было в пределах нормы (данные не представлены).

Нами показано, что белковый комплекс не оказывал повреждающего действия на гемопоэз и свойства крови у животных, что подтверждается стабильным уровнем форменных элементов крови (таблица 2).

При этом отмечено стимулирующее действие белкового комплекса на иммунокомпенсаторные и клеточные процессы в организме и увеличение уровня гранулоцитов на 26%, которые, как известно, выполняют в организме роль многофункционального центра регуляции адаптивного иммунного ответа [12]. Ранее нами также было показано, что гипополидемическое дей-

ствии выделенного нами масла из семян энотеры, собранных в Беларуси, сопровождалось у лабораторных крыс при экспериментальной гиперлипидемии увеличением содержания гранулоцитов [4].

**Таблица 2 — Влияние белкового комплекса из семян *O. biennis* на гематологические показатели крови лабораторных крыс**

Гематологические показатели	Группа 1	Группа 2
WBC, количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	22,81 $\pm$ 1,79	23,28 $\pm$ 0,84
RBC, количество эритроцитов, $\times 10^9/\text{л}$	11,41 $\pm$ 0,95	12,10 $\pm$ 1,42
HGB, концентрация гемоглобина, г/л	192,00 $\pm$ 8,55	194,40 $\pm$ 5,04
HCT, величина гематокрита, %	53,28 $\pm$ 2,29	54,64 $\pm$ 1,38
MCV, средний объем эритроцитов, мкм <sup>3</sup>	46,80 $\pm$ 0,97	46,80 $\pm$ 0,69
RDWc, коэф. вариации среднего объема эритроцитов %	17,93 $\pm$ 0,35	18,02 $\pm$ 0,27
MCH, среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	16,76 $\pm$ 0,20	16,14 $\pm$ 0,15
LY %, количество лимфоцитов, %	79,58 $\pm$ 3,95	77,96 $\pm$ 1,78
MP%, количество моноцитов, %	5,66 $\pm$ 0,17	4,94 $\pm$ 0,52
GR%, количество гранулоцитов, %	21,72 $\pm$ 1,64	27,40 $\pm$ 1,40*
PLT, количество тромбоцитов $\times 10^9/\text{л}$	312,40 $\pm$ 16,77	308,60 $\pm$ 12,76

Примечание: \* — достоверные отличия от контрольной группы,  $p \leq 0,05$ .

В пробах сыворотки крови крыс, употреблявших в пищу белковый комплекс из семян энотеры, не было выявлено существенных изменений концентрации общего белка и альбумина, что указывает на стабильность белковообразующей функции печени (таблица 3). Не наблюдалось и статистически значимых отличий показателя концентрации глюкозы у крыс

**Таблица 3 — Влияние белкового комплекса из семян *O. biennis* на биохимические показатели сыворотки крови**

Биохимические показатели	Группа 1	Группа 2
Общий белок, г/л	58,91 $\pm$ 1,22	57,60 $\pm$ 1,80
Альбумин, г/л	39,84 $\pm$ 0,87	40,06 $\pm$ 0,90
Глюкоза, ммоль/л	6,24 $\pm$ 0,30	6,62 $\pm$ 0,33
Холестерин, ммоль/л	1,80 $\pm$ 0,12	1,64 $\pm$ 0,14
ЛПВП, ммоль/л	2,10 $\pm$ 0,06	2,34 $\pm$ 0,05*
ЛПНП, ммоль/л	0,26 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,04
Триглицериды, ммоль/л	1,21 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,12
IgM, г/л	0,13 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02
IgG, г/л	0,41 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,06

Примечание: \* достоверные отличия от контрольной группы,  $p \leq 0,05$ . экспериментальной группы по сравнению с группой контрольных животных.

Установлено, что у крыс 2 опытной группы, которым в рацион добавляли белковый комплекс, наблюдалось достоверное увеличение содержания в сыворотке крови уровня ЛПВП при  $p \leq 0,05$  (на 11%). При этом можно отметить тенденцию снижения уровней ЛПНП и триглицеридов.

Анализируя полученные результаты, следует отметить следующее. Общеизвестно, что включение в рацион специализированных диетических продуктов является важнейшим условием успешной профилактики и коррекции нарушений липидного обмена. В подобном контексте концепция адекватного использования сбалансированной диеты приобретает все большее значение в диетотерапии больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), а также с метаболическим синдромом [13-15]. Так, показано, что включение в базисную диету специализированного белкового продукта, - концентрата молочного белка, - способствовало улучшению

биохимических показателей и показателей метаболического статуса больных с ССЗ в сочетании с ожирением [13]. Автором исследования отмечено также снижение массы тела пациентов на фоне увеличения скорости окисления жиров. Сделан вывод о том, что включение в рацион специализированного белкового продукта способствует нормализации обменных процессов у данной категории пациентов.

О важности белковой составляющей для больных с ССЗ свидетельствуют утвержденные Министерством здравоохранения РФ методические рекомендации, которые регламентируют содержание в суточных рационах сбалансированного по аминокислотному составу белка в количестве от 80 до 90 г, что достигается благодаря использованию белков не только животного происхождения, но также растительных белков или их композиций [14, 15].

Белковые продукты из сои наиболее часто применяются в диетическом питании. Однако поскольку в соевом белке аминокислоты метионин и цистин являются лимитирующими, существует необходимость в поиске дополнительных источников растительного белка, сбалансированного по серосодержащим аминокислотам. В этом плане белок из семян *O. biennis*, который содержит метионин и цистин в количествах, превышающих таковые в соевом белке [7], может рассматриваться как перспективный при разработке специализированных белковых продуктов.

**Заключение.** Впервые в экспериментах *in vivo* показано, что белковый комплекс из семян растений *O. biennis*, произрастающих в Беларуси, регулирует липидный обмен и характеризуется гиполипидемическим действием, снижая массу тела и увеличивая уровень ЛПВП у лабораторных животных. При этом наблюдается тенденция снижения уровня ЛПНП и триглицеридов. Побочных эффектов применения белкового комплекса у крыс отмечено не было.

Полученные результаты могут являться основой для дальнейших более расширенных исследований растений *O. biennis*, произрастающих в Беларуси, с целью вовлечения данного вида в хозяйственный оборот и разработки безотходных технологий получения из семян отечественных фитопрепаратов гиполипидемического действия.

В перспективе возможно создание на основе белкового комплекса из семян *O. biennis*, собранных в Беларуси, новых видов специализированных продуктов питания повышенной биологической ценности для различных групп населения, в том числе, для профилактики и в комплексной терапии нарушений липидного обмена.

### Список литературы

1. Черная книга флоры Беларуси: чужеродные вредоносные растения / Д.В. Дубовик [и др.]; под ред. В.И. Парфенова, А.В. Пугачевского. — Минск: Беларуская навука, 2020. — С.224–230.
2. Evening primrose oil, refined / European Pharmacopoeia. 8th ed. suppl. 8.0 — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2014. — Vol. 2. — P. 2206–2207.
3. Assessment report on *Oenothera biennis* L. or *Oenothera lamarckiana* L., oleum / 5 June 2018 ЕМА/НМРС/753042/2017 Committee on Herbal MedicРежим доступа : <http://www.ema.europa.eu/contact>. — Дата доступа: 01.02.2021.
4. Канделинская, О.Л. Парадокс *Oenothera biennis* L. (Часть I) / Канделинская О.Л., Грищенко Е.Р., Огурцова С.Э., Горбачевич Г.И. // Наука и инновации — 2021. — №2. — С.66—71.
5. Абдуллажанова, Н. Г. Фенольные соединения *Oenothera gigas* / Н. Г. Абдуллажанова, С. М. Мавлянов, Ш. В.Абдуллаев // Химия природн. соедин. — 2000. — №1. — С. 76.
6. Ghasemnezhad, A. Yield, oil constituents, and protein content of evening primrose (*Oenothera biennis* L.) seeds depending on harvest time, harvest method and nitrogen application / A. Ghasemnezhad, B. Honermeier. *Industrial Crops and Products*. — 2008. — 28(1). — P. 17–23.

7. Golabczak, J. Modification of Proteins from Evening Primrose by Transglutaminase / J. Golabczak, J. Strakowska, A. Stan // Chem. Pap. — 2004. -Vol. 58, №6. — P. 415–417.
8. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. — Москва: Мир, 1985. — 358 с.
9. Laemmli, U.K. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of Bacteriophage / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227, № 5259. — P.680-685.
10. Bradford, M.M. *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding* / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72 (1–2). — P. 248–254.
11. Рыбакова, А.В., Макарова М.Н. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской директивой 2010/63 / А.В. Рыбакова, М.Н. Макарова // *Международный вестник ветеринарии.* — 2015. — № 2. — С.96–107.
12. Долгушин, И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых / И. И. Долгушин // *Бюллетень сибирской медицины.* — 2019. — Т. 18, № 1. — С. 30–37.
13. Дмитриевская, М.Н. Разработка принципов оптимизации диетотерапии больных сердечно-сосудистыми заболеваниями на основе комплексной оценки пищевого статуса: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.05 / М.Н. Дмитриевская; ГУ «Научно-исследовательский институт питания Российской академии медицинских наук». — Москва, 2007. — 28 с.
14. Теоретические и практические аспекты разработки специализированных пищевых продуктов для диетотерапии при сердечно-сосудистых заболеваниях / А.А. Кочеткова [и др.] // *Пищевая промышленность.* — 2016. — № 8. — С. 8-12.
15. Погожева, А.В. Основы рациональной диетотерапии при сердечно-сосудистых заболеваниях / А.В. Погожева // *Клиническая диетология.* — 2004. — Т. 1, № 2. — С.17–29.

---

## EFFECT OF PROTEIN COMPLEX FROM SEEDS OF *OENOTHERA BIENNIS* L. PLANTS GROWING IN BELARUS ON LIPID EXCHANGE IN RATS

---

*Kandelinskaya O.L.<sup>1</sup>, Grischenko E.R.<sup>1</sup>, Levkovich A.V.<sup>1</sup>,  
Ogurtsova S.E.<sup>2</sup>, Taganovich A.D.<sup>3</sup>, Devina E.A.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Experimental Botany of the National Academy  
of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus*

<sup>3</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *It was established for the first time that the protein complex from *Oenothera biennis* L. seeds when included in the diet of Wistar rats, had a hypolipidemic effect, contributing to a decrease in body weight and an increase in the level of high density lipoproteins. According to the electrophoretic analysis data, medium and low molecular weight peptides prevailed in the component composition of the protein complex of *O. biennis* seeds. The prospects for the creation of domestic phytopreparations of hypolipidemic action on the basis of *O. biennis* are discussed.*

## ПРИМЕР ПРОГРАММЫ НА ЯЗЫКЕ PYTHON ДЛЯ РАСЧЕТА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ВЫХОДА БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

*Коваль А.Н.*

*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Республика Беларусь*

**Резюме.** На примере алгоритма, приведенного во многих учебниках по биологической химии, автор показывает как можно составить небольшую программу, рассчитывающую энергетический выход при бета-окислении жирных кислот исходя из следующих параметров: количество атомов углерода и число двойных связей. Для написания программы требуются начальные навыки программирования на языке Python. Данная практика может быть рекомендована для проведения углубленных или факультативных занятий по биологической химии.

Изучение биологических наук часто связано с пониманием математического аппарата. В биологической химии имеется ряд тем, в которых предполагается проводить расчетные исследования: при изучении кинетики ферментативных реакций, определения заряда пептида при разных значениях pH, расчета энергетического баланса окисления белков, жиров и углеводов.

Для оценки энергетического выхода в ходе метаболических реакций студенты рассчитывают баланс АТФ по каждой такой реакции в цикле.

Для расчета энергетического выхода бета-окисления жирных кислот предлагается программа `fa_box4`, написанная на языке Python (версия 3). При написании программы использовалась парадигма функционального программирования при учете количества двойных связей (функция `dbb()`) для каждого из этапов бета-окисления. Например, для цикла трикарбоновых кислот Кребса алгоритм расчета количества молекул АТФ изначально был следующим [1]:



Однако в новых учебниках [2] приводится уже несколько иной алгоритм:



Т. е. для каждого из коферментов ( $\text{FADH}_2$  и  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) энергетический выход уменьшен на 0,5.

Исходя из этого в самом начале программы, написанной автором на языке Python [3], можно задать переменные `fad` и `nad`, численно равные энергетическому выходу для  $\text{FADH}_2$  и  $\text{NADH} + \text{H}^+$  соответственно.

`fad, nad = 1.5, 2.5` (для расчета по новым правилам)

или

`fad, nad = 2, 3` (для расчета по прежним правилам).

Учет числа двойных связей проведен с использованием собственной программы `dbb(n)`, где `n` — количество двойных связей в ненасыщенной жирной кислоте:

`def dbb(n):`

`y = []`

```

for z in range(n):
    if z == 0:
        pass
    if z%2 != 0:
        y.append(nad)
    else:
        y.append(fad)
return sum(y).

```

Таким образом, каждая четная двойная связь (2, 4 и т.д.) эквивалентна 1 NADH+H<sup>+</sup>, а каждая нечетная (1, 3 и т. д.) — 1 FADH<sub>2</sub>. Эта сумма будет вычитаться из энергетического выхода для окисления соответствующей насыщенной жирной кислоты.

Конечный расчет общего количества АТФ производится с помощью составления собственной программы с использованием известного алгоритма, приведенного в учебниках [1, 2], модифицированного автором для ненасыщенных жирных кислот:

```

def fa_box(m, n):
    return ((m/2-1)*(fad+nad)+(m/2)*tca)-2-dbb(n),

```

где  $m$  — количество атомов углерода в жирной кислоте;  $n$  — количество двойных связей в ненасыщенной жирной кислоте;  $m/2$  — количество молекул ацетил-КоА (каждая соответствует 1 обороту ЦТК);  $m/2-1$  — количество циклов бета-окисления.

Еще одну особенность необходимо учесть при написании программы — окисление жирных кислот с нечетным числом атомов углерода ( $n\%2 \neq 0$ ). Здесь можно использовать алгоритм, по которому за основу для расчета энергетического баланса берется жирная кислота с меньшим четным числом атомов углерода ( $a-1$ ). Затем к полученному числу прибавляется энергия окисления 1 FADH<sub>2</sub> и 2 NADH+H<sup>+</sup>:

```

for a in range(2,21):
    if a%2 != 0:
        print(«C», a, «:», 0, « — », fa_box(a-1, 0)+(2*nad +fad), sep = «»).

```

На выходе программа печатает энергетический баланс ЦТК (как указатель на способ расчета), список жирных кислот с указанием числа атомов (*for a in range(2,21)* соответствует диапазону от 2 до 20) и двойных связей (для жирных кислот с числом атомов 16, 18 и 20) и соответствующее количество АТФ для встречающихся в курсе биологической химии жирных кислот.

```

TCA yield: 10.0
C2:0 — 8.0
C3:0 — 14.5
C4:0 — 22.0
C5:0 — 28.5
C6:0 — 36.0
C7:0 — 42.5
C8:0 — 50.0
C9:0 — 56.5
C10:0 — 64.0

```

C11:0 — 70.5  
C12:0 — 78.0  
C13:0 — 84.5  
C14:0 — 92.0  
C15:0 — 98.5  
C16:0 — 106.0  
C16:1 — 104.5  
C17:0 — 112.5  
C18:0 — 120.0  
C18:1 — 118.5  
C18:2 — 116.0  
C18:3 — 114.5  
C19:0 — 126.5  
C20:0 — 134.0  
C20:1 — 132.5  
C20:2 — 130.0  
C20:3 — 128.5  
C20:4 — 126.0

Можно изменить код программы и получить расчеты для других жирных кислот, изменяя диапазон параметров для функции *range()*.

Сам язык Python достаточно легок для изучения и может быть использован для различных целей: от расчетных задач до написания сложных программ. Для начального ознакомления с этим и другими языками программирования можно рекомендовать веб-сайт SoloLearn.com и одноименное бесплатное мобильное приложение [4], где имеется возможность написания программ, их модификации и тестирования работоспособности.

**Заключение.** Использование программирования при изучении курса биологической химии позволяет разнообразить практические занятия, приобщить студентов к изучению языков программирования, например, популярного среди программистов и несложного для изучения языка Python, и привлечь к научно-исследовательской работе студентов, имеющих опыт программирования и желающих его развить. Программа *fa\_box4*, составленная автором на платформе SoloLearn, позволяет рассчитывать энергетический выход бета-окисления жирных кислот с применением ранее опубликованных алгоритмов и может быть использован как пример для написания аналогичных программ.

### Список литературы

1. Интеграционный подход в обучении математике, информатике и биологии / М.А. Кашкарова [и др.] // Проблемы современной науки и образования. — Изд.: Олимп (Иваново). — 2016.— Т. 57, № 15 — С. 111–113.
2. Роганов, Е. А. Основы информатики и программирования / Е.А. Роганов — М.: МГИУ, 2001. — 299 с.
3. Система программирования PascalABC.NET. — Mode of access: <http://pascalabc.net>. — Date of access: 15.06.2020.
4. Computational intelligence in biomedicine and bioinformatics: Current trends and applications / Edited by T.G. Smolinski, M.G. Milanova, A.-E. Hassanien // 2008. — Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. — 432 p.

5. R: The R Project for Statistical Computing. — Mode of access: <https://www.r-project.org>. — Date of access: 29.06.2020.
6. Ruby Programming Language. — Mode of access: <https://www.ruby-lang.org/>. — Date of access: 25.06.2020.
7. The Julia Programming Language. — Mode of access: <https://julialang.org/> — Date of access: 29.06.2020.
8. Welcome to Python.org. — Mode of access: <https://www.python.org/> — Date of access: 30.06.2020.
9. Yi-Ping Phoebe Chen (Ed.) *Bioinformatics Technologies* / Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. — 396 p.

## **EXAMPLE OF THE PYTHON LANGUAGE PROGRAM FOR CALCULATING THE ENERGY YIELD OF FATTY ACID BETA- OXIDATION**

---

*Koval A.N.*

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

**Summary.** *Using the algorithm presented in many textbooks on biological chemistry, the author shows how a small program can be compiled that calculates the energy yield during beta-oxidation of fatty acids based on the parameters: the number of carbon atoms and the number of double bonds. Writing a program requires basic programming skills in the Python. This practice can be recommended for in-depth or optional classes in biological chemistry.*

## ЭЛЕМЕНТЫ ПРОГРАММИРОВАНИЯ ПРИ РЕШЕНИИ РАСЧЕТНЫХ ЗАДАЧ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

---

*Коваль А.Н.*

*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Республика Беларусь*

**Резюме.** Для решения расчетных задач в курсе биохимии студенты медицинского вуза используют готовые алгоритмы, которые можно использовать для создания небольших программ в целях улучшения понимания их действия. Какие при этом использовать парадигмы, языки и платформы программирования? В статье рассматриваются возможные применения языков программирования или элементов программирования. Предполагается, что расширение кругозора студентов после ознакомления с элементами программирования будет способствовать системному пониманию биологической химии.

В современном образовательном процессе в медицинском вузе все большую роль играют информационные технологии (использование электронных учебно-методических пособий, включающих обучающий и проверочный элементы). При этом почти все студенты имеют доступ к современным электронным устройствам (мобильные телефоны, а в последнее время — смартфоны, планшеты, компьютеры), многие студенты знают основы программирования из школьного курса (изучение языка PascalABC.NET [3]) либо после самостоятельного изучения.

В большинстве случаев для проведения несложных расчетов достаточно калькулятора или электронных таблиц, но в ряде случаев применение элементов программирования делает процесс изучения биохимии более наглядным и системным. Несмотря на то что многих преподавателей и студентов пугает сама мысль об изучении какого-либо языка программирования, эти небольшие усилия будут вознаграждены открывшимися новыми возможностями, в том числе перспективой применения полученных знаний в биохимии, биофизике, экологии и в других областях, например, в биоинформатике.

**Биоинформатика** может рассматриваться как комбинация нескольких научных дисциплин, которые включают биологию, биохимию, математику и информатику. Она включает использование компьютерных технологий и статистических методов для управления и анализа огромного объема биологических данных о последовательностях ДНК, РНК и белков, структурах белков, профилях экспрессии генов и взаимодействиях белков [9].

Для этих целей наиболее часто используются языки программирования Java, C#, Perl, C, C++, Python, R; язык разметки — XML; базы данных — SQL, электронные таблицы и др. [1]. В то же время этот набор инструментов постоянно обновляется и пополняется. Например, в биоинформатике, кроме популярных языков Perl и Python, активно используются языки высокого уровня Ruby [6] и Julia [7], а для существующих языков программирования сообщества программистов создаются обширные библиотеки программ, используемых в биоинформатике (Biopython, BioRuby, BioPerl, BioJava, для языка R — Bioconductor).

В области генетики и геномики информатика используется для анализа нуклеотидных и белковых последовательностей, а также для упорядочивания и аннотирования геномов, в том числе и обнаруживаемых мутаций. Программирование незаменимо в таких областях, как ге-

номика, прогнозирование экспрессии генов, структура белка и белок-белковые взаимодействия, моделирование эволюции или моделирование и анализ нейронных систем. Тем не менее в биомедицине и биоинформатике все еще существует множество проблем, которые остро нуждаются в передовых и эффективных вычислительных методологиях для работы с огромными объемами данных [4], поэтому понимание информатики и владение основами программирования для будущих врачей и биологов будет неуклонно возрастать.

**Парадигма в программировании** — способ концептуализации, который определяет, как следует проводить вычисления и как работа, выполняемая компьютером, должна быть структурирована и организована. Известно несколько основных парадигм программирования, важнейшими из которых на данный момент времени являются парадигмы *директивного*, *функционально-логического* и *объектно-ориентированного программирования* [2]. Применение той или иной парадигмы определяется сложностью и системностью поставленной задачи и степенью подготовки исследователя.

Для решения легких задач используются парадигмы директивного и функционально-логического программирования, что предполагает использование отдельных команд и написание повторяющихся элементов кода (функций) или использование уже заранее подготовленных функций в составе обширных библиотек, что существенно ускоряет написание программ.

Большинство расчетных задач в биохимии предполагают использование такой парадигмы. Например, анализ уравнения Михаэлиса-Ментен (в интерпретации Бриггса-Холдейна) позволяет построить функциональный график исходя из переменной (концентрации субстрата) и двух констант ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ), для чего достаточно будет знание электронных таблиц. Для этих целей можно использовать и язык R[5] как первый шаг студентов к изучению программирования.

Дальнейшие шаги в этом направлении можно реализовать с использованием легкого для изучения языка Python [8]:

1) в курсе «Биологическая химия» — для расчета заряда пептидов при различных рН, энергетического выхода окисления основных нутриентов;

2) в курсе «Основы медицинской биохимии» — при расчете индекса массы тела по формуле Кетле, основного обмена (ВОО) по формуле Mafflin-St. Jeor и др.

Парадигма объектно-ориентированного программирования (ООП), основана на выделении классов, описывающих объекты, характеризуемых наличием свойств и методов (функций). Данная парадигма оптимальна для решения сложных задач в области системных наук. Тем не менее принципы ООП могут быть использованы для классификации и систематизации объектов в биологической химии (например, классификация углеводов, липидов, белков и других веществ, а также отдельных реакций в метаболических путях).

**Заключение.** Расчетные задачи в биологической химии могут быть решены разными способами и разными подходами. Преподавателю биохимии рекомендуется иметь представление о наиболее распространенных языках и основных парадигмах программирования. Ознакомление с элементами программирования будет способствовать привлечению внимания, расширению кругозора и системному пониманию биологической химии у студентов.

### Список литературы

1. Интеграционный подход в обучении математике, информатике и биологии / М.А. Кашкарова [и др.] // Проблемы современной науки и образования. — Иваново: Олимп. — 2016. — № 15 (57). — С. 111–113.

2. Роганов, Е.А. Основы информатики и программирования / Е.А. Роганов — М.: МГИУ, 2001. — 299 с.
3. Система программирования PascalABC.NET / Режим доступа: <http://pascalabc.net>. — Дата доступа: 15.06.2020.
4. Computational intelligence in biomedicine and bioinformatics: Current trends and applications / Edited by T.G. Smolinski, M.G. Milanova, A.-E. Hassanien // 2008. — Springer-Verlag Berlin Heidelberg. — 432 p.
5. R: The R Project for Statistical Computing / Режим доступа: <https://www.r-project.org/> — Дата доступа: 29.06.2020.
6. Ruby Programming Language / Режим доступа: <https://www.ruby-lang.org/>. — Дата доступа: 25.06.2020.
7. The Julia Programming Language / Режим доступа: <https://julialang.org/> — Дата доступа: 29.06.2020.
8. Welcome to Python.org / Режим доступа: <https://www.python.org/> — Дата доступа: 30.06.2020.
9. Yi-Ping Phoebe Chen (Ed.) Bioinformatics Technologies / Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. — 396 p.

## PROGRAMMING ELEMENTS IN THE SOLUTION OF CALCULATION PROBLEMS IN BIOLOGICAL CHEMISTRY

---

*Koval A.N.*

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

***Summary.*** *Students of the Medical University use ready-made algorithms to solve calculation problems in biochemistry course that can be used to create small programs in order to improve understanding of their actions. What paradigms, languages and programming platforms should be used? The article discusses possible pedagogical approaches involving the application of the basics of programming or its elements. It is assumed that expanding the horizons of students after familiarizing themselves with the elements of programming will contribute to more thorough understanding of the principles of biological chemistry.*

## РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В РАЗВИТИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ КОЖИ У КРЫС В РАННЕМ ПЕРИОДЕ БЕРЕМЕННОСТИ

---

*Ковальчук-Болбатун Т.В., Смотрин С.М., Гуляй И.Э., Копыцкий А.В.*

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

**Резюме.** В опытах на 54 самках белых беспородных крыс с термическим ожогом кожи в раннем периоде беременности установлено влияние термической травмы на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса. Наблюдалась значительная активация свободнорадикальных процессов в острый период ожоговой травмы, наряду с угнетением механизмов антиоксидантной защиты.

**Введение.** Проблема термических поражений продолжает оставаться одним из сложных и важных разделов экспериментальной и клинической медицины. Особое внимание заслуживают термические повреждения кожного покрова у беременных. Исход беременности при обширных и глубоких ожогах в большинстве случаев неблагоприятен, у 63% женщин происходят выкидыши, мертворождения и преждевременные роды [5]. При таких ожогах возникают значительные сдвиги как в функции, так и в морфологии почти всех органов и систем. В качестве одного из первостепенных факторов патогенеза полиорганной недостаточности при термических ожогах выделяют чрезмерную активацию свободнорадикальных процессов, что в сочетании с истощением антиоксидантной защиты (АОЗ) создает угрозу развития окислительного стресса [1]. Учитывая недостаточное исследование этих процессов у беременных с термическим повреждением, представляется целесообразным изучение свободнорадикальных процессов у беременных крыс с термическим ожогом кожи в эксперименте.

**Материалы и методы исследования.** Экспериментальное исследование проводилось на 54 беременных самках беспородных белых крыс массой 250-350г, которые были разделены на три контрольные и три опытные группы в зависимости от срока выведения животных из эксперимента (по 9 крыс в каждой группе). Согласно Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными ожог наносили после введения тиопентала натрия (внутрибрюшинно, в дозе 50 мг/кг). Методика выполнения экспериментальной травмы предусматривала ожог III степени освобожденной от шерсти кожи спины. Ожог наносили на 3 сутки беременности (первым днем беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках) горячей жидкостью (вода) при температуре 99-100° в течение 15 секунд специально разработанным устройством [4]. В результате воздействия термического агента создавались стандартные по площади (около 12 см<sup>2</sup>) ожоговые раны. Под адекватным наркозом (50-60 мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально) на 3-и, 10-е и 17-е сутки от момента нанесения ожога животные выводились из эксперимента, производился забор крови. Активность свободнорадикальных процессов оценивали по содержанию первичных — диеновые конъюгаты (ДК) и промежуточных - малоновый диальдегид (МДА) продуктов ПОЛ. Уровень ДК в плазме определяли по интенсивности поглощения липидным экстрактом монохроматического све-

тового потока в области спектра 232–234 нм, характерного для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [2]. Оптическую плотность измеряли на спектрофлуориметре СМ 2203 «СОЛАР» (Беларусь) при длине волны 233 нм по отношению к контролю. Концентрацию ДК выражали в  $\Delta D_{233}/\text{мл}$ . Содержание МДА оценивали по взаимодействию с 2'-тио-барбитуровой кислотой (ТБК), которая при нагревании в кислой среде приводит к образованию триметинового комплекса розового цвета [2]. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре РВ1251С «СОЛАР» (Беларусь) при длине волны 535 нм по отношению к контролю. Концентрацию МДА выражали в мкмоль/л. Для определения активности каталазы в плазме использовали метод М. Королюк [3], основанный на спектрофотометрической регистрации количества окрашенного продукта реакции  $\text{H}_2\text{O}_2$  с молибденовокислым аммонием, имеющим максимальное светопоглощение при длине волны 410 нм. Активность каталазы выражали в нмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$  белка. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 ммоль продукта за 1 минуту в условиях испытания. Для определения содержания церулоплазмينا в плазме крови использовали модифицированный метод Равина [2], принцип метода которого основан на окислении р-фенилендамина при участии церулоплазмينا. Концентрацию  $\alpha$ -токоферола и ретинола определяли по методу S.L. Taylor [8], основанному на определении интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 286 нм и испускания 350 нм (для  $\alpha$ -токоферола) и при длине волны возбуждения 325 нм и испускания 470 нм (для ретинола) на спектрофлуориметре СМ 2203 «СОЛАР» (Беларусь). В контрольную пробу вместо исследуемого материала вносили аликвоту бидистиллированной воды, а в стандартную — рабочего раствора, приготовленного из стандартов  $\alpha$ -токоферола и ретинола («Sigma»). Концентрацию  $\alpha$ -токоферола и ретинола в плазме выражали в мкмоль/л. Измерение уровня нитрат/нитритов в плазме проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм с реактивом Грисса [6]. Расчёты выполнялись при помощи функций базового пакета «base» расширения языка программирования «R» [6], специализированного на статистическом анализе. Сравнение показателей между двумя группами проводилось при помощи непараметрического критерия Манна — Уитни.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Состояние прооксидантно-антиоксидантно-го баланса при моделировании термического ожога кожи у беременных крыс через трое суток характеризовалось значительным подъемом концентрации ДК в плазме крови 2,4 (1,8; 2,8),  $p < 0,05$ ,  $\Delta D_{233}/\text{мл}$  в сравнении с контролем 1,3 (1,1; 1,6)  $\Delta D_{233}/\text{мл}$ . Уровень данного первичного продукта ПОЛ оставался увеличенным на 75% ( $p < 0,05$ ) на 10-е сутки и на 67% ( $p < 0,05$ ) на 17-е сутки от момента нанесения ожога. Содержание МДА на 3-и сутки было повышено на 27% ( $p < 0,05$ ), на 10-е - на 44% ( $p < 0,05$ ), но на 17-е сутки от момента получения ожога достоверных различий с контрольной группой не наблюдалось. На фоне возросшей активности процессов перекисного окисления липидов отмечалось значительное угнетение механизмов АОЗ. Так на 3-и сутки после ожога активность каталазы в плазме крови снизилась на 22,4% ( $p < 0,05$ ), на 10-е сутки — на 16,4% ( $p < 0,05$ ), на 17-е сутки — 18,75% ( $p < 0,05$ ). Также наблюдалось снижение концентрации ретинола и  $\alpha$ -токоферола в плазме крови. Через трое суток после создания термической травмы наблюдался значительный подъем концентрации церулоплазмينا 327 (260; 354)  $p < 0,05$  в сравнении с контролем 248 (218; 279) мг/л. Уровень церулоплазмينا постепенно снижался к 10-м суткам и на 17-е сутки достиг уровня контрольных значений. Наиболее выраженный рост концентрации стабильных метаболитов оксида азота отмечался на 3-и сутки после термической травмы (151%,  $p < 0,05$ ) и сохранялся на 10-е сутки (146,5%,  $p < 0,05$ ), на 17-е сутки достоверных различий с контрольной группой не наблюдалось.

**Заключение.** Проведенное исследование у крыс с термическим ожогом кожи в раннем периоде беременности свидетельствует о значительной активации свободнорадикальных процессов в острый период ожоговой травмы (увеличение содержания нитрат/нитритов, ДК и МДА в плазме крови), а также истощении АОЗ (уменьшение активности каталазы и уровня  $\alpha$ -токоферола и ретинола), вследствие чего возникает прооксидантно-антиоксидантный дисбаланс и развивается окислительный стресс.

### Список литературы

1. Диагностика и лечение ожогового шока: клинические рекомендации / А. А. Алексеев [и др.]. — Москва: Общероссийская общ. орг-ция «Объединение комбустиологов «Мир без ожогов», 2014. — 17с.
2. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 томах. Том 1. / В. С. Камышников. 2-е изд. Мн.: Беларусь, 2002. 465 с.
3. Королук, М. А. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. №1. С. 16–19.
4. Устройство для моделирования ожоговой раны у лабораторного животного: пат. 7927 Респ. Беларусь, А.В. Глуткин, Т.В. Ковальчук, В.И. Ковальчук; заявитель Грод. гос. мед. ун-т - № и 20110576; заявл. 15.07.11; опубл. 28.02.12. // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. — 2012. - № 1. — С.256.
5. Шифман, Е.М. Травма во время беременности / Е. М. Шифман, А. В. Пырегов // Медицинский алфавит. Неотложная медицина. - 2010. - Т. 1 №2. - С. 36-38.
6. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction / I. Guevara [et al.] // Clin. Chim. Acta. — 1998. — Vol. 274, №2. — P. 177–188.
7. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Электронный ресурс]: R. — Режим доступа: <https://www.r-project.org/about.html>. — Дата доступа: 10.12.2020.
8. 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.

## THE ROLE OF FREE RADICAL PROCESSES IN THE DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS IN THERMAL BURNS OF THE SKIN IN RATS IN THE EARLY PERIOD OF PREGNANCY

---

*Kovalchuk-Bolbatun T.V., Smotrin S.M., Gulyai I.E., Kapyski A.V.*

*Establishment of Education «Grodno State Medical University», Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *In experiments on 54 female white outbred rats with thermal skin burns in the early period of pregnancy, the effect of thermal injury on the state of the prooxidant-antioxidant balance was established. Significant activation of free radical processes was observed in the acute period of burn injury, along with inhibition of antioxidant defense mechanisms.*

## ОБОСНОВАННОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ПРЕИМУЩЕСТВА МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ

---

*Коденцова В.М., Рисник Д.В.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»,  
г. Москва, Российская Федерация*

**Резюме.** Микронутриенты (витамины и эссенциальные минеральные элементы) в организме тесно связаны между собой в сложные метаболические сети (network), обеспечивая поддержание гомеостаза и здоровья. Множественная микронутриентная недостаточность у населения создает «сеть причинности», причем не одного, а сразу нескольких заболеваний. Максимальную эффективность для поддержания витаминно-минерального статуса организма на оптимальном уровне обеспечит прием не отдельных микронутриентов, а витаминно-минеральных комплексов с полным набором витаминов в дозах, близких к физиологической потребности организма, и кальция, магния, цинка, йода и др.

Для значительной части населения России независимо от места проживания в течение всего года характерен не изолированный недостаток какого-либо одного микронутриента, а множественная микронутриентная недостаточность — одновременная недостаточная обеспеченность организма сразу несколькими витаминами, а также кальцием, магнием, цинком и йодом [1].

Микронутриенты (витамины и эссенциальные минеральные вещества) участвуют в многочисленных биохимических путях, выполняя определенные функции в организме, тесно связаны между собой в сложные метаболические сети (network), обеспечивающие поддержание гомеостаза, включая окислительно-восстановительные, воспалительные пути, гормональную регуляцию и другие виды обмена веществ, результативной функцией которых является поддержание здоровья [14].

«Метаболическая сеть микронутриентов» является отражением того, что все витаминзависимые процессы в организме взаимосвязаны между собой, так как превращение поступившего с пищей любого витамина в свою физиологически или метаболически активную форму происходит при участии ферментов, активность которых, в свою очередь, зависит от обеспеченности другими витаминами и/или минеральными элементами. Известная функциональная взаимосвязь витаминов группы В и развитие вторичных эндогенных, или сопутствующих, дефицитов витаминов группы В [5] является фрагментом этой сети [8, 10].

Необходимым условием осуществления витамином D своих многочисленных, а следовательно, и его некальциемических (внескелетных) функций [6], является полноценная обеспеченность организма всеми витаминами, участвующими в образовании гормонально активной формы витамина D и осуществлении его физиологических функций [7]. К ранее известным минеральным веществам (кальций, марганец, медь, цинк), необходимым для осуществления витамин D-зависимого остеогенеза, не так давно добавился магний, который необходим на стадии магний-зависимого гидроксирования витамина D [9, 13]. При дефиците магния снижается концентрация гидроксированных метаболитов витамина D.

Для проявления биологических эффектов железа необходима, как минимум, адекватная обеспеченность организма десятью другими микронутриентами, среди которых марганец, медь, молибден, хром, йод и витамины С, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub> [3]. Биологические функции йода не реализуются в полной мере не только при недостатке этого микронутриента в пище, но и если дефицит йода сочетан с дефицитами таких микронутриентов, как витамин А, витамины группы В, цинк, селен, медь, железо, что обусловлено их участием в метаболизме йода [4].

Дефицит каждого из микронутриентов является фактором риска развития того или иного заболевания, а одновременная множественная микронутриентная недостаточность создает «сеть причинности», причем не одного, а сразу нескольких заболеваний. И напротив, адекватная или оптимальная обеспеченность организма всеми микронутриентами создает соответственно «сеть условий, обеспечивающих предотвращение заболевания» за счет полноценного осуществления всех зависимых от них процессов в организме. Это означает, что восполнение недостаточного потребления с пищей дефицитных микронутриентов является важным способом поддержания здоровья и долголетия.

Получены доказательства преимущества (на основании анализа данных 17 исследований, включающих 137791 беременных женщин, в 15 из которых группу сравнения составили принимавшие железо и ФК женщины) сочетанного включения витаминов и минеральных веществ в форме ВМК у женщин по сравнению с фолиевой кислотой и железом [7]. Прием беременными женщинами ВМК привел к снижению риска мертворожденных детей на 9 % и снижению риска рождения детей с малым гестационным сроком на 7 %, причем многокомпонентные добавки микронутриентов оказались более эффективными по сравнению с 3–4-компонентными. Использование мультимикронутриентных ВМК по сравнению с добавкой только железа с фолиевой кислотой не только предотвращало анемию у женщин и снижение количества детей с низкой массой тела при рождении, но и уменьшало преждевременные роды, рождение детей с малым гестационным возрастом [12]. Полученные данные, по мнению авторов, обосновывают целесообразность замены саплементации железом и фолиевой кислотой на ВМК, содержащие железо и фолиевую кислоту, особенно в странах, в которых для женщин репродуктивного возраста характерен множественный дефицит микронутриентов [11].

Отсутствие витамина В<sub>2</sub> в ВМК, содержащем 7 витаминов, не привело к улучшению обеспеченности не только этим витамином, но и витамином В<sub>6</sub>, несмотря на его наличие в составе [2]. Это показывает, что результат применения ВМК определяется набором микронутриентов, входящих в его состав.

**Заключение.** Исходя из вышесказанного ясно, что ВМК представляют собой эффективный способ не только устранения дефицита микронутриентов в рационе питания или достижения их адекватного потребления, но и снижения риска различных заболеваний, что, безусловно, требует детального изучения и научного обоснования рационального применения ВМК.

При выборе ВМК следует учитывать факторы, имеющие отношение как непосредственно к организму человека (возраст, физиологическое состояние организма, степень исходного дефицита микронутриентов, наличие патологических состояний, применяемой лекарственной терапии, наличие полиморфизмов), так и к особенностям питания (элиминационные диеты и вегетарианство, приводящие к развитию микронутриентных дефицитов; повышенное потребление пищевых волокон, затрудняющих усвоение витаминов; высокое потребление полиненасыщенных жирных кислот, ухудшающих антиоксидантный статус организма).

ВМК должен содержать полный набор витаминов и основные минеральные вещества, комплементарные существующим дефицитам. Дозы микронутриентов должны быть сопоставимы с возрастными потребностями.

### Список литературы

1. Витаминная обеспеченность взрослого населения Российской Федерации (1987–2017 гг.) / В.М. Коденцова [и др.] // Вопросы питания. — 2018. — Т. 87, № 4. — С. 62–68.
2. Влияние приема комплекса, содержащего 7 витаминов, на обеспеченность витаминами детей / О.А. Вржесинская [и др.] // Вопросы практической педиатрии. — 2018. — Т. 13, № 5. — С. 45–51.
3. Громова, О.А. Анализ молекулярных механизмов воздействия железа (II), меди, марганца в патогенезе железодефицитной анемии [Электронный ресурс] / О.А. Громова, И.Ю. Торшин, А.К. Хаджидис // Клиническая фармакология и фармакоэкономика. — 2010. — № 1. — С. 1–9. — Режим доступа: <https://medi.ru/info/5757/>. — Дата доступа: 22.03.2020.
4. Громова, О. А. Молекулярные синергисты йода: новые подходы к эффективной профилактике и терапии йод-дефицитных заболеваний у беременных / О.А. Громова, И. Ю. Торшин, Н.Г. Кошелева // Русский медицинский журнал. Мать и дитя. — 2011. — Т. 19, № 1. — С. 51–58.
5. Коденцова, В. М. Витаминно-минеральные комплексы. Рациональное применение в терапии [Электронный ресурс] / В. М. Коденцова, Д. В. Рисник // Вестник терапевта. — 2018. — Т. 33, № 9. — Режим доступа: <https://journal.therapy.school/statyi/vitaminno-mineralnye-kompleksy-racionalnoe-primeneniye-v-terapii/>. — Дата доступа: 22.03.2020.
6. Спиричев, В.Б. О биологических эффектах витамина D / В.Б. Спиричев // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. — 2011. — Т. 90, № 6. — С. 113–119.
7. Haider, B.A. Multiple micronutrient supplementation for women during pregnancy [Electronic resource] / B.A. Haider, Z.A. Bhutta // Cochrane database of systematic reviews. — 2017. — №4. — Mode of access: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004905.pub5/full>. — Date of access: 22.03.2020.
8. Kennedy, D.O. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy — a review / D.O. Kennedy // Nutrients. — 2016. — Vol. 8, № 2. — P. 68.
9. Magnesium status and supplementation influence vitamin D status and metabolism: results from a randomized trial / Q. Dai [et al.] // Am. J. Clin. Nutrit. — 2018. — Vol. 108, № 6. — P. 1249–1258.
10. Moretti, R.B Vitamins and Fatty Acids: What do they share with small vessel disease-related dementia? / R. Moretti, C.B. Peinkhofer // Intern. J. Molec. Sci. — 2019. — Vol. 20, № 22. — P. 57–97.
11. Multiple Micronutrient Supplements Are More Cost-effective Than Iron and Folic Acid: Modeling Results from 3 High-Burden Asian Countries / B. Kashi [et al.] // J. Nutrition. — 2019. — Vol. 149, № 7. — P. 1222–1229.
12. Oh, C. Vitamin and mineral supplementation during pregnancy on maternal, birth, child health and development outcomes in low-and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis / C. Oh, E.C. Keats, Z.A. Bhutta // Nutrients. — 2020. — Vol. 12, № 2. — P. 491.
13. Reddy, P. Magnesium supplementation in vitamin D deficiency / P. Reddy, L.R. Edwards // American Journal of Therapeutics. — 2019. — Vol. 26, № 1. — P. 124–132.

14. Sattigere, V. D. Science based regulatory approach for safe nutraceuticals [Electronic resource] / V.D. Sattigere, R.K. Parigi, P. Vish // J. Sci. Food and Agriculture. — 2018. — Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.9381>. — Date of access: 22.03.2020.

15. Wacker, M. Vitamin D — Effects on skeletal and extraskeletal Health and the Need for supplementation / M. Wacker, M. F. Holick // Nutrients. — 2013. — Vol. 5, № 1. — P. 111–148.

## THE VALIDITY OF THE APPLICATION AND ADVANTAGES OF MULTICOMPONENT VITAMIN-MINERAL SUPPLEMENTS

---

*Kodentsova V.M., Risnik D.V.*

*Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety,  
Moscow, Russian Federation*

**Summary.** *Micronutrients (vitamins and essential mineral elements) in the organism are closely interconnected in complex metabolic networks, providing for the maintenance of homeostasis and health. Multiple micronutrient deficiency in the population creates a «causality network» of not just one, but several diseases at once. The maximum effectiveness to maintain the vitamin and mineral status at the optimum level will be ensured by the intake of not individual micronutrients, but vitamin and mineral supplements with a full range of vitamins at doses, close to the physiological needs of the body, and calcium, magnesium, zinc, iodine, etc.*

## ВЛИЯНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ НАД-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ТКАНЯХ КРЫС

*Кокошкина О.А., Запорожченко А.В.*

*Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,  
Одесса, Украина*

**Резюме.** Крысам внутримышечно вводили никотиновую кислоту в дозе 10 мг на 1 кг массы. Через 30, 60, 120, 240 мин, 24 ч, 3 суток и 15 суток определяли в крови, печени, почках, мозге и тонком кишечнике активность лактат-, малат- и алкогольдегидрогеназ. Применение никотиновой кислоты способствовало активации лактатдегидрогеназы в печени, малатдегидрогеназы в мозге и тонком кишечнике, алкогольдегидрогеназы в крови, печени и почках, а в тонком кишечнике активность повышалась через 60 мин по отношению к интактным животным.

**Введение.** Большое число дегидрогеназ, катализирующих важные процессы метаболизма в живом организме, содержат в качестве кофермента НАД и НАДФ. Это ферменты гликолиза, цикла Кребса, пентозофосфатного пути и т. п. [1, 3, 4, 6].

Синтез и окисление жирных кислот тоже зависит от никотинамидных коферментов. Дефицит никотинамида или нарушения в биосинтезе никотинамидных коферментов приводят к непосредственным изменениям этих метаболических процессов. Так, снижение уровня НАДФН может являться причиной снижения ресинтеза жирных кислот и фосфолипидов, который требует в качестве источника восстановленные эквиваленты НАДФН [3, 4].

Витамины, в том числе и никотиновая кислота в составе фармакологических препаратов, влияют на активность различных дегидрогеназ, нарушение активности которых может иметь сложные последствия. Следует отметить, что оценка их активности в органах, тканях и жидкостях организма — важный элемент информации о состоянии метаболических систем организма [5, 6, 7, 8].

Цель: исследование влияния никотиновой кислоты на активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в тканях крыс на ранних и поздних сроках наблюдения.

**Материалы и методы исследований.** Исследования на животных проводились с соблюдением «Общих этических принципов экспериментов на животных», которые одобрены 3-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007 г.) и в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1986 г.).

Исследования проведены на 48 крысах линии Вистар, самцах массой 180–200 г. Животным подопытных групп, исключая контрольную (интактные животные — срок 0 мин), внутримышечно вводили никотиновую кислоту в дозе 10 мг/кг массы. Через 30 мин (1-я группа), 60 мин (2-я группа), 120 мин (3-я группа), 240 мин (4-я группа), 24 ч (5-я группа), 3 суток (6-я группа) и 15 суток (7-я группа) крыс выводили из эксперимента с помощью декапитации под действием тиопенталового наркоза. Количество животных в каждой группе составляло 6 животных. В крови, печени, почках, мозге и тонком кишечнике спектрофотометрически определяли активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы.

Метод определения активности лактатдегидрогеназы в присутствии пирувата основывается на спектрофотометрическом определении скорости окисления восстановленного НАД, имеющего максимум поглощения при 340 нм.

Метод определения активности малатдегидрогеназы основывается на реакции, в которой количество окисленного малата эквиволярно количеству восстановленного пиридиннуклеотида, а скорость изменения уровня восстановленного НАД регистрировали при длине волны 340 нм.

Принцип метода определения активности алкогольдегидрогеназы основывается на том, что в прямой алкогольдегидрогеназной реакции количество окисленного субстрата эквиволярно количеству образованного восстановленного НАД, который имеет максимум поглощения при длине волны 340 нм.

Принцип метода определения содержания общего белка (по Lowry) заключается в способности медных производных белка восстанавливать реактив Фолина с образованием окрашенных продуктов реакции. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе.

Полученные данные обрабатывали с помощью непараметрического метода — критерия Манна-Уитни, используя компьютерную программу «Statistica». Для визуализации данных использовали описательную статистику [2].

**Результаты исследования и их обсуждение.** Исследование активности лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в тканях крыс после введения никотиновой кислоты свидетельствует о том, что активность указанных ферментов изменяется в зависимости от ткани и срока наблюдения. Активность лактатдегидрогеназы после введения витамина РР в крови крыс существенно не меняется на протяжении всех сроков эксперимента относительно интактной группы животных (табл. 1).

**Таблица 1 — Активность лактатдегидрогеназы в тканях крыс при введении никотиновой кислоты (нкат на 1 мг белка)**

Ткани	Сроки (по группам 0–7)	М ± m	Медиана	± 95 % границы		Уровень значимости
Кровь	0 мин	22,63 ± 1,50	22,32	18,77	26,49	p > 0,05
	30 мин	27,73 ± 2,72	27,91	20,74	34,71	
	60 мин	22,73 ± 1,64	23,24	18,51	26,96	
	120 мин	28,90 ± 2,37	29,74	22,80	35,00	
	240 мин	27,50 ± 2,90	30,35	20,05	34,95	
	24 часа	22,35 ± 3,05	21,34	14,51	30,19	
	3 суток	25,64 ± 4,00	24,08	15,35	35,92	
	15 суток	22,62 ± 2,89	22,55	15,18	30,06	
Печень	0 мин	85,48 ± 4,23	81,46	74,61	96,36	p <sub>0–3,6</sub> < 0,04 p <sub>ост. гр.</sub> > 0,05
	30 мин	96,39 ± 6,34	99,65	80,10	112,68	
	60 мин	89,42 ± 12,17	87,29	58,14	120,70	
	120 мин	102,82 ± 4,66	105,49	90,84	114,81	
	240 мин	98,80 ± 3,72	98,47	89,23	108,37	
	24 часа	94,54 ± 6,24	99,86	78,50	110,57	
	3 суток	107,01 ± 7,23	105,56	88,43	125,60	
	15 суток	100,19 ± 7,15	94,72	81,80	118,57	
Почки	0 мин	39,29 ± 1,71	39,94	34,90	43,67	p <sub>0–6</sub> < 0,03 p <sub>1–6</sub> < 0,04 p <sub>2–6</sub> < 0,04 p <sub>5–6</sub> < 0,02 p <sub>ост. гр.</sub> > 0,05
	30 мин	39,58 ± 1,65	41,67	35,35	43,82	
	60 мин	38,91 ± 1,50	38,21	35,07	42,75	
	120 мин	41,71 ± 3,65	40,12	32,31	51,10	
	240 мин	40,40 ± 2,78	38,33	33,24	47,55	
	24 часа	38,13 ± 1,77	36,49	33,58	42,69	
	3 суток	45,20 ± 1,48	46,25	41,39	49,00	
	15 суток	39,70 ± 2,33	39,82	33,71	45,70	
Мозг	0 мин	17,41 ± 2,10	16,26	12,01	22,80	P > 0,05
	30 мин	17,14 ± 2,04	15,51	11,90	22,37	

Ткани	Сроки (по группам 0–7)	M ± m	Медиана	± 95 % границы		Уровень значимости
	60 мин	17,77 ± 2,21	17,88	12,09	23,46	
	120 мин	17,56 ± 1,29	16,97	14,25	20,87	
	240 мин	15,29 ± 1,12	14,90	12,40	18,17	
	24 часа	18,25 ± 1,39	17,68	14,67	21,83	
	3 суток	18,73 ± 4,06	19,95	8,29	29,17	
	15 суток	21,12 ± 5,50	18,38	6,99	35,25	
Тонкий кишечник	0 мин	99,01 ± 8,16	97,90	78,04	119,99	p <sub>0-3,4,7</sub> < 0,004 p <sub>0-5</sub> < 0,02 p <sub>0-6</sub> < 0,01 p <sub>1-3,4,7</sub> < 0,004 p <sub>1-5,6</sub> < 0,01 p <sub>ост.гр.</sub> > 0,05
	30 мин	90,81 ± 4,34	89,25	79,66	101,96	
	60 мин	71,99 ± 16,87	63,01	28,63	115,34	
	120 мин	45,07 ± 4,84	45,64	32,62	57,52	
	240 мин	47,98 ± 2,37	50,00	41,88	54,07	
	24 часа	59,55 ± 5,33	55,37	45,85	73,26	
	3 суток	49,64 ± 8,31	43,77	1,84	4,56	
	15 суток	57,17 ± 3,78	60,5	28,27	71,01	

В печени крыс активность фермента достигала максимального значения через 120 мин (120 %) и на 3 сутки (125 %) после введения никотиновой кислоты. В почках, вероятно, активация лактатдегидрогеназы никотиновой кислотой была обнаружена только на 3 сутки (115 %) относительно интактных животных и по отношению к срокам 30 мин, 60 мин и 24 ч.

В мозгу крыс существенных изменений активности лактатдегидрогеназы не наблюдали. Для тонкого кишечника, в отличие от других тканей, характерно достоверное снижение активности лактатдегидрогеназы на сроках, начиная через 120 мин после введения никотиновой кислоты как относительно контроля (0 мин), так и до срока 30 мин.

Активность малатдегидрогеназы в крови и почках крыс менялась в зависимости от органа на всех сроках наблюдения (табл. 2). В печени через 120 мин после введения никотиновой кислоты активность фермента была достоверно снижена как относительно контроля (75 %), так и по отношению к срокам — 240 мин и 3 суток. При условии введения никотиновой кислоты активность малатдегидрогеназы в мозге существенно повышалась почти на всех сроках наблюдения — до 123 % и 128 % через 60 и 120 мин, до 141 % и 143 % через 240 мин и 15 суток эксперимента соответственно по отношению к интактным животным ( $p < 0,05$ ). Указанные изменения были достоверно повышены также и при сравнении сроков от 120 мин до 15 суток включительно в отношении 30 мин. Изменения активности малатдегидрогеназы в мозге также имеют достоверные различия при сравнении сроков — 3 сутки относительно 240 мин. В тонком кишечнике активность фермента имела тенденцию к повышению через 60 мин и снижению на 3 и 15 сутки эксперимента. Через 240 мин после введения никотиновой кислоты активность малатдегидрогеназы составляла 134 % по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2 — Активность малатдегидрогеназы в тканях крыс при введении никотиновой кислоты (нкат на 1 мг белка)**

Ткани	Сроки (по группам 0–7)	M ± m	Медиана	± 95 % границы		Уровень значимости
Кровь	0 мин	59,28 ± 3,08	57,65	51,37	67,18	p > 0,05
	30 мин	58,66 ± 3,25	61,85	50,32	67,01	
	60 мин	61,19 ± 5,19	60,02	47,84	74,54	
	120 мин	67,99 ± 8,23	63,30	46,84	89,14	
	240 мин	67,25 ± 13,01	70,34	33,81	100,69	
	24 часа	62,46 ± 4,32	61,16	51,36	73,56	

Ткани	Сроки (по группам 0–7)	M ± m	Медиана	± 95 % границы		Уровень значимости
	3 суток	52,65 ± 5,37	49,08	38,84	66,46	
	15 суток	56,12 ± 3,66	58,03	46,72	65,51	
Печень	0 мин	195,23 ± 13,52	198,40	160,49	229,98	p <sub>0-3</sub> < 0,03 p <sub>3-4</sub> < 0,02 p <sub>3-6</sub> < 0,05 p <sub>ост.гр.</sub> > 0,05
	30 мин	188,52 ± 14,61	180,14	150,96	226,08	
	60 мин	184,24 ± 12,24	180,90	152,78	215,69	
	120 мин	146,27 ± 11,84	150,49	115,84	176,71	
	240 мин	189,19 ± 5,65	191,67	174,68	203,70	
	24 часа	177,20 ± 10,56	176,94	150,06	204,34	
	3 суток	185,76 ± 8,33	178,33	164,36	207,17	
	15 суток	178,66 ± 9,88	176,46	153,27	204,05	
Почки	0 мин	90,77 ± 3,42	87,98	81,97	99,58	p > 0,05
	30 мин	89,82 ± 4,04	91,31	79,43	100,21	
	60 мин	86,85 ± 6,59	87,02	69,90	103,79	
	120 мин	79,96 ± 6,74	73,27	62,63	97,29	
	240 мин	96,17 ± 7,01	99,35	78,15	114,19	
	24 часа	89,07 ± 2,71	86,37	82,10	96,04	
	3 суток	81,01 ± 6,01	81,61	65,57	96,46	
	15 суток	86,21 ± 7,22	91,37	67,66	104,76	
Мозг	0 мин	78,47 ± 3,61	81,11	69,18	87,75	p <sub>0-2</sub> < 0,04 p <sub>0-3,4,7</sub> < 0,01 p <sub>0-5</sub> < 0,02 p <sub>1-3,5,6</sub> < 0,05 p <sub>1-4,7</sub> < 0,02 p <sub>4-6</sub> < 0,05 p <sub>ост.гр.</sub> > 0,05
	30 мин	76,45 ± 7,19	77,32	57,98	94,92	
	60 мин	96,62 ± 5,34	98,64	82,88	110,35	
	120 мин	100,08 ± 4,40	97,27	88,78	111,39	
	240 мин	111,01 ± 6,28	113,48	94,87	127,15	
	24 часа	100,29 ± 5,34	101,31	86,56	114,01	
	3 суток	90,66 ± 5,67	90,81	76,07	105,24	
	15 суток	112,22 ± 10,16	105,81	86,11	138,33	
Тонкий кишечник	0 мин	155,53 ± 8,18	152,02	134,51	176,55	p <sub>0-4</sub> < 0,02 p <sub>1-3,4</sub> < 0,05 p <sub>4-6,7</sub> < 0,04 p <sub>ост.гр.</sub> > 0,05
	30 мин	153,30 ± 4,93	150,00	140,63	165,97	
	60 мин	169,26 ± 13,56	167,83	134,39	204,13	
	120 мин	183,00 ± 11,21	187,54	154,19	211,80	
	240 мин	208,28 ± 22,03	188,40	151,64	264,92	
	24 часа	184,06 ± 15,73	172,90	143,62	224,50	
	3 суток	159,58 ± 7,57	151,22	140,12	179,04	
	15 суток	139,93 ± 15,59	130,45	99,86	180,00	

В отличие от лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы активность алкогольдегидрогеназы в крови крыс, подлежащих введению никотиновой кислоты, достоверно повышалась в сроки — 60 мин (154 %), 24 ч (146 %) и уменьшалась на 3 суток (75 %) и 15 суток (74 %) относительно контрольной группы (табл. 3).

В печени и тонком кишечнике крыс активность алкогольдегидрогеназы через 60 мин после введения никотиновой кислоты повышалась до 122 % и 134 % соответственно, а через 240 мин, на 3 и 15 суток существенно уменьшалась по отношению к интактным животным ( $p < 0,05$ ).

Для почек характерно значительное и достоверное возрастание активности указанного фермента через 60 мин (142 %) и 24 ч (144 %) в группах крыс, получавших никотиновую кислоту относительно контроля.

В мозге подопытных животных под влиянием никотиновой кислоты наблюдали снижение активности фермента на всех сроках наблюдения по отношению к контролю (30 мин — 76 %, 240 мин — 69 %, 24 ч — 82 %, 15 суток — 62 %,  $p < 0,05$ ).

Значительные колебания активности алкогольдегидрогеназы во всех исследуемых тканях в течение эксперимента обусловили высокую степень достоверности изменений активности фермента при сравнении результатов, полученных на разных сроках, между собой.

Суммируя полученные результаты следует отметить, что внутримышечное введение никотиновой кислоты в дозе 10 мг/кг массы может существенно влиять на активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в исследованных тканях крыс как на ранних, так и на поздних сроках эксперимента, исключая такие ткани, как кровь и мозг (в случае лактатдегидрогеназы), а также кровь и почки (в случае малатдегидрогеназы).

**Таблица 3 — Активность алкогольдегидрогеназы в тканях крыс при введении никотиновой кислоты (нкат на 1 мг белка)**

Ткани	Сроки (по группам 0–7)	М ± m	Медиана	± 95 % границы		Уровень значимости
Кровь	0 мин	140,42 ± 5,88	144,80	125,32	155,52	$p_{0-2,5,7} < 0,004$
	30 мин	162,08 ± 16,77	154,89	118,96	205,20	$p_{0-6} < 0,02$
	60 мин	215,93 ± 13,46	217,28	181,32	250,53	$p_{1-2,6,7} < 0,03$
	120 мин	163,79 ± 13,82	160,40	128,26	199,32	$p_{2-3,4,6,7} < 0,03$
	240 мин	145,03 ± 6,84	142,81	127,45	162,61	$p_{3-5-7} < 0,01$
	24 часа	203,59 ± 6,16	207,72	187,77	219,42	$p_{4-5-7} < 0,02$
	3 суток	106,01 ± 7,22	98,85	87,44	124,58	$p_{5-6,7} < 0,004$
	15 суток	103,62 ± 6,13	102,83	87,85	119,39	$p_{\text{ост.гр.}} > 0,05$
Печень	0 мин	326,27 ± 12,72	320,97	293,57	358,98	$p_{0-2,4,6} < 0,04$
	30 мин	325,02 ± 8,89	320,97	302,17	347,88	$p_{0-7} < 0,004$
	60 мин	396,53 ± 19,20	391,88	347,17	445,89	$p_{1-2,4,7} < 0,03$
	120 мин	296,25 ± 15,17	305,00	257,26	335,24	$p_{2-3,4-7} < 0,02$
	240 мин	264,28 ± 15,59	258,19	224,20	304,36	$p_{3-7} < 0,04$
	24 часа	324,38 ± 13,95	315,83	288,53	360,22	$p_{4-5} < 0,02$
	3 суток	272,45 ± 21,12	260,69	218,17	326,74	$p_{5-6,7} < 0,04$
	15 суток	242,08 ± 10,90	234,93	214,05	270,11	$p_{\text{ост.гр.}} > 0,05$
Почки	0 мин	137,52 ± 8,50	140,77	115,68	159,36	$p_{0-2,5} < 0,004$
	30 мин	135,12 ± 15,16	133,87	96,14	174,09	$p_{1-2,5} < 0,02$
	60 мин	195,44 ± 9,74	192,62	170,40	220,47	$p_{2-3,4,6,7} < 0,01$
	120 мин	150,75 ± 8,40	156,67	129,17	172,34	$p_{3-5} < 0,004$
	240 мин	144,27 ± 7,45	149,05	125,11	163,42	$p_{4-5} < 0,004$
	24 часа	198,33 ± 5,62	196,61	183,89	212,78	$p_{5-6,7} < 0,004$
	3 суток	137,38 ± 5,50	141,43	123,24	151,52	$p_{\text{ост.гр.}} > 0,05$
	15 суток	128,00 ± 7,31	132,74	109,21	146,78	
Мозг	0 мин	42,00 ± 2,56	42,93	35,44	48,57	$p_{0-1} < 0,05$
	30 мин	32,15 ± 3,25	35,71	23,80	40,51	$p_{0-4,7} < 0,01$
	60 мин	33,37 ± 4,62	33,08	21,48	45,25	$p_{0-5} < 0,04$
	120 мин	36,55 ± 3,21	35,86	28,31	44,79	$p_{3-7} < 0,05$
	240 мин	29,16 ± 1,94	29,49	24,17	34,14	$p_{\text{ост.гр.}} > 0,05$
	24 часа	33,03 ± 2,03	32,42	27,81	38,25	
	3 суток	34,60 ± 2,72	36,82	27,61	41,59	
	15 суток	25,89 ± 2,84	27,73	18,59	33,19	
Тонкий кишечник	0 мин	203,45 ± 9,37	202,26	179,37	227,54	$p_{0-2,7} < 0,02$
	30 мин	207,50 ± 12,89	205,53	174,37	240,63	$p_{0-4,6} < 0,004$
	60 мин	271,94 ± 14,97	286,68	233,44	310,43	$p_{1-4,6,7} < 0,01$
	120 мин	192,89 ± 15,39	182,48	153,33	232,45	$p_{2-3,4,6,7} < 0,02$
	240 мин	133,39 ± 5,58	132,94	119,05	147,72	$p_{3-4,6,7} < 0,03$
	24 часа	226,22 ± 19,51	215,34	176,07	276,37	$p_{4-5,6} < 0,004$
	3 суток	150,68 ± 6,60	152,10	133,72	167,63	$p_{5-6,7} < 0,01$
	15 суток	132,06 ± 10,81	126,09	104,26	159,86	$p_{\text{ост.гр.}} > 0,05$

Следует также отметить, что значительные изменения активности исследуемых НАД-зависимых ферментов в различных тканях могут быть обусловлены не только особенностями фармакодинамики и кинетики никотиновой кислоты как предшественника НАД, но и прочностью связи между этими ферментами и коферментом НАД.

### **Выводы**

1. Выявлено существенное повышение активности лактатдегидрогеназы в печени крыс на начальных сроках и снижение активности фермента в тонком кишечнике на всех сроках наблюдения после введения никотиновой кислоты по отношению к интактным животным.

2. Применение никотиновой кислоты способствовало активации малатдегидрогеназы в мозге и тонком кишечнике на фоне снижения активности фермента в печени крыс на начальных сроках эксперимента.

3. Введение никотиновой кислоты вызвало значительное повышение активности алкогольдегидрогеназы в крови, печени и почках, а также снижение активности фермента в мозге крыс на начальных сроках по отношению к интактным животным. Для тонкого кишечника характерно повышение активности через 60 мин и существенное снижение через 240 мин после инъекции никотиновой кислоты.

### **Список литературы**

1. Биохимия человека : в 2 т. / В. Марри [и др.] : под ред. Л.М. Гиноман. — Т. 1. — М. : Мир, 2004. — 381 с.

2. Боровиков, В. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов / В. Боровиков. — Санкт-Петербург : Питер, 2001. — 656 с.

3. Розанов, А.Я. Механизмы регуляции биокатализа / А.Я. Розанов. — Киев : Вища школа, 1989. — 240 с.

4. Розанов, А.Я. Ферментативные процессы и их коррекция при экстремальных состояниях / А.Я. Розанов, А.И. Трещинский, Ю.В. Хмелевский. — Киев : Здоров'я. — 1989. — 240 с.

5. Роль гиперлактатдегидрогеназемии в индукции метаболических нарушений в организме / Ф. Н. Гильмиярова [и др.] // Вопр. мед. химии. — 2001. — Т. 47, вып. 5. — С. 137–142.

6. Фридрих, П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы / П. Фридрих. — М. : Мир. — 1986. — 374 с.

7. Bell, J.K. Structural Analyses of a Malate Dehydrogenase with a Variable Active Site / J.K. Bell, H.P. Yennawar, S. Kirk // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276, № 33. — P. 31156–31162.

8. Substrate channeling in glycolysis: A phantom phenomenon / Xiaomao Wu [et al.] // J. Proc. Nat. Acad. Sci USA. — 1991. — Vol. 88, № 2. — P. 497–501.

## **EFFECT OF NICOTINIC ACID ON THE ACTIVITY OF NAD-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN RAT TISSUES**

*Kokoshkina O.A., Zaporozhchenko A.V.*

*Odessa National University I.I. Mechnikov, Odessa, Ukraine*

**Summary.** Rats were injected intramuscularly with nicotinic acid at a dose of 10 mg/kg body weight. After 30, 60, 120, 240 minutes, 24 hours, 3 and 15 days, the activity of lactate-, malate- and alcohol dehydrogenases was determined in the blood, liver, kidneys, brain and small intestine. The use of nicotinic acid promoted the activation of lactate dehydrogenase in the liver, malate dehydrogenase in the brain and small intestine, alcohol dehydrogenase in the blood, liver and kidneys, and in the small intestine the activity increased after 60 min in relation to intact animals.

## СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МОНОАМИНОВ В КРОВИ СТУДЕНТОК ПРИ АДАПТАЦИИ К ОБУЧЕНИЮ В ВУЗЕ

---

*Колмакова Т.С., Беликова Е.А.*

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

**Резюме.** Данное исследование проведено с участием 254 первокурсниц педагогического направления ФГБОУ ВО «ЮФУ» с целью изучения содержания регуляторных моноаминов в крови во время адаптации к обучению в вузе.

Результаты показали разнонаправленные изменения изучаемых показателей в зависимости от преобладающего тонуса ВНС у девушек при удовлетворительном и неудовлетворительном течении адаптации.

**Введение.** Современное студенчество представляет собой большую социальную группу, основу которой составляют молодые люди в возрасте от 18 до 25 лет, при этом большинство из них поступает в вуз сразу после школы. По данным Росстата, в 2019–2020 учебном году в России насчитывалось около 4 млн студентов вузов. Нынешнее поколение студентов, родившихся после 1995 г., отличается «клиповым» мышлением. Молодые люди способны быстро перерабатывать информацию, но в малых объемах, что связано с возможностями цифрового пространства. Воздействие виртуального пространства привело к тому, что современные студенты менее коммуникабельны, чем старшие поколения. Все это осложняет процесс адаптации студентов к условиям обучения в вузе, которое сильно отличается от школьной системы образования уже с первого курса. В связи с этим процесс обучения на младших курсах в вузах, быстрое накопление знаний и развитие интеллектуально-эмоциональной сферы становится фактором риска для здоровья студентов.

Кроме того, сохраняются трудности, с которыми сталкиваются все поколения студентов. В первую очередь это перегрузки за счет большого объема информации, получаемой при изучении многочисленных учебных предметов, научный уровень которых все время возрастает. По академическим нормам в вузах нашей страны учебная загруженность студентов должна составлять 36 ч в неделю, но в действительности она часто достигает 40–42 ч. Рабочий день студентов на первых курсах длится в среднем 10 ч, на самостоятельную работу приходится 3–4 ч, учебные задания выполняются по вечерам и выходным дням, время ночного сна не более 6–7 ч в сутки. Остается и стрессогенный фактор, проявляющийся особенно ярко в период экзаменационной сессии.

При адаптации студентов к условиям информационных перегрузок задействованы в основном центральная нервная система и вегетативная сфера.

Известно, что при адаптации к любого рода нагрузкам важную роль играют симпато-адреналовая и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая системы. По степени их активности можно судить об адаптивных процессах в организме. В отличие от других отделов эндокринной системы симпато-адреналовая активизируется наиболее быстро, выделение катехоламинов при состоянии напряжения организма происходит активно. Существует мнение, что именно повышенное выделение катехоламинов и их воздействие на гипоталамус приводят к активации

системы «гипофиз — кора надпочечников» [2]. Наряду с гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой важная роль принадлежит также биогенным аминам трофотропного ряда. Последние, в том числе и серотонин, обладают широким диапазоном физиологического воздействия на организм. Имеются данные, что серотонин способствует улучшению процесса обучения, фиксирует временные связи [5].

На основании изложенного выше в настоящей работе проведено изучение содержания биогенных аминов в крови студенток 1-го курса с разным уровнем адаптации к условиям обучения в вузе.

**Материалы и методы исследования.** В исследовании приняли участие 254 студентки 1-го курса ФГБОУ ВО «ЮФУ», из числа которых для изучения содержания моноаминов в крови было отобрано 75 девушек в возрасте 16–19 лет при добровольном согласии.

В конце первого семестра начала обучения в вузе по результатам самооценки состояния здоровья (анкетирование), уровня тревожности (анкета Ч.Д. Спилбергер — Ю.Л. Ханин) и психофизиологической характеристики адаптационных реакций организма (опросник Л.Х. Гаркави с соавт., 1998 г.) девушки были разделены на две группы: I группа — с удовлетворительным течением адаптации, II группа — с неудовлетворительным течением адаптации. Внутри каждой группы с учетом асимметрии ВНС (индекс Кердо, дерматопроба) было выделено по 3 подгруппы — СТ (повышенный симпатический тонус), ВТ (повышенный ваготонический тонус), НТ (нормотония).

Забор крови для определения содержания моноаминов: норадреналина (НА), дофамина (ДА), серотонина (5-ОТ и гистамина (Г) осуществлялся в межвузовской поликлинике г. Ростова-на-Дону утром с 8:00 до 9:00.

В качестве группы сравнения использовали показатели девушек с удовлетворительным течением адаптации (НТ).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Результаты проведенного анкетирования показали, что 45 % первокурсниц к концу обучения в первом семестре имеют признаки неудовлетворительного течения адаптации к условиям обучения в вузе. В первую очередь это жалобы на нарушение функций пищеварения, головные боли, частые простудные и респираторные заболевания.

Психофизиологическими показателями неудовлетворительного течения адаптации служили высокий уровень тревожности, низкое качество сна, изменение пищевого поведения как в сторону снижения приема пищи, так и повышения, не подкрепленное чувством голода. Кроме того, важными признаками нарушения адаптационных процессов служит низкая работоспособность и высокая утомляемость, угнетенность и раздражительность, вплоть до агрессии.

Определение содержания регуляторных моноаминов в крови студенток показало некоторые различия, отражающие не только закономерную разницу, связанную с вегетативной асимметрией, но и в зависимости от уровня течения адаптации (табл. 1).

**Таблица 1 — Содержание моноаминов в крови студенток с разным уровнем адаптации к обучению в вузе (мкг/л)**

Показатель	I группа			II группа		
	НТ	ВТ	СТ	НТ	ВТ	СТ
НА	0,94 ± 0,03	1,06 ± 0,10	1,04 ± 0,02	0,75 ± 0,04*	0,6 ± 0,03 ***	0,88 ± 0,02**
ДА	1,74 ± 0,06	1,5 ± 0,09	1,86 ± 0,10	1,46 ± 0,84*	2,75 ± 0,99***	1,23 ± 0,07***
Серотонин	22,0 ± 2,0	19,49 ± 1,9	22,0 ± 2,0	23,61 ± 2,2	23,03 ± 2,1	24,71 ± 1,9
Гистамин	35,43 ± 5,6	21,01 ± 3,0*	33,03 ± 2,3	44,88 ± 3,0*	32,53 ± 2,2**	35,63 ± 3,0

*Примечание:* \* Обозначены изменение значимых по сравнению с группой контроля. \*\* Обозначены значимые изменения по сравнению с показателями I группы, соответствующей подгруппы.

Полученные результаты показали, что при удовлетворительном течении адаптации к условиям обучения в вузе, содержание НА в крови в состоянии покоя у испытуемых с разным вегетативным тонусом практически не отличалось.

У студенток с неудовлетворительным течением адаптации были установлены отличия, как по сравнению с показателями у студенток I группы, так и внутри своей группы, в зависимости от вегетативного тонуса. Однако при всех видах вегетативного статуса заметно более низкое содержание НА в крови при неудовлетворительной адаптации. Так, у студенток НТ II группы содержание НА ниже, чем в группе сравнения на 21 %. У девушек этой группы с ВТ содержание НА ниже, чем в группе сравнения на 36 %, и на 43 % ниже, чем у девушек I группы, имеющих ваготоническую асимметрию. У первокурсниц с выраженным симпатическим тонусом при неудовлетворительной адаптации уровень медиатора был ниже, чем в соответствующей группе с удовлетворительной адаптацией.

Таким образом, снижение уровня НА объясняет неудовлетворительную адаптацию студенток II группы. Известно, что как нейромедиатор НА стимулирует производства адреналина в организме, что способствует бодрствованию, улучшает поведенческие реакции. К числу психофизиологических эффектов НА относятся повышение внимания, а также внешней и внутренней мотивации для активного действия, что очень важно для успешного обучения в вузе [5].

В группе с удовлетворительным течением адаптации (I группа) содержание ДА в крови испытуемых практически не отличалось и не зависело от вегетативного тонуса. Изменение содержания ДА в крови девушек II группы с разным вегетативным тонусом в состоянии покоя было разнонаправленным по сравнению с группой сравнения.

При нормотонии уровень моноамина был ниже на 16 % по сравнению с группой контроля. Более значительное снижение нейромедиатора отмечалось у обследуемых 2 группы с преобладанием симпатической регуляции — на 34 %. У испытуемых с ваготоническим профилем, напротив, уровень этого моноамина был в 1,5 раза выше, чем в группе сравнения.

На уровне регуляции систем жизнеобеспечения (в первую очередь, сердечно-сосудистой системы) ДА обладает эффектами, близкими к эффектам НА, но менее выраженными. Однако когда речь идет о сложном комплексе адаптационных процессов, включающих психоэмоциональные компоненты, ДА и НА рассматриваются как синергисты и ДА поддерживает эффекты НА, связанные с мотивацией и достижением поставленной цели [4].

Следовательно, снижение содержания НА и ДА у девушек с неудовлетворительной адаптацией, возможно, объясняет низкую работоспособность, угнетенность и раздражительность. Отдельно следует рассмотреть изменение содержания обоих моноаминов в крови студенток II группы, имеющих ваготонический профиль. В этой группе отмечается самое значительное снижение уровня НА и заметное повышение содержания ДА в крови по сравнению с группой сравнения. Очевидно, повышение уровня ДА носит адаптационно-компенсаторный характер. За счет повышения уровня ДА поддерживаются, в первую очередь, основные физиологические показатели систем жизнеобеспечения, в том числе и ССС, и в меньшей степени проявляются на психоэмоциональном уровне.

Полученные нами результаты позволяют сделать предположение, что адаптационные процессы формируются преимущественно за счет напряжения систем жизнеобеспечения, а психофизиологические проявления отражают адаптационный потенциал организма в целом. На это указывает отсутствие различий содержания серотонина в крови студенток всех исследуемых групп — как с удовлетворительной, так и неудовлетворительной адаптацией [4].

Обращает внимание разное содержание гистамина в крови студенток I и II групп, а также значительное отличие его уровня у девушек с преобладанием ВТ.

Так, в первой группе обследуемых уровень гистамина одинаковый у студенток НТ и ВТ, тогда как при ваготонической асимметрии содержание моноамина ниже на 40 %, чем в подгруппе НТ. У студенток II группы ВТ содержание гистамина ниже, чем у НТ на 29 %. Возможно, это объясняется влиянием гистамина на сосуды. Известно, что при ваготонии тонус сосудов снижается, гистамин обладает также гипотензивным эффектом, поэтому снижение уровня моноамина при преобладании ваготонической регуляции можно рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на поддержание тонуса сосудов, обеспечивающих кровоснабжение органов — артериол и венул.

С другой стороны, содержание гистамина значительно выше у студенток II группы НТ и ВТ, по сравнению с I группой. Возможно, повышение содержания гистамина в крови студенток II группы является проявлением напряжения систем адаптации. Повышение содержания гистамина может улучшать локальное кровоснабжение органов и обеспечение их кислородом за счет расширения капилляров и повышения их проницаемости. Известны центральные эффекты моноамина, направленные на поддержание режима бодрствования мозга. Вместе с тем повышение содержания гистамина может иметь и отрицательные последствия для здоровья. Так, жалобы студентов на работу пищеварительной системы и частые респираторные заболевания могут быть следствием увеличения кислотности желудочного сока, повышения тонуса гладкой мускулатуры кишечника и бронхов [3].

**Заключение.** Таким образом, можно полагать, что неудовлетворительное течение адаптации к условиям обучения в вузе в большей степени определено низким адаптационным потенциалом систем жизнеобеспечения. При этом симпатическая регуляция способствует формированию адекватных адаптивных процессов. При ослаблении симпатической регуляции энергетическое обеспечение органов становится недостаточным, а следовательно, снижается не только физическая активность, но и падает мотивация, работоспособность. Это объясняет тот факт, что при неудовлетворительной адаптации студенток ВТ содержание регуляторных моноаминов значительно отличается от изучаемых показателей в крови девушек НТ и СТ.

### Список литературы

1. Ананьев, В.Н. Сравнительный анализ реактивности системного давления и регионального кровообращения к норадреналину при адаптации к холоду / В.Н. Ананьев // Современные наукоемкие технологии. — 2011. — № 6. — С. 16–22.
2. Долгова, В.И. Исследование адаптации первокурсников к обучению в университете / В.И. Долгова, О.А. Кондратьева, Е.С. Нижегородцева // Научно-методический электронный журнал «Концепт». — 2015. — Т. 31. — С. 66–70.
3. Бухарцева, Н.А. Парестезия слизистой оболочки ротовой полости, гиперацидный гастрит, влияние гистамина и рН / Н.А. Бухарцева, М.Я. Малахова, А.И. Каспина // Клиническая лабораторная диагностика. — 2016. — № 9. — С. 56–56.
4. Роль дофамина в формировании эмоционального поведения / П.Д. Шабанов [и др.] // Обзоры по клин., фармакол. и леч. терапии. — 2003. — Т. 2. — № 1. — С. 23–45.
5. Шур, В.Ю. Адаптивное значение серотонинергической модуляции клеточных метаболических процессов / В.Ю. Шур, Н.Н. Тризно // Астраханский медицинский журнал. — 2013. — Т. 8, № 3. — С. 97–103.

# AMOUNT OF REGULATORY MONOAMINES IN BLOOD OF STUDENTS (GIRLS) DURING ADAPTATION TO THE HIGHER EDUCATION INSTITUTION STUDY

---

*Kolmakova T.S., Belikova Ye.A.*

*Rostov State Medical University of the Ministry of Health,  
Rostov-on-Don, Russia*

***Summary.*** *This study was conducted with the participation of 254 first-year students of the pedagogical direction SFU in order to study the content of regulatory monoamines in the blood during adaptation to higher education.*

*The results showed multidirectional changes in the studied indicators depending on the prevailing tone of the ANS in girls with a satisfactory and unsatisfactory course of adaptation.*

## КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТИАМИНКИНАЗ ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ И ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ

*Костеневич Н. Н., Черникевич И. П.*

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

**Резюме.** Методами ацетонового и аммонийного фракционирования, ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-тойоперле 650М, гель-фильтрации на сефадексе G-100 и аффинной хроматографии на голубой сефарозе из мозга свиньи выделена электрофоретически гомогенная тиаминкиназа с суммарным выходом 15 % и степенью очистки 2240 раз. По физико-химическим и кинетическим параметрам мембранно-ассоциированная тиаминкиназа из мозга существенно не отличается от одноименного цитозольного белка из пивных дрожжей: имеет оптимум рН 8,6, молекулярную массу  $52,8 \pm 1,2$  кДа, металл-зависима и состоит из двух идентичных субъединиц.  $K_S$  для свободных ионов магния и  $K_m$  для тиамина и комплекса  $Mg \cdot АТФ^{2-}$  соответствует внутриклеточному содержанию их в мозге. Исходя из свойств тиаминовых ферментов высказано предположение, что тиаминкиназа животных и микроорганизмов выполняет роль буферной системы, препятствующей немедленным изменениям концентраций активных форм витамина и обеспечивающей постоянство скорости сопряженных реакций, использующих исходный общий кофактор — тиаминдифосфат.

**Введение.** Биосинтез коферментной формы витамина В<sub>1</sub> — тиаминдифосфата (ТДФ) осуществляется тиаминкиназой (АТФ: тиаминдифосфотрансфераза; КФ 2.7.6.2), катализирующей двухсубстратную реакцию переноса дифосфатной группировки от молекулы АТФ на тиамин:



Гомогенные препараты фермента выделены с низким выходом из печени крыс [10], листьев петрушки [11], пивных дрожжей [1]. Белковые системы синтеза фосфатов тиамина нервных клеток практически не исследованы, хотя дифосфорному эфиру вместе с тиаминтрифосфатом отводится важная роль в свете решения проблемы биоэлектрогенеза и физиологии нервного импульса [2, 8]. При дефиците этих соединений в мозге развиваются дегенеративные изменения нервов с сопутствующими нарушениями сердечно-сосудистой регуляции, функции желудочно-кишечного тракта, водно-солевого обмена и др. [3].

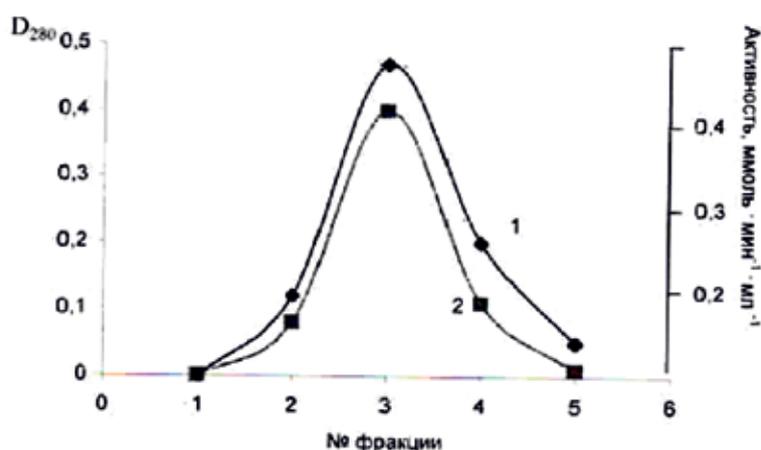
Задача настоящей работы — очистка тиаминкиназы из мозга свиньи до электрофоретически гомогенного состояния и сравнительная характеристика физико-химических и кинетических параметров молекулы белка из пивных дрожжей и ткани мозга.

**Материалы и методы исследования.** Для получения препарата тиаминкиназы свежий, отмытый от крови мозг свиньи освобождали от сосудов, измельчали, продавливали через пресс с диаметром пор 1 мм, заливали охлажденным до — 20 °С ацетоном (мозг/ацетон ÷ 1/10) и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе 30 с при 5000 об./мин. Ацетон немедленно удаляли, а белок просушивали при 4 °С на бумажных фильтрах до порошкообразного состояния.

Так, 4 г высушенной биомассы мозга повторно гомогенизировали с 60 мл 0,05М трис-НСl буфера рН 7,4, содержащего 0,01 % тритон X-100 и 0,2 мМ ЭДТА, после чего центрифугиро-

вали в течение 30 мин при 20000 г и 1 ч при 105000. Тиаминкиназу надосадочной жидкости осаждали сульфатом аммония, собирая белок в интервале 50–80 % насыщения. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме 0,02М трис-НСl буфера рН 7,4, содержащего 0,05М NaCl, 0,2 мМ ЭДТА, и диализовали (12 ч) против этого же буферного раствора. Диализованный препарат в дальнейшем очищали методом колоночной хроматографии (1,3 × 70 см) на носителе ДЕАЕ-тойоперл 650М, уравновешенном 0,02М трис-НСl буфером рН 7,4, с 0,05М NaCl, 0,2 мМ ЭДТА и 20%-м глицерином. Связавшийся белок элюировали линейным возрастающим градиентом NaCl от 50 до 400 мМ (по 150 мл в каждой камере) в этом же буфере со скоростью потока 18 мл/ч. Фракции, элюируемые при концентрации соли 69–77 мМ, объединяли, концентрировали против полиэтиленгликоля и хроматографировали на колонке (2 × 65 см) с сефадексом G-100 в вышеописанном буфере при скорости потока жидкости 24 мл/ч. Элюаты с наиболее высокой активностью фермента объединяли, после чего добавляли глицерин до его конечной концентрации 40 %. В результате удельная активность тиаминкиназы, по сравнению с исходным экстрактом, возросла в 946 раз.

На заключительной стадии очистки нами использованы гидрофобные и слабые катионообменные свойства триазинового красителя цибокрона голубого F3GA. Объединенный после гель-фильтрации элюат белка наносили на колонку (0,8 × 3,4 см) с голубой сефарозой, уравновешенной 0,02М трис-НСl буфером рН 8,2, содержащим 0,05М NaCl, 0,2 мМ ЭДТА и 40 % глицерина. Объем резервуара и смесителя по 15 мл, скорость элюции — 12 мл/ч. В подобранных нами условиях тиаминкиназа не связывалась с носителем, в отличие от сопутствующих примесных белков. Полученный препарат фермента являлся хроматографически (рис. 1) и электрофоретически (рис. 2) гомогенным. Результаты разработанного способа выделения и очистки белка обобщены в табл. 1, откуда следует, что наряду с цитозольными макромолекулами киназ из листьев петрушки [11] и пивных дрожжей [1], с хорошим выходом может быть получена и мембранно-ассоциированная тиаминкиназа из мозга свиньи. На мембранную локализацию фермента указывает значительное повышение выхода белка (3,2 раза) после внесения в среду выделения неионного детергента тритона X-100, сохраняющего нативность структур органелл клетки но подавляющего гидрофобную сорбцию макромолекул, и невозможность экстракции тиаминкиназы без предварительной стадии ацетонового фракционирования. Подтверждением мембранной ассоциации может служить и низкая устойчивость белка в отсутствие вязкой среды — 40 % глицерина.



**Рисунок 1 — Хроматография препарата на голубой сефарозе:**  
1 — выход белка, 2 — выход активных фракций тиаминкиназы

Активность тиаминкиназы определяли по скорости образования тиаминдифосфата [5]. Реакционная смесь содержала  $2 \cdot 10^{-3}$  М АТФ,  $2 \cdot 10^{-5}$  М тиамин,  $2 \cdot 10^{-3}$  М трис-НСl буфера рН 8,6,  $1 \cdot 10^{-2}$  М MgSO<sub>4</sub> и 20–30 мкг препарата белка в общем объеме 1 мл. В качестве контроля использовали те же ингредиенты, к которым добавляли 20–30 мкг предварительно денатурированного фермента. Удельную активность выражали в наномолях тиаминдифосфата, образовавшегося за 1 ч при 37 °С в расчете на 1 мг белка. Концентрацию белка находили по методу Лоури и по поглощению в УФ-области при 280 нм.

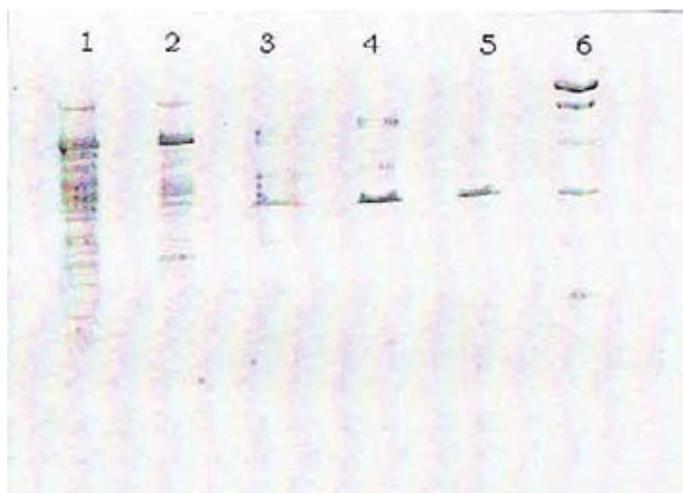
При расчете скорости ферментативной реакции использовали стационарные участки кинетических кривых. Концентрацию свободных ионов металла рассчитывали путем решения квадратного уравнения

$$C^2 - (M_t + S_t + 1/K_s) \cdot C + M_t \cdot S_t = 0,$$

где С — концентрация комплекса металл АТФ<sup>2-</sup>; M<sub>t</sub> — общая концентрация металла; S<sub>t</sub> — общая концентрация АТФ; K<sub>s</sub> — константа диссоциации комплекса, с подстановкой полученного значения в выражение:

$$M_f = M_t - C,$$

где M<sub>f</sub> — концентрация свободного металла.



**Рисунок 2 — Гель электрофорез препаратов тиаминкиназы из мозга свиньи в 7%-м полиакриламидном геле: 1 — исходный экстаркт; 2 — фракционирование сульфатом аммония; 3 — ионообменная хроматография; 4 — гель-хроматография; 5 — аффинная хроматография; 6 — молекулярные массы (Mr) белков-маркеров (135, 94, 69, 57, 43 кДа)**

Электрофорез белка (10–30 мкг) в 7 % и 10%-м полиакриламидных гелях выполняли по Орнштейну и Дэвису [4] при рН 8,9 в течение 5 ч при силе тока 20 мА в первые 60 мин, а затем 40 мА на пластинку. Белковые полосы проявляли 0,1%-м кумасси R-250 на 30%-ной ТХУ в течение 20–30 мин. Окрашенные гели отмывали 7%-ной уксусной кислотой и хранили в смеси: метанол — вода — глицерин — ледяная уксусная кислота в соотношении 50:50:20:1. Молекулярную массу тиаминкиназы рассчитывали по калибровочному графику, выражающему зависимость логарифма молекулярной массы от относительной подвижности стандартных белков-маркеров.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Очищенная в 2240 раз тиаминкиназа (табл. 1) нестабильна при хранении. Ее активность оставалась без изменений в пределах 2–3-х суток при

температуре 4–6 °С в 40%-м глицерине. Согласно удельной активности высокоочищенного фермента максимальное количество синтезированного в среде ТДФ не превышало  $10^{-7}$ М, тогда как концентрации взятых в реакцию АТФ и тиамин составили  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$ М соответственно. Поскольку состояние равновесия системы не достигалось, тиаминкиназная реакция протекает пропорционально времени инкубации. В наших опытах скорость биосинтеза ТДФ оставалась пропорциональной времени в течение 2 ч (табл. 2). Линейный характер зависимости скорости реакции от концентрации фермента в пробе соблюдался до 160 мкг. В указанных интервалах поддерживается стационарность состояния системы, что важно для сравнительной характеристики ферментов.

**Таблица 1 — Схема выделения и очистки тиаминкиназы из мозга свиньи**

Стадия очистки	Общее содержание белка, мг	Общая активность, нмоль · ч <sup>-1</sup>	Удельная активность, нмоль · ч <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup>	Степень очистки	Выход, %
Исходный экстракт	42476 ± 147	8920 ± 24	0,21 ± 0,02	1,0	100
Ацетоновое фракционирование*	12000 ± 61	9200 ± 16	0,77 ± 0,01	3,7	103
Аммонийное фракционирование	4306 ± 39	5600 ± 21	1,3 ± 0,01	6,4	63
Ионообменная хроматография на ДЕАЕ-тойоперле 650М	93 ± 12	2976 ± 17	32 ± 1,3	152	34
Гель-хроматография на сефадексе G-100	10 ± 0,7	1970 ± 11	198 ± 9	946	23
Хроматография на голубой сефарозе	2,9 ± 0,1	1369 ± 8	472 ± 13	2240	15

\*Увеличение выхода после ацетонового фракционирования связано с удалением фосфатаз.

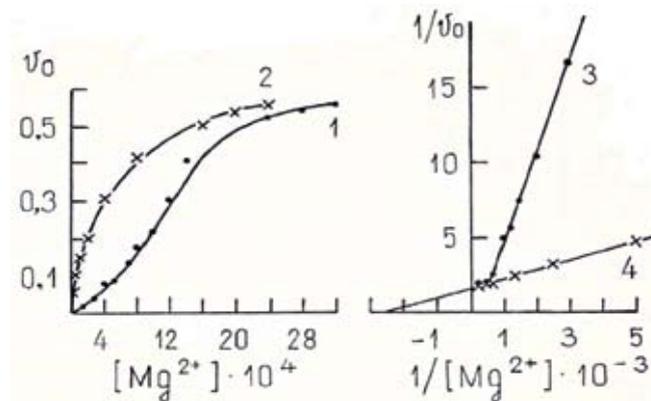
Почти все тиаминовые киназы активируются ионами двухвалентных металлов. Лучшими эффекторами являются  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Co^{2+}$ , причем для фермента из печени крыс наиболее предпочтительны ионы  $Mg^{2+}$  [10], а из пекарских дрожжей —  $Mn^{2+}$  [9]. Активация  $Mn^{2+}$  характеризуется выраженным максимумом при концентрации  $3,3 \cdot 10^{-3}$ М. Увеличение содержания металла приводит к резкому ингибированию тиаминкиназы [9]. Ионы  $Mg^{2+}$  даже в концентрации  $5 \cdot 10^{-2}$ М не давали такого эффекта. Биосинтез ТДФ в мозге свиньи также нуждается в присутствии двухвалентных катионов (табл. 2). По способности к активации катионы металлов располагаются в следующем порядке:  $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Ni^{2+}$ .  $Mn^{2+}$  в малых концентрациях ( $5 \cdot 10^{-4}$ М) активирует тиаминкиназу мозга даже намного больше, чем  $Mg^{2+}$ . Дальнейшее увеличение содержания  $Mn^{2+}$  приводит к угнетению ферментативной активности, а  $Mg^{2+}$  — к резкой ее активации. Оптимальная концентрация  $Mg^{2+}$ , по отношению к АТФ, в среде инкубации составляет 4:1,  $Mn^{2+}$  — 1:1.

С увеличением величины этого отношения скорость биосинтеза кофермента падает.

**Таблица 2 — Сравнение характеристик и кинетических параметров мембранно-ассоциированной тиаминкиназы из мозга свиньи и цитоплазматической тиаминкиназы из пивных дрожжей: 37°С, 10 мМ трис-НСI буфер рН 8,6**

Параметр	Тиаминкиназа мозга	Тиаминкиназа дрожжей
Молекулярная масса нативного фермента, кДа	52,8 ± 1,2	96 ± 5
Молекулярная масса (кДа) и число субъединиц	26 (2)	23 и 26 (4)
V макс., М · с <sup>-1</sup>	2,76	1,97
k кат., 10 <sup>-1</sup> , с <sup>-1</sup>	0,84	0,6
Активность, нмоль · ч <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup>	472	400
Km для тиаминкиназы · 10 <sup>-6</sup> , М	0,72	6
Km для комплекса Mg · АТФ <sup>-2</sup> · 10 <sup>-4</sup> , М	8,3	10
Ks для Mg <sup>2+</sup> · 10 <sup>-4</sup> , М	4	9,8 — 10

Параметр	Тиаминкиназа мозга	Тиаминкиназа дрожжей
Молекулярная масса нативного фермента, кДа	52,8 ± 1,2	96 ± 5
Оптимум pH	8,6	8,6 — 8,8
Ионы — активаторы	Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>
Устойчивость при 4°С, сут	2 — 3	4 — 5
Линейность от времени, ч	2	4
Линейность от концентрации белка, мкг	160	410



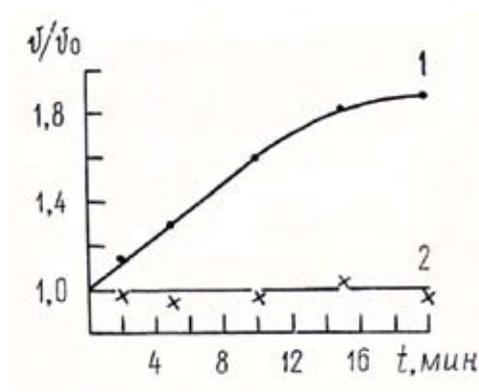
**Рисунок 3 — Зависимость начальной скорости тиаминкиназной реакции от концентрации общего (1,3) и свободного (2,4) Mg<sup>2+</sup> в прямых (1,2) и двойных обратных координатах (3,4). Концентрация АТФ 8 · 10<sup>-4</sup> М**

Как видно из рис. 3, кривая зависимости начальной скорости тиаминкиназной реакции от концентрации общего Mg<sup>2+</sup> носит S-образный характер (кривая 1) и не спрямляется в системе двойных величин (кривая 3). Коэффициент Хилла  $n_H$ , характеризующий степень S-образности, составляет при этом 1,9. Аналогичная зависимость для свободных ионов Mg<sup>2+</sup> вне комплекса Mg · АТФ<sup>-2</sup> представляет собой гиперболу (кривая 2) хорошо линейризующуюся в координатах  $1/v_0 : 1/[Mg^{2+}]$  (кривая 4) с коэффициентом кооперативности 1,0. Это позволяет рассчитать константу диссоциации для свободных катионов, которая была в пределах истинного содержания Mg<sup>2+</sup> в мозге и равнялась  $4 \cdot 10^{-4}$  М (табл. 2). Полная линейризация кинетической кривой и снижение величины  $n_H$  от 1,9 до 1,0 свидетельствует, что молекула тиаминкиназы содержит участок сорбции свободного Mg<sup>2+</sup>, присоединение к которому не оказывает заметного воздействия на связывание субстратного комплекса Mg · АТФ<sup>-2</sup> в активном центре.

Определение оптимальных значений pH тиаминкиназной реакции при насыщающих концентрациях ионов металлов показало, что для Mg<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup> наибольшая активация наблюдается при pH 8,6 (табл. 2). Это предполагает, что «истинным» субстратом фермента является комплекс металл · АТФ, причем Mg<sup>2+</sup> обладает более слабой способностью к хелатированию. Содержание хелатного комплекса зависит от pH и природы иона активатора. Очевидно при высоких концентрациях ионов металла образуется неактивный комплекс металл<sub>2</sub> · АТФ, как это происходит в случае тиаминкиназы из пекарских дрожжей [9], что будет вести к уменьшению содержания «истинного» субстрата металл · АТФ, либо к нарушению взаимодействия субстрата с ферментом.

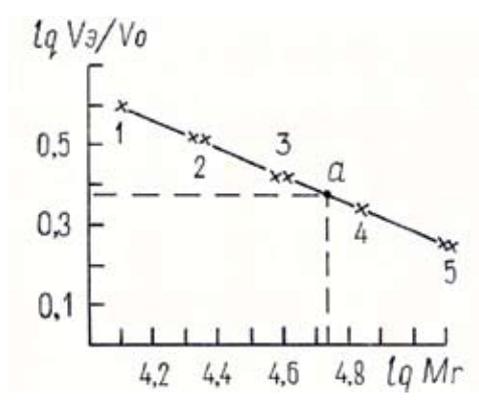
Для зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата — Mg · АТФ<sup>-2</sup> при соотношении  $[Mg^{2+}] / [ATP^{4-}] = 1$  также характерна S-образность. В данном случае характер кривой определяется содержанием активатора (Mg<sup>2+</sup>) в среде ин-

кубации. Увеличение содержания активатора приводит к уменьшению величины  $[S]_{0,5}$  для субстрата, с одновременным снижением степени S-образности. В присутствии избытка ионов магния, при  $[Mg^{2+}] / [ATФ^{4-}] \geq 4$ , сигмоидная кривая трансформируется в гиперболическую с кажущейся  $K_m$  для комплекса  $Mg \cdot ATФ^{-2}$ , равной  $8,3 \cdot 10^{-4}$  М (табл. 2). Насыщение тиаминкиназы вторым субстратом тиамином наблюдается при более низких концентрациях кажущаяся  $K_m$   $7,2 \cdot 10^{-7}$ . Обе величины близки к аналогичным характеристикам для фермента из двух источников [1, 7, 9] и приблизительно соответствуют физиологическому содержанию субстратов в тканях мозга.



**Рисунок 4 — Зависимость относительной скорости тиаминкиназой реакции ( $v/v_0$ ) от времени преинкубации фермента с тиамином (1), АТФ или комплексом  $Mg \cdot ATФ^{-2}$  (2). 30 °С; 0,02 М трис-НСI буфер рН 8,6**

В плане регуляции метаболизма витамина  $B_1$  важно проследить за состоянием молекулы фермента при воздействии на нее лигандов, поскольку известно, что тиаминкиназа из пивных дрожжей представлена ассоциирующе-диссоциирующей системой олигомеров, состояние равновесия между которыми определяется концентрациями тиамин, связанного с обменом тиамин пирувата и ионов двухвалентных металлов [6]. Анализ скорости биосинтеза ТДФ тиаминкиназой из мозга свиньи показывает (рис. 4, кривая 1), что преинкубация белковой молекулы с 3.6 мкМ тиамином приводит к активации ферментативного процесса, при этом время полуперехода ( $t_s = 9,7$  мин) существенно превосходит величину, которую можно ожидать исходя из кинетики образования фермент-субстратного комплекса. Ни АТФ, ни  $Mg \cdot ATФ^{-2}$  в условиях эксперимента (кривая 2) не оказывали воздействия на интенсивность биотрансформации витамина.



**Рисунок 5 — Определение молекулярной массы нативной тиаминкиназы из мозга свиньи методом гель-фильтрации (а). Белки маркеры: 1 — цитохром С (Mr 12400); 2 — трипсин (Mr 23800); 3 — пероксидаза (Mr 44000); 4 — гемоглобин — (Mr 67000); 5 — лактатдегидрогеназа (Mr 135000)**

Для выяснения вопроса влияет тиамин на степень олигомеризации или конформационное состояние белка нами определена молекулярная масса тиаминкиназы гель-фильтрацией через сефадекс G-100. Как видно из рис. 5, она составляет  $52800 \pm 1200$ . Аналогичная характеристика для частично очищенного фермента из печени крысы равна  $57000 \pm 2000$  [1], а из *Paracoccus dinitrificans* —  $44000$  [12]. Для фермента из листьев петрушки (гомогенный препарат) эта величина составила  $30000$  [11]. Принципиальным для данной ситуации, вероятно, является то, что в первых двух источниках тиаминкиназа представлена каталитически активными димерными формами, диссоциирующими на мономеры с массами 28000 и 23000 соответственно, а в последнем — одной функциональной цепью. Сопоставление молекулярных масс уже известных киназ позволяет полагать, что фермент из мозга также будет характеризоваться четвертичной структурой.

Электрофорез в 10%-м полиакриламидном геле предварительно денатурированного 2%-м додецилсуль-

фатом натрия (20 мин при 100 °С) белка в присутствии следующих стандартов: цитохрома С (Mr 12400), гемоглобина (Mr 15500),  $\alpha$ -химотрипсингена (Mr 25700), овальбумин (Mr 45000), пируваткиназы (Mr 57000) и человеческого сывороточного альбумина (Mr 67000) показал, что масса его мономера равна 26000 Да. Полученные данные свидетельствуют, что в мозге свиньи тиаминкиназа находится в виде двух идентичных субъединиц.

Таким образом, по своим физико-химическим и кинетическим параметрам фермент из мозга свиньи существенно не отличается от аналогичных белков из других источников, однако мембранная ассоциация молекулы требует осторожного подхода в интерпретации результатов эксперимента в ситуации *in vivo*. Кроме того, имеющиеся данные о структуре тиаминкиназы [1, 5] относительно медленные внутримолекулярные переходы ее под действием субстратов, кофакторов и эффекторов [6], а также катализ начального этапа биотрансформации тиаминкиназы до его коферментной формы позволяют говорить про фермент как про буферную систему, которая препятствует мгновенным изменениям других фосфорилированных производных витамина и обеспечивает постоянство скорости сопряженных реакций, которые используют общий исходный метаболит — ТДФ. Существование такой буферной системы, вероятно, служит одним из механизмов регуляции зависимых от обмена тиаминкиназы метаболитов в клетке.



**Рисунок 6 — Электрофорез денатурированного додецилсульфатом натрия белка в 10%-м полиакриламидном геле:**  
1 — белки-маркеры;  
2 — тиаминкиназа после хромато-графии на голубой сефарозе

### Список литературы

1. Воскобоев, А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиаминкиназы / А.И. Воскобоев, И.П. Черникевич. — Минск.: Наука и техника, 1987. — 200 с.
2. Макаричов, А.Ф. Тиаминтрифосфат и ферменты его гидролиза в биохимических объектах: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.04 / А.Ф. Макаричов. — Минск, 2008. — 43 с.
3. Макаричов, А.Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub> / А.Ф. Макаричов. — Минск: Белорусская наука, 2008. — 433 с.
4. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л. А. Остерман. — М.: Высшая школа, 1981. — 286 с.
5. Черникевич, И.П. Ферментные системы биотрансформации активных форм витамина В<sub>1</sub> (структура, свойства, регуляция). : автореф. дис. ... д-ра хим. наук: 03.00.04 / И. П. Черникевич. — Минск, 1996. — 35 с.
6. Влияние субстратов, кофакторов и эффекторов на структуру и динамику тиаминкиназы из пивных дрожжей/ И.П. Черникевич [и др.] // Биоорганическая химия. — 1992. — Т. 18, № 4. — С. 509–530.

7. Deus, B. Subcellular distribution of thiamine pyrophosphokinase activity in rat liver and erythrocytes / B. Deus, H. Blum // *Biachim. Biophys. Acta.* — 1970. — Vol. 219. — P. 489–497.
8. Haas, R.H. Thiamin and the brain / R.H. Haas // *Ann. Rev. Nutr.* — 1988. — Vol. 8. — P. 483–515.
9. Kaziro, Y. Studies on thiaminokinase from baker's yeast. I. purification and properties. / Y. Kaziro // *J. Biochem.* — 1959. — Vol. 46, № 11. — P. 1523–1539.
10. Mano, Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. III. Purification and properties of thiaminekinase from rat liver. / Y. Mano // *J. Biochem.* — 1960. — Vol. 47, № 2. — P. 283–290.
11. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf. / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Ivami // *J. Biochem.* — 1980. — Vol. 88, № 1. — P. 223–230.
12. Sanemori, H. Reversed-Phase High — Performance Liquid chromatography Analysis of Thiamine Phosphate Esters in *Paracoccus denitrificans*. / H. Sanemori, H. Ueki, T. Kawasaki // *J. Biochem.* — 1980. — Vol. 107. — P. 451–455.

## KINETIC ASSAY OF THIAMINASES FROM BREWERS YEAST AND PORCINE BRAIN

---

*Kostenevich N. N., Chernikevich I. P.*

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

**Summary.** *Using the methods of acetone and ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography on DEAE Toyoperl 650M, Sephadex and G-100gel-filtration and affinity chromatography on blue sepharose, electrophoretically homogenous thiamine kinase with the overall yield of 15 % and the degree of purity 2240 times higher was isolated from the swine brain. By physicochemical and kinetic parameters, the membrane-associated thiamine from the brain did not differ significantly from the similar cytosolic protein from brewer's yeast: it had a pH optimum of 8.6, a molecular mass of  $52.8 \pm 1.2$  kDa, it was metal-dependent and comprised two identical subunits,  $K_s$  for free ions of magnesium and  $K_m$  for thiamine and  $Mg \cdot ATP^{2-}$  complex, corresponding to their intracellular content in the brain. From thiamine enzymes properties, it was assumed that thiamine kinase of animals and microorganisms served as a buffer system which hindered immediate changes in concentrations of the vitamin active form and provided a permanent rate of conjugated reactions using the initial common cofactor — thiamine diphosphate.*

## ЗАПАТЕНТОВАННЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АМНЕЗИИ

---

*Королёв П.М.*

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

**Резюме.** В работе представлен краткий обзор патентов по проблеме применения фармакологических композиций на основе натурального растительного сырья для лечения амнезии различной этиологии. Данный аспект указанной проблемы не нашёл достаточного отражения в литературе. Выявлены страны, имеющие наибольшее количество патентов по теме исследования, а также патенты с подтверждением высокой эффективности лечения амнезии и отсутствия побочных эффектов.

**Введение.** Проблемы медикаментозного лечения амнезии, в том числе с использованием биологически активных веществ природного происхождения, широко освещены в научно-медицинской литературе [1, 2, 3, 4]. Достаточно отметить, что только в базе данных Научной электронной библиотеки eLIBRARY.RU, являющейся крупнейшим российским информационно-аналитическим порталом в области науки, технологии, медицины и образования, содержится более 950 публикаций по теме исследования. В англоязычной поисковой системе базы данных медицинских и биологических публикаций Национальной медицинской библиотеки США PubMed представлено более 14 тыс. научных статей по лечению амнезии, что свидетельствует об актуальности указанной проблемы.

Однако в литературе в недостаточной степени отражен аспект патентования фармакологических композиций на основе биологически активных веществ природного происхождения для лечения амнезии.

**Цель работы:** анализ динамики патентования изобретений, выданных в странах мирового сообщества на биологически активные композиции из натурального растительного сырья, предназначенных для лечения амнезии различной этиологии, а также анализ изобретательской активности стран по теме исследования.

**Материалы и методы исследования.** Для реализации поставленной цели был осуществлен патентный поиск в базе данных Всемирной организации интеллектуальной собственности PATENTSCOPE [5], которая обеспечивает доступ к международным патентным документам в соответствии с Договором о патентной кооперации (РСТ), Европейского патентного ведомства (ЕРО), Евразийского патентного ведомства (ЕАРО), Африканской региональной организации интеллектуальной собственности (ARIPO), а также к патентным документам из региональных и национальных фондов. В базах данных PATENTSCOPE содержится более 93 млн. патентных документов, включая 4 млн. опубликованных международных заявок на изобретения, поданных в соответствии с Договором о патентной кооперации (РСТ).

Поиск патентов по теме исследования осуществлялся по классу Международной патентной классификации А61К 36/00 — <http://www.freepatent.ru/MPK/A/A61/A61K/A61K36> Меди-

цинские препараты неопределенного строения, содержащие материалы из морских водорослей, лишайников, грибов или растений или их производных, например традиционные растительные средства. Из общего массива изобретений по данному классу проводилась целенаправленная выборка патентов по следующим ключевым терминам: А61К 36/00, amnesia, treating.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Суммарно в указанной выше базе данных по классу А61К 36/00 было выявлено 761 669 изобретений, при этом первый патент был зарегистрирован в 1837 г.

При целенаправленной выборке патентов, непосредственно относящихся к лечению амнезии с использованием фармакологических композиций на основе натурального растительного сырья, было выявлено 314 охранных документов. Динамика патентования изобретений за последний 10-летний период представлена в таблице 1.

**Таблица 1 — Количественные показатели выдачи патентов по годам**

Годы	Количество выданных патентов	Годы	Количество выданных патентов
2011	6	2016	32
2012	14	2017	27
2013	12	2018	29
2014	36	2019	11
2015	37	2020	12

Анализ результатов, приведенных в таблице 1, свидетельствует о довольно высокой изобретательской активности за период 2011-2020 гг., что подтверждается выдачей 216 патентов и составляет 69 % от их общего количества за весь период исследования.

Наиболее высокая активность патентования отмечена в период 2014-2018 гг., когда был выдан 161 патент.

В 2019-2020 гг. выдано 23 патента, при этом все они принадлежали изобретателям из Китая, что подтверждает заинтересованность китайских специалистов проблемой лечения амнезии с применением фармакологических композиций на основе биологически активных веществ природного происхождения.

В перечень стран, принимавших участие в патентовании по теме исследования, с указанием количества полученных патентов, вошли Китай — 259, Республика Корея - 22, США - 6, Япония — 4, Австралия — 2. Единичные патенты имеют Канада, Дания, Испания, Италия, Малайзия, Португалия, Сингапур, Филиппины.

Таким образом, лидирующую позицию по количеству полученных патентов занимает Китай, имеющий 259 патентов (82 % от их общего количества).

В этой связи было предпринято более детальное исследование изобретений китайских авторов для выявления композиций с использованием только натурального растительного сырья, а также с подтверждением высокой эффективности лечения амнезии и отсутствия побочных эффектов, что имеет большое значение для применения таких композиций в клинической практике.

Было установлено, что указанным трём критериям полностью отвечают 16 патентов китайских заявителей изобретений. Сведения об указанных патентах представлены в таблице 2.

В качестве примера можно привести патент № CN 106344702 «Композиция традиционной китайской медицины для лечения амнезии». Композиция состоит из традиционного лекарственного сырья и содержит кедровый орех, корень астрагала, высушенные ядра грецкого ореха, корень белой пеонии и корень ремании в указанных в патенте весовых частях. Композицию

назначают один раз в день, курс лечения составляет 15 дней. Эффективность лечения подтверждена на большом количестве наблюдений и составляет 93%, при этом не зарегистрировано случаев побочных эффектов.

**Таблица 2 — Перечень патентов китайских авторов изобретений с высокой эффективностью лечения амнезии**

Номера патентов	Эффективность лечения амнезии, указанная в патенте	Номера патентов	Эффективность лечения амнезии, указанная в патенте
CN 106701483	95%	CN 101455813	90%
CN106344702	93%	CN 101224289	90%
CN 105687796	Высокая	CN 101181533	Более 80%
CN 104257983	94%	CN 1528400	93,5%
CN 103536734	83,3%	CN 1358508	99%
CN 103520418	96,7%	CN 1245710	95%
CN 103479880	96,2%	CN 1142370	Более 98%
CN 102225164	91,5-97,9%	CN 1104911	81,6-92,2%

**Заключение.** Непосредственно по теме исследования выявлено 314 патентов. В патентовании изобретений принимали участие более 10 стран мирового сообщества, среди которых несомненным лидером является Китай, имеющий 259 патентов (82 % от их общего количества). Второе место по количеству патентов (22) принадлежит Республике Корея.

Выявлено 16 изобретений китайских заявителей, в которых указана высокая эффективность лечения амнезии и отсутствие побочных эффектов, что способствует применению данных изобретений в клинической практике.

Заявители и авторы изобретений достаточно широко использовали систему международного патентования, обеспечивающую возможность патентовать свои изобретения во многих странах мира, подавая одну заявку в международную патентную организацию (РСТ, ЕРО), что способствует популяризации и коммерциализации изобретений.

Приведенная в работе информация может быть полезна для широкого круга научных и медицинских работников, занимающихся разработкой и использованием в лечебной практике лекарственных средств и медикаментозных композиций на основе биологически активных веществ природного происхождения для лечения различных форм амнезии.

### Список литературы

1. Черныш, Н.А. К вопросу диагностики и лечения транзиторной глобальной амнезии / Н.А. Черныш Вселенная мозга, 2020. — Т. 2, № 3 (6). — С. 62-67.
2. Барнаулов, О.Д. Сравнительная оценка церебропротективных и других фармакологических свойств растений семейства шикшевые empetraceae / О.Д. Барнаулов. - Традиционная медицина, 2018. - № 1(52). — С. 38-47.
3. Талантов, П. В. 0,05: Доказательная медицина от магии до поисков бессмертия / П. В. Талантов. — М.: АСТ: CORPUS, 2019. — 560 с.
4. Verfaellie, M. Neuropsychological Investigations of Human Amnesia: Insights Into the Role of the Medial Temporal Lobes in Cognition / M. Verfaellie, M.M. Keane // J. Int. Neuropsychol. Soc. — 2017; 23(9-10). — P. 732-740.
5. World Intellectual Property Organization. Search International and National Patent Collections [Electronic resource] - Mode of access: <http://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf> — Date of access: 28.02.2021.

**PATENTED PHARMACOLOGICAL COMPOSITIONS  
ON THE BASIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES  
OF NATURAL ORIGIN FOR TREATMENT OF AMNESIA**

---

*Korolev P.M.*

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

**Summary.** The paper presents a brief overview of patents on the problem of the use of pharmacological compositions based on natural plant materials for the treatment of amnesia of various etiologies. This aspect of the problem has not found sufficient reflection in the literature. Identified countries having the largest number of patents on the topic of research, as well as patents confirming the high effectiveness of the treatment of amnesia and the absence of side effects.

## ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И РЕТИНОИДОВ НА УРОВЕНЬ СУРФАКТАНТНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ В ЛЕГКИХ ПРИ ГИПЕРОКСИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

---

*Котович И.Л., Рутковская Ж.А., Таганович А.Д.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** В проведенном исследовании впервые показано, что ингаляционное введение N-ацетилцистеина и липосом, содержащих ретинол и ретиноевую кислоту, оказывает нормализующее действие на состав сурфактантных фосфолипидов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости в условиях длительной экспериментальной гипероксии.

**Введение.** Дефицит сурфактанта является одним из факторов, определяющих развитие осложнений со стороны бронхолегочной системы у недоношенных новорожденных в постнатальном периоде [9]. Использование препаратов экзогенного сурфактанта способно существенно уменьшать проявления респираторного дистресса, однако необходимость применения повышенных концентраций кислорода в дальнейшем при выхаживании таких новорожденных может спровоцировать или усугубить имеющийся дефицит за счет развития окислительного стресса и повреждения сурфактантных фосфолипидов путем их перекисной модификации [3]. В условиях недостаточности поверхностно-активных компонентов нарушается нормальное функционирование легких и газообмен, создаются условия для формирования ателектазов, фиброгенеза и развития необратимых структурно-функциональных изменений в легких. В связи с этим актуальной задачей современных исследований является изучение возможности коррекции состава сурфактанта и защиты легких новорожденных от токсического действия кислорода. Патогенетически обоснованными и перспективными представляются препараты, обладающие антиоксидантным действием, однако проведенные ранее исследования продемонстрировали слабую эффективность антиоксидантов при введении их внутрь и внутривенно для защиты легких новорожденных от повреждения [2, 12]. Мы предположили, что более эффективным может быть ингаляционный путь введения, позволяющий доставить препараты непосредственно в легкие и избежать системных потерь за счет их метаболизма в печени и потребления другими органами.

Целью настоящего исследования было изучить влияние N-ацетилцистеина и липосом, содержащих ретиноиды, при их ингаляционном введении на содержание сурфактантных фосфолипидов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости новорожденных морских свинок, подвергавшихся гипероксии.

**Материалы и методы исследования.** Эксперимент проводили с соблюдением этических норм и правил работы с лабораторными животными. Новорожденные морские свинки опытных групп после рождения помещались в плексигласовую камеру с дополнительной подачей кислорода и инкубировались в условиях гипероксии (концентрация кислорода не менее 70%) в течение 3 и 14 суток. Животные контрольных групп дышали обычным воздухом. Каждая экспериментальная группа включала 8-10 животных.

Группа «гипероксия + N-ацетилцистеин» получала ингаляции N-ацетилцистеина (20% раствор для ингаляций, Белмедпрепараты, Беларусь) из расчета 250 мг/кг. Для разведения препарата до нужной концентрации использовали натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), рН=7,4. Группа «гипероксия + ретиноиды<sub>липос.</sub>» получала ингаляции свежеприготовленных многослойных липосом, содержащих ретинол (6 мг/кг), ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг), дипальмитоилфосфатидилхолин (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), рН=7,4. Для анализа влияния основного компонента липосом (дипальмитоилфосфатидилхолина) на изучаемые показатели были сформированы отдельные группы животных (n=4 в каждом сроке наблюдения), которые получали ингаляции «пустых» липосом, не содержащих ретиноиды. Многослойные липосомы получали стандартным методом механического диспергирования после добавления буферного раствора к сухой липидной пленке [5]. Средний размер полученных липосом составлял 3,7±0,1 мкм, эффективность включения ретиноидов в состав липосом — 91,2%. Ингаляции проводили с помощью компрессорного небулайзера (Omron, Китай) 1 раз в два дня.

По окончании эксперимента животных наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) не ранее, чем через 22 часа после последнего введения препарата. Материалом для исследования служил бесклеточный супернатант бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Липиды экстрагировали по J.Folch, фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии с последующим количественным учетом по уровню липидного фосфора [11]. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10,0. Для сравнения выборок, распределение в которых было отличным от нормального, применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (U-тест). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25 перцентиль — 75 перцентиль).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Воздействие гипероксии в течение 3 суток не оказывало существенного влияния на уровни минорных фракций сурфактанта в БАЛЖ (лизофосфатидилхолина, сфингомиелина и фосфатидилэтаноламина), тогда как содержание основных фракций (суммарного и динасыщенного фосфатидилхолина), а также общего липидного фосфора в БАЛЖ достоверно увеличивалось (на 98%, 115% и 82% соответственно,  $p < 0,05$ ) [таблица 1].

**Таблица 1 — Содержание фосфолипидов в БАЛЖ новорожденных морских свинок в условиях гипероксии и ингаляционного введения N-ацетилцистеина и липосом, содержащих ретиноиды**

Показатель	Группа			
	Контроль	Гипероксия	Гипероксия + N-ацетилцистеин	Гипероксия + ретиноиды <sub>липос.</sub>
<b>3 суток</b>				
<b>ОЛФ</b>	538,1 (388,2–780,3)	981,4 (898,2–1235,2)*	704,0 (676,5–977,0)	1576,1 (1142,9–1817,3)*
<b>ФХ сумм.</b>	406,3 (293,5–514,7)	805,0 (598,2–978,4)*	621,5 (577,0–811,5)	1362,9 (881,5–1547,7)*^
<b>ДНФХ</b>	220,2 (121,7–301,1)	473,6 (352,4–513,1)*	373,2 (306,1–421,3)	897,2 (726,7–960,5)*^
<b>ЛизоФХ</b>	18,5 (4,1–29,6)	0 (0–39,8)	22,9 (20,5–25,5)	53,8 (15,3–82,9)
<b>СМ</b>	11,3 (1,0–39,7)	11,0 (0–17,6)	3,0 (0–9,0)	27,3 (1,0–52,9)
<b>ФЭА</b>	97,9 (60,6–142,5)	97,2 (57,8–181,8)	124,9 (110,9–134,5)	172,2 (150,2–228,6)*

Показатель	Группа			
	Контроль	Гипероксия	Гипероксия + N-ацетилцистеин	Гипероксия + ретиноиды <sub>липос.</sub>
<b>14 суток</b>				
<b>ОЛФ</b>	1841,6 (932,5–2293,6)	539,3 (443,4–1016,2)*	1238,9 (675,0–1602,2)^	1270,3 (1214,6–1370,6)^
<b>ФХ сумм.</b>	1300,4 (921,6–1645,6)	405,2 (311,2–749,2)*	970,3 (970,3–1189,9)^	977,5 (947,4–1087,3)^
<b>ДНФХ</b>	811,1 (703,6–920,4)	295,1 (209,3–326,1)*	655,1 (613,7–725,3)^	683,1 (610,4–736,2)^
<b>ЛизоФХ</b>	55,4 (19,4–70,7)	0 (0–20,1)*	19,6 (13,2–26,1)	43,4 (25,3–74,7)^
<b>СМ</b>	74,5 (0–123,9)	0 (0–12,8)*	90,1 (73,9–101,3)^	56,1 (48,6–72,0)^
<b>ФЭА</b>	190,5 (84,1–458,8)	37,5 (0–100,5)*	147,7 (81,3–169,9)^	176,1 (163,2–183,8)^

Примечание — Содержание фосфолипидов представлено в нмоль фосфора/мг белка. ОЛФ — общий липидный фосфор, ФХ сумм. — суммарная фракция фосфатидилхолина, ДНФХ — динасыщенный фосфатидилхолин, ЛизоФХ — лизофосфатидилхолин, СМ — сфингомиелин, ФЭА — фосфатидилэтаноламин, ретиноиды<sub>липос.</sub> — липосомы, содержащие ретиноиды. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «контроль»; ^ —  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «гипероксия».

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, которые изучали синтез фосфатидилхолина в легких крыс в условиях гипероксии и обнаружили, что в период между 2 и 7 сутками воздействия он усиливается примерно в 1,7 раза [4]. Такие изменения можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на защиту легких от повреждения.

Примечательно, что увеличение уровня фосфолипидов было еще более выраженным у животных, получавших ингаляции с ретиноидами на фоне 3-дневного действия гипероксии: в этой группе уровень суммарного фосфатидилхолина превышал уровень контроля на 235%, динасыщенного фосфатидилхолина — на 307% (различия с группой «гипероксия» статистически достоверны); отмечался также рост уровня фосфатидилэтаноламина на 76% ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем). Данный эффект не является результатом простой «заместительной» терапии за счет введения дипальмитоилфосфатидилхолина в составе липосом, поскольку у животных, получавших «пустые» липосомы, содержание динасыщенного фосфатидилхолина в БАЛЖ составило 350,2 (280,2 — 490,1) нмоль фосфора/мг белка, что достоверно не отличалось от групп «контроль» и «гипероксия» (3 суток).

Стимулирующий эффект ретиноевой кислоты на синтез сурфактанта и пролиферацию клеток альвеолярного эпителия был ранее продемонстрирован на культуре клеток в другом исследовании, в котором этот эффект проявлялся при оксидантном стрессе, спровоцированном действием экстракта сигаретного дыма [6]. В то же время, витамин А при введении крысам с пищей не оказывал влияния на синтез и секрецию сурфактантных фосфолипидов в условиях моделирования повреждения легких [10]. В нашем исследовании впервые было показано, что ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом *in vivo* способствует достоверному увеличению уровня сурфактантных фосфолипидов в легких.

При ингаляционном введении N-ацетилцистеина на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) отмечалась тенденция к нормализации уровней фосфатидилхолинов и общего липидного фосфора в БАЛЖ [таблица 1].

При увеличении длительности гипероксии обращала на себя внимание тенденция к прогрессирующему снижению уровня основных фосфолипидных фракций и общего липидного фосфора в БАЛЖ. У животных, подвергавшихся гипероксии в течение 14 суток, медианное содержание суммарного фосфатидилхолина уменьшилось в 3,2 раза по сравнению с контролем, динасыщенного фосфатидилхолина — в 2,7 раза, (для всех  $p < 0,05$ , таблица 1). Другие фракции фосфолипидов (лизосфосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин) обнаруживались в минимальных количествах; уровень общего липидного фосфора был ниже, чем в контроле, в 3,4 раза.

Полученные результаты согласуются с данными литературы о снижении функциональных характеристик сурфактанта по мере увеличения длительности гипероксии свыше 7 дней, что обусловлено в первую очередь выраженным уменьшением содержания фосфатидилхолина в его составе [4]. Одной из причин резкого уменьшения содержания фосфолипидов в бронхоальвеолярном пространстве в условиях длительной гипероксии представляется окислительное повреждение компонентов сурфактанта. В пользу данного предположения свидетельствует увеличение уровня продуктов перекисного окисления липидов в БАЛЖ, которое имеет место при действии гипероксии [1]. Кроме того, в нашем исследовании было выявлено увеличение доли динасыщенного фосфатидилхолина в БАЛЖ животных из группы «гипероксия» (14 суток) до 73% по сравнению с 62% в соответствующей группе «контроль», что может быть вызвано более интенсивным катаболизмом фосфолипидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, вследствие их перекисного окисления. Повреждающее действие кислорода на клетки-продуценты сурфактанта — альвеолоциты II типа — также может быть причиной обнаруженного снижения уровня фосфолипидов в лаважной жидкости.

Введение N-ацетилцистеина на фоне продолжительной гипероксии (14 суток) сопровождалось достоверным изменением содержания фосфатидилхолина (в том числе, динасыщенного), сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина — их уровень в БАЛЖ увеличивался по сравнению с группой, не получавшей ингаляции, и не отличался от контрольных значений. Мы полагаем, что увеличение содержания сурфактантных фосфолипидов в БАЛЖ при введении N-ацетилцистеина на фоне длительной гипероксии может быть результатом реализации нескольких механизмов. Во-первых, собственно антиоксидантного действия препарата и подавления окислительного повреждения компонентов сурфактанта. Известно, что N-ацетилцистеин способен напрямую обезвреживать активные формы кислорода благодаря наличию тиольной группы, а также оказывать стимулирующее действие на синтез важнейшего антиоксиданта глутатиона. Во-вторых, N-ацетилцистеин оказывает ряд регуляторных эффектов на альвеолоциты II типа: тормозит апоптоз [7] и стимулирует секрецию [8], что может способствовать увеличению уровня компонентов сурфактанта в бронхоальвеолярном пространстве и уменьшать повреждающее действие высоких концентраций кислорода на легкие.

Введение липосом, содержащих ретинол и ретиноевую кислоту, на фоне длительной гипероксии (14 суток) сопровождалось значительным увеличением уровня фосфолипидов в БАЛЖ по сравнению с группой животных, подвергавшихся действию изолированной гипероксии. Содержание общего липидного фосфора, фосфатидилхолина и его динасыщенной формы возрастало в 2,3 — 2,4 раза, повысилось содержание минорных фракций фосфатидилэтаноламина, сфингомиелина и лизосфосфатидилхолина (для всех —  $p < 0,05$  по сравнению с группой «гипероксия»). В целом показатели уровней фосфолипидов в этой группе приближались к значениям в группе контроля и достоверно от них не отличались. После введения «пустых» липосом нор-

мализации уровня фосфолипидов не наблюдалось: уровень динасыщенного фосфатидилхолина оставался сниженным и составлял 360,6 (316,1 — 482,4) нмоль фосфора /мг белка, что достоверно не отличалось от группы «гипероксия 14 суток». Влияния «пустых» липосом на другие показатели также выявлено не было. Выявленный эффект ретиноидов может быть обусловлен как описанным выше регуляторным воздействием на клетки альвеолярного эпителия, так и усилением локальной антиоксидантной защиты в легких.

**Заключение.** Таким образом, проведенное экспериментальное исследование показало, что в условиях относительно кратковременного действия гипероксии (3 суток) ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом значительно усиливает эффект, вызванный гипероксией и проявляющийся в увеличении уровня фосфатидилхолинов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости; введение N-ацетилцистеина в этих условиях достоверного влияния на уровень фосфолипидов не оказывает. На фоне длительной гипероксии (14 суток) ингаляционное введение как водного раствора N-ацетилцистеина, так и липосом, содержащих ретиноиды, способствует нормализации состава сурфактантных фосфолипидов в легких.

### Список литературы

1. Рутковская, Ж.А. Окислительная модификация липидов и белков в легких и плазме крови новорожденных морских свинок в динамике гипероксии / Ж.А. Рутковская, И.Л. Котович, А.Д. Таганович // Медицинский журнал. - 2012. - №2. - С.97-102.
2. Ahola, T. N-acetylcysteine does not prevent bronchopulmonary dysplasia in immature infants: a randomized controlled trial / T. Ahola, R. Lapatto, K.O. Raivio [et al.] // J. Pediatr. — 2003. — Vol. 143, №. 6. — P. 713-719.
3. Al-Saiedy, M. Dysfunction of pulmonary surfactant mediated by phospholipid oxidation is cholesterol-dependent / M. Al-Saeidy, R. Pratt, P. Lai, E. Kerek, H. Joyce [et al.] // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. — 2018. — Vol. 1862, №4. — P. 1040 — 1049.
4. Dombrowsky, H. Molecular and functional changes of pulmonary surfactant in response to hyperoxia / H. Dombrowsky, T. Tschernig, G. Vieten, G.A. Rau, F. Ohler [et al.] // Pediatr. Pulmonol. — 2006. — Vol. 41 (11). — P. 1025-1039.
5. Dua, J.S. Liposome: methods of preparation and applications / J.S. Dua, A. C. Rana, A. K. Bhandari // Int. J. Pharm. Studies and Res. - 2012. - Vol. 3. - P. 14-20.
6. George, U.M. Effect of tobacco extract on surfactant synthesis and its reversal by retinoic acid — role of cell–cell interactions in vitro / U.M. George, U. Ashna, S.S. Pradeep Kumar, A. M. Nandkumar // In vitro Cell.Dev.Biol.- Animal. — 2013. — Vol. 49. — P. 260-269.
7. Makena, P.S. Lung injury caused by high tidal volume mechanical ventilation and hyperoxia is dependent on oxidant mediated c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation / P.S. Makena, V. K. Gorantla, M. C. Ghosh, L. Bezawada, L. Balazs [et al.] // J. Appl. Physiol. — 2011. — Vol. 111(5). — P. 1467–1476.
8. Muller, B. Effect of N-acetylcysteine treatment on NO<sub>2</sub>-impaired type II pneumocyte surfactant metabolism / B. Muller, M. Oske, R. Hochscheid, C. Seifart, P.J. Barth [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 31 (2). — P. 179-188.
9. Nkadi, P.O. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease / P.O. Nkadi, T.A. Merritt, D.-A. M. Pillers // Mol.Genet. Metab. — 2009. — Vol. 97, №2. — P. 95-101.
10. Swamidias, G.P. Dietary retinol inhibits inflammatory responses of rats treated with monocrotaline / G.P. Swamidias, R.J. Basaraba, R.C. Baybutt // J. Nutr. — 1999. — Vol. 129. — P. 1285–1290.

11. Vaskovsky, V. E. A universal reagent for phospholipid analysis / V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, I.M. Vasendin // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 114. — P. 129-141.
12. Wardle, S.P. Randomised controlled trial of oral vitamin A supplementation in preterm infants to prevent chronic lung disease / S.P. Wardle, A. Hughes, S. Chen, N.J. Shaw // Arch. Disease in Childhood. — 2001. — Vol. 84 (1). — P. F9-F13.

## **EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE AND RETINOIDS ON THE SURFACTANT PHOSPHOLIPIDS LEVEL IN THE LUNGS IN HYPEROXIA IN EXPERIMENT**

---

*Kotovich I.L., Rutkovskaya Zh.A., Taganovich A.D.*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

***Summary.*** *In the study, a normalizing effect of inhaled N-acetylcysteine and liposomes containing retinol and retinoic acid on the composition of surfactant phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid under prolonged experimental hyperoxia has been shown.*

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОСОРБЕНТА ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ IGG НА ОСНОВЕ ОЛИГОПЕПТИДНОГО ЛИГАНДА

*Лапко А.В., Голубович В.П.*

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

**Резюме.** Рассматривается способ получения и оценка функциональной активности гемосорбента на основе олигопептидного аналога эпитопа протеина А *Staphylococcus aureus* и полиэтиленовой матрицы в стендовом эксперименте, максимально приближенном к процедуре иммуносорбции в условиях клинической практики. Установлено закономерное снижение уровня иммуноглобулинов G в зависимости от времени проведения процедуры.

**Введение.** Иммуносорбция — высокотехнологичный селективный метод, который позволяет избирательно удалять из плазмы крови конкретные молекулы (иммуноглобулины) или частицы (липопротеины низкой плотности). Концентрация остальных компонентов крови — клеток, ферментов, гормонов, белков и других веществ — не изменяется. Является одним из самых эффективных современных экстракорпоральных методов «очистения» крови, применяемых в мире.

Процесс обработки плазмы заключается в том, что кровь пациента разделяется в специальном аппарате на клетки и плазму. Далее плазма протекает через иммуносорбционную колонку и очищается от патологического вещества. В сорбционной колонке находится аффинный сорбент.

Иммуносорбционные колонки приобретаются пациентом для индивидуального использования. Лечение с применением иммуносорбции проводится длительно и имеет смысл у пациентов с тяжелыми хроническими заболеваниями, которым необходимо периодически удалять из крови патологические вещества. За одну процедуру подвергается сорбции («очистению») 3–6 л плазмы крови, т. е. 1–2 объема всей циркулирующей плазмы, находящейся в организме.

Благодаря тому, что при иммуносорбции удаляется только «целевое» вещество, а остальной состав крови никак не меняется, лечение этим методом можно проводить в течение длительного времени (годы) с промежутками в несколько дней.

Иммуносорбция применяется как самостоятельная лечебная процедура. При лечении аутоиммунных заболеваний эти процедуры могут чередоваться с процедурами лимфоцитафереза, фотофереза, которые направлены на удаление лимфоцитов или изменение их свойств. Таким образом, лечение методами экстракорпоральной гемокоррекции позволяет воздействовать на разные звенья болезни: антитела, которые поражают собственные ткани и органы, а также лимфоциты, которые вырабатывают эти антитела и, в свою очередь, сами атакуют собственные клетки [1].

Существует целый ряд неврологических, гематологических, системных аутоиммунных заболеваний, развитие которых сопровождается образованием и накоплением в крови большого аутоантител к различным антигенам собственного организма. Показано, что аутоантитела являются важным звеном патологического процесса при таких заболеваниях, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура [10], синдромы Гильена-Барре или Гудпасчера, миастения, дилатационная кардиомиопатия [14],

отторжение трансплантатов, иммунный конфликт при беременности и др. Во многих случаях, когда лекарственная терапия не эффективна или не может быть применена, удаление иммуноглобулинов (Ig аферез) из кровотока пациента позволяет существенно улучшить качество жизни пациента и прогноз болезни [12, 11].

Любая сорбционная колонка медицинского назначения состоит из трех основных компонентов: матрицы — биологически инертного биосовместимого материала; лиганда-молекул, которые ковалентно присоединяются к матрице и придают сорбенту специфичность, и корпуса колонки, куда помещается сорбент.

Для колонок, используемых в клинике, наиболее важными параметрами являются эффективность и специфичность удаления патогенного компонента или компонентов, а также безопасность использования колонок в процедуре терапевтического афереза. Эффективностью удаления патогенного компонента принято называть снижение ( %) концентрации этого компонента за хроматографический цикл или процедуру.

Эффективность сорбционной колонки определяется сорбционной емкостью сорбента, объемом геля в колонке и возможностью многократного использования колонки в течение одной процедуры.

В настоящее время в клинической практике для Ig афереза наиболее широко применяют сорбенты с иммобилизованными поликлональными антителами к иммуноглобулинам человека («Ig Адсопак»®), НПФ «ПОКАРД», Россия; «Ig Therasorb»®, «Miltenyi Biotec»®, Германия) [2, 7], колонки с иммобилизованным белком А («Immunosorba»® и «Prosorba»®, «Fresenius NemoCare», Германия). Недавно создан сорбент синтетическим олигопептидом «Globaffin» («Affinna», Германия).

Колонки «Immunosorba»® содержат 62,5 мл геля агарозы с иммобилизованным белком А. Сорбционная емкость такого сорбента составляет приблизительно 20 мг IgG на 1 мл геля сорбента [5]. Колонки разработаны для многократного применения в течение процедуры. Основным недостатком сорбента является избирательное взаимодействие белка А с различными подклассами IgG [8], что достоверно снижает клинический результат при лечении ряда заболеваний, в частности ДКМП. Сорбент с иммобилизованным белком А снижал концентрацию IgM и IgA на 20–40 %, что в два раза менее эффективно чем иммуносорбенты на основе антител [9].

Аналогичный лиганд — белок А — используется в колонках «Prosorba»®, «Fresenius NemoCare» (Германия), которые содержат 300 мл сорбента на основе силикагеля. Сорбционная емкость сорбента из колонки «Prosorba»® составляет  $7,1 \pm 1,8$  мг IgG на 1 мл геля [15]. Кроме описанных выше недостатков, определяемых иммобилизованным белком А, в опытах *in vitro* и при клиническом использовании была отмечена утечка лиганда с носителя. Тот факт, что колонки «Prosorba»® разработаны для однократного применения, а следовательно, не регенерируются и не подлежат повторному терапевтическому использованию, является другим немаловажным недостатком таких колонок [6], поскольку это обстоятельство существенно ограничивает эффективность колонок при проведении процедуры терапевтического афереза.

Колонки с иммобилизованным пептидом, способным связывать иммуноглобулины G «Globaffin» («Fresenius», Германия), содержат 67 мл агарозного геля с иммобилизованным пептидом PGAM146. Колонки «Globaffin» удаляют широкий спектр иммуноглобулинов человека и разработаны для многократного применения. Сорбционная емкость сорбента составляет в среднем 17 мг IgG на 1 мл геля [13]. Поскольку использование таких колонок только начинается в рамках клинических испытаний, в литературе практически отсутствуют данные о достоинствах и недостатках такого сорбента.

Наиболее близким аналогом предлагаемого изобретения является сорбент на основе агарозной матрицы с иммобилизованными поликлональными антителами барана против IgG человека, который используется в колонках «Ig Therasorb»® (Myltenyi Biotec GmbH, Германия), содержащих 150 мл агарозного геля с иммобилизованными поликлональными антителами барана против IgG человека. Сорбционная емкость сорбента составляет в среднем 12 мг IgG на 1 мл геля. Колонки предусмотрены для многократного применения и регенерации в течение процедуры терапевтического афереза, связывают все подклассы иммуноглобулинов класса G, а также частично иммуноглобулины классов A и M. Основным недостатком данного сорбента является сорбционная емкость, на 30 % уступающая сорбенту с иммобилизованным белком A.

В связи с перечисленным выше разработка гемосорбента на основе небольшого пептидного аналога активного центра протеина A могла бы существенно снизить стоимость и упростить задачу производства и дала бы возможность его использования в качестве лиганда в иммуносорбционной колонке для применения в различных медицинских учреждениях в процедуре афереза. Целью же данной работы стало получение и исследование функциональной характеристики связывания минимизированного образца гемосорбента с иммуноглобулином класса G плазмы донора.

**Материалы и методы исследования.** Для получения олигопептидного лиганда гемосорбента на основе аналога активного центра протеина A *Staphylococcus aureus* были проанализированы с помощью методов конформационного анализа структуры комплекса протеин A — Fc-фрагмент иммуноглобулинов класса G (структуры 1FC1 и 1FC2 в pdb-формате). Поиск контактов взаимодействия протеина A с Fc-фрагментом иммуноглобулина G проводился в структуре, полученной с помощью Программы оптимизации белков и счета конформаций, разработанной на базе лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси, а также программы UCSFChimera [4].

Проведен химический синтез выделенных олигопептидных аналогов активного центра протеина A состава Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt. Основным методом образования пептидной связи был выбран карбодиимидный, в качестве конденсирующего агента использовали диизопропилкарбодимид, противорацемической добавки — 1-оксибензотриазол. Для блокирования α-аминогрупп использовали третбутилоксикарбонильную защиту. Ее отщепление проводили обработкой пептидов 3,5–5,0 н. раствором HCl в этилацетате. Карбоксильные группы блокировали путем образования метиловых эфиров. Разработанная схема синтеза включает 6 синтетических стадий. Чистота и первичная структура созданных пептидов подтверждены методами масс-спектрометрии, аминокислотного анализа, ВЭЖХ, ТСХ [3].

Для получения образцов сорбентов были использованы активированные ионизирующим излучением гранулы полиэтилена с привитой акриловой кислотой, к которым присоединялся олигопептидный лиганд Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt [3].

В качестве функциональной оценки связывания полученного образца сорбентов с Fc-фрагментом иммуноглобулинов использовался иммуноферментный анализ. Для этого в качестве иммуноферментной тест-системы был использован набор «IgG общий — ИФА — БЕСТ» фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), предназначенный для иммуноферментного определения концентраций общего IgG в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека.

Непосредственно перед проведением анализа проводился динамический эксперимент для моделирования экстракорпорального процесса иммуносорбции. Для этого на примере уменьшенной копии иммуносорбционной колонки исследовались функциональные характеристики образца гемосорбента. Объем гранул сорбента составил 4 мл, а объем плазмы — 35 мл, что

эквивалентно объему сорбента в условиях иммуносорбции. Подготовленный образец плазмы циркулировал по замкнутому контуру с помощью перистальтического насоса в течение 60 мин. После прохождения всего объема плазмы сквозь образец гемосорбента отбирались пробы. За 60 мин было проведено 7 полных циклов.

Для определения наличия и степени связывания с Fc-фрагментом общего IgG исследуемого тетрапептида в качестве активного лиганда использовался твердофазный метод иммуноанализа, основанный на принципе «сэндвич» (двухцентровый иммуноанализ).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Смоделированный тетрапептидный аналог состава Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt, синтезированный с помощью классических методов пептидного синтеза в растворе, использован для создания сорбентов.

Предложенная схема синтеза Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt является наиболее оптимальной и имеет высокий выход целевого продукта (47 %).

При проведении динамического эксперимента для установления качественной оценки функции связывания полученного образца сорбента на основе тетрапептидного аналога активного центра протеина *A Staphylococcus aureus* с Fc-фрагментом иммуноглобулинов с помощью иммуноанализа установлено, что происходит постадийное связывание активным лигандом на поверхности гранул Fc-фрагмента IgG. Интенсивность окраски хромогена при этом пропорциональна концентрации IgG в анализируемом образце и обратно пропорциональна количеству образовавшегося комплекса антитела с сорбентами, т. е. чем выше интенсивность окраски в конце анализа, тем хуже исследуемый образец сорбента связывает IgG. В результате проведения иммуноанализа было отмечено, что сорбент с пептидом Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt в качестве активного лиганда связывает иммуноглобулин G из плазмы донора: от 25 % (на первом цикле исследования) до 65 % (на седьмом).

В качестве подтверждения результатов анализа проводилось исследование ряда контрольных образцов. Для полученных гранул сорбента проводилось параллельное исследование взаимодействия с чистым иммуноглобулином G. Установлено, что разработанный нами образец гемосорбента связал 83 % IgG, что полностью согласуется с данными предыдущих исследований [15]. Нулевой контроль показал, что взаимодействия гранул матрицы с иммуноглобулином не наблюдается.

**Заключение.** Полученные в ходе данного исследования результаты могут свидетельствовать о том, что при проведении динамического эксперимента, являющегося аналогичным процедуре иммуносорбции, образуется устойчивый комплекс Fc-фрагмента иммуноглобулина G и полученного образца сорбента с Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt в качестве лиганда. Причем результаты по показателям связывания IgG сорбентом, которые достигают 65 % по прошествии 60 мин, не уступают зарубежным аналогам. Таким образом, сорбент с лигандом Gln-Phe-Phe-Tyr-OEt является функционально активным в отношении Fc-фрагмента иммуноглобулина G.

### Список литературы

1. Иммуносорбция в лечении аутоиммунных заболеваний / К.И. Бардахивская [и др.] // Биотехнология. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 9–22.
2. Аферез иммуноглобулинов — новый подход к лечению тяжелых форм дилатационной кардиомиопатии / Г.А. Коновалов [и др.] // Кардиология. — 2002. — Т. 6. — С. 92–96.
3. Разработка гемосорбентов для связывания IgG на основе олигопептидных лигандов / А.В. Лапко [и др.] // Известия НАН Беларуси. Сер. хим. наук. — 2016. — Т. 1. — С. 57–60.

4. Лапко, А.В. Конструирование иммуноглобулин связывающих пептидов на основе анализа взаимодействия протеина А *Staphylococcus aureus* с F c-фрагментом иммуноглобулинов / А.В. Лапко, Е.С. Пустюльга, В.П. Голубович // Известия НАН Беларуси. Сер. хим. наук. — 2019. — Т. 55, № 4. — С. 447–454.
5. Goodpasture's syndrome treated with staphylococcal protein A immunoabsorption. / P. Bygren [et al.] // Lancet. — 1985. — Vol. 2, № 8467. — P. 1295–1296.
6. The Lupus Plasmapheresis Study Group: rationale and updated interim report / H.H. Euler [et al.] // Artif Organs. — 1996. — Vol. 20, № 4. — P. 356–359.
7. Koll, R.A. Ig-Therasorb immunoabsorption for selective removal of human immunoglobulins in diseases associated with pathogenic antibodies of all classes and IgG subclasses, immune complexes, and fragments of immunoglobulins / R.A. Koll // Ther. Apher. — 1998. — Vol. 2, № 2. — P. 147–152.
8. Kronvall, G. Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups / G. Kronvall, R.C. Williams // J. Immunol. — 1969. — Vol. 103, № 4. — P. 828–833.
9. Removal of immunoglobulins by a protein A versus an antihuman immunoglobulin G-based system: evaluation of 602 sessions of extracorporeal immunoabsorption / G. Matic [et al.] // Artif Organs. — 2000. — Vol. 24, № 2. — P. 103–107.
10. McMillan, R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura / R. McMillan // Semin. Hematol. — 2000. — Vol. 37, № 3. — P. 239–248.
11. Therapeutic immunoabsorption in Goodpasture disease / F. Moreso [et al.] // Med. Clin. (Barc). — 1995 Jun. 10. — Vol. 105, № 2. — P. 59–61.
12. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy / J. Muller [et al.] // Circulation. — 2000. — Vol. 101. — P. 385–391.
13. Peptide based adsorbents for therapeutic immunoabsorption / W. Ronspeck [et al.] // Ther Apher Dial. — 2003. — Vol. 7, № 1. — P. 91–97.
14. Antibodies to ADP-ATP carrier — an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy — impair cardiac function / K. Schulze [et al.] // Circulation. — 1990. — Vol. 81. — P. 959–969.
15. Minimal toxicity during protein A immunoabsorption treatment of malignant disease: an outpatient therapy / H. W. Snyder [et al.] // J Clin Apher. — 1991. — Vol. 6, № 1. — P. 1–10.

## **OBTAINING AND STUDYING THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF A HEMOSORBENT FOR IGG BINDING BASED ON OLIGOPEPTIDE LIGAND**

---

*Lapko A.V., Golubovich V.P.*

*The Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *A method for obtaining and evaluating the functional activity of a hemosorbent based on the oligopeptide analogue of the epitope of protein A *Staphylococcus aureus* and a polyethylene matrix in a bench experiment that is as close as possible to the immunosorption procedure in clinical practice was considered. A regular decrease in the level of immunoglobulins G was established depending on the time of the procedure.*

## ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И ПАНТЕНОЛА НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЯХ МОЗГА ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОМ ДИСБАЛАНСЕ

*Лукиенко Е.П.<sup>1</sup>, Тутко О.В.<sup>1</sup>, Канунникова Н.П.<sup>1,2</sup>*

*<sup>1</sup>Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие  
«Институт биохимии биологически активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь  
<sup>2</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный университет  
имени Янки Купалы», г. Гродно, Республика Беларусь*

**Резюме.** Введение крысам бактериального липополисахарида (0,5 мг/кг веса, в/бр, однократно) и гомопантотеновой кислоты (200 мг/кг, в/ж, ежедневно в течение 7 дней) приводят к развитию окислительного стресса, проявляющегося и в крови, и в ткани мозга животных. Введение на этом фоне ацетилцистеина (200 мг/кг, в/ж, ежедневно, 7 дней) и пантенола (200 мг/кг, в/ж, ежедневно, 7 дней) уменьшают проявления окислительного стресса и нарушения метаболизма по пентозофосфатному пути в ткани мозга, но не в плазме крови.

**Введение.** Окислительный стресс является одним из ключевых факторов инициации процессов нейродегенерации, и способность ткани мозга к восстановлению функций в условиях окислительного повреждения во многом определяется возможностями поддержания окислительно-восстановительного баланса и энергетического метаболизма на фоне активации свободнорадикальных процессов [1, 6]. Широкое распространение подобных нарушений в клинике обуславливают высокую актуальность поисков новых путей модуляции окислительно-восстановительного баланса в ткани мозга, в первую очередь среди средств метаболической терапии [2, 5]. Исходя из этого, нами было изучено влияние предшественника глутатиона N-ацетилцистеина (АЦЦ) и предшественника биосинтеза кофермента А D-пантенола (ПЛ) как возможных корректоров окислительных нарушений в крови и мозге крыс в экспериментальной модели нейродегенерации, обусловленной введением бактериального липополисахарида (ЛПС) и гомопантотеновой кислоты (ГПК), блокатора биосинтеза кофермента А.

**Материалы и методы исследования.** Экспериментальные модели были выполнены на самцах крыс линии Wistar CRL: (WI) WUBR массой 150–180 г, содержащихся в стандартных условиях вивария в соответствии с существующими нормами содержания лабораторных животных. Все эксперименты с лабораторными животными выполнялись в соответствии с этическими нормами, а также правилами проведения научных работ с использованием экспериментальных животных в научных исследованиях, составленными на основании рекомендаций и требований «Всемирного общества защиты животных (WSPA)» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Нейродегенерацию моделировали введением ЛПС (*Escherichia coli* O111:B4) и ГПК. Животные были разделены на 4 экспериментальные группы (n=7). Контрольной группе вводили воду. Животные второй, третьей и четвертой групп получали ГПК (200 мг/кг, в/ж, ежедневно

в течение 7 дней), а также на фоне ГПК крысам вводили ЛПС (0,5 мг/кг веса, в/бр, однократно за 24 ч до декапитации на 7 день эксперимента). Животные третьей группы получали ацетилцистеин (АЦЦ, 200 мг/кг, в/ж, ежедневно в течение 7 дней), четвертой группы — АЦЦ + пантенол (200 мг/кг веса, в/ж, ежедневно в течение 7 дней). После выведения животных из эксперимента собирали кровь и извлекали мозг, из которого выделяли большие полушария. В плазме крови определяли показатели окислительного стресса: содержание диметилфенилендиамин-реагирующих соединений (ДФАРС) [8], общую антиоксидантную активность (ОАА) [3], содержание тиобарбитурат-реагирующих соединений (ТБКРС) [4]. Метаболизм по пентозофосфатному пути в больших полушариях мозга оценивали по активности основных ферментов — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-Ф-ДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-Ф-Гл-ДГ) [7] — в постмитохондриальной фракции ткани больших полушарий мозга.

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием программ Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 6.0. Экспериментальные данные представляли в виде  $M \pm SEM$ , где  $M$  — среднее значение,  $SEM$  — стандартная ошибка среднего. Достоверность межгрупповых различий оценивали, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением теста Тьюки. Во всех случаях статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** О развитии окислительного стресса при сочетанном воздействии ЛПС и ГПК свидетельствуют данные о снижении общей антиоксидантной активности и повышении содержания ДФАРС в плазме крови (таблица 1). При введении АЦЦ или его комбинации с ПЛ на фоне ЛПС и ГПК изменения содержания ДФАРС и общей антиоксидантной активности усугубляются.

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

Группы	ДФАРС, у.е.	ОАА, ΔЕ/мл плазмы
Контроль	278.25 ± 39.18	7.31 ± 1.22
ГПК+ЛПС	351.75 ± 4.29*	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, # —  $p < 0,05$  по отношению к ГПК+ЛПС

Изучение содержания ТБКРС в постмитохондриальной фракции больших полушарий мозга крыс показало, что введение ГПК привело к повышению как базального, так и  $Fe^{2+}$ /аскорбат-индуцированного уровня конечных продуктов ПОЛ, что свидетельствует о наличии выраженного окислительного стресса также и в ткани мозга (таблица 2). Как АЦЦ, так и его комбинация с ПЛ в определенной степени снижали  $Fe^{2+}$ /аскорбат-индуцированный уровень продуктов ПОЛ и практически возвращали базальный уровень ТБКРС до уровня контроля.

**Таблица 2 — Изменения содержания фракций ТБКРС (мкмоль /мг белка) в постмитохондриальной фракции больших полушарий мозга крыс при действии ГПК + ЛПС и коррекции АЦЦ и пантенолом ( $M \pm SEM$ ,  $n=6$ )**

Группы	Базальный уровень	Спонтанный уровень	$Fe^{2+}$ /аскорбат-индуцированный уровень
Контроль	0.88 ± 0.05	4.58 ± 0.37	5.97 ± 0.26
ГПК+ЛПС	1.24 ± 0.1*	5.55 ± 0.34	8.38 ± 0.56*

Группы	Базальный уровень	Спонтанный уровень	Fe <sup>2+</sup> /аскорбат-индуцированный уровень
ГПК+ЛПС+АЦЦ	1.14 ± 0.13	4.83 ± 0.11	7.72 ± 0.23*
ГПК+ЛПС+АЦЦ+ПЛ	1.04 ± 0.1	5.33 ± 0.2	7.68 ± 0.31*

Примечание — \* — p<0,05 по отношению к контролю; # — p<0,05 по отношению к ГПК+ЛПС

Исследование интенсивности метаболизма по пентозофосфатному пути в больших полушариях мозга позволило установить, что при действии ГПК+ЛПС происходит снижение активности и 6-Ф-Гл-ДГ, и Гл-6-Ф-ДГ, что свидетельствует о снижении активности пентозофосфатного пути метаболизма и ослаблении процесса наработки восстановленных эквивалентов НАДФН, необходимых для поддержания окислительно-восстановительного баланса в тканях (таблица 3). Введение АЦЦ не оказывает выраженного воздействия на активность ферментов пентозофосфатного цикла, тогда как пантенол в комбинации с ацетилцистеином в отношении 6-Ф-Гл-ДГ проявляет защитное действие, возвращая активность фермента ближе к значениям в контрольной группе.

**Таблица 3 — Изменения активности ферментов пентозофосфатного пути (нмоль/мин/мг белка) в постмитохондриальной фракции мозга крыс при действии ГПК + ЛПС и коррекции АЦЦ и пантенолом (M±SEM, n=6)**

Группы	6-Ф-Гл-ДГ	Гл-6-Ф-ДГ
Контроль	11.28 ± 0.24	68.67 ± 4.18
ГПК+ЛПС	7.62 ± 0.59 *#	53.58 ± 6.45 *#
ГПК+ЛПС+АЦЦ	8.82 ± 0.59*#	54.12 ± 6.13 *#
ГПК+ЛПС+АЦЦ+ПЛ	9.96 ± 0.59	46.50 ± 2.19 *#

Примечание — \* — p<0,05 по отношению к контролю; # — p<0,05 по отношению к ГПК+ЛПС

**Заключение.** Введение животным бактериального липополисахарида и гомопантотеновой кислоты приводят к развитию окислительного стресса, отражающего метаболические нарушения и сдвиг окислительно-восстановительного баланса, характерные для нейродегенеративных заболеваний. Проявления окислительного стресса наблюдаются в данной модели и в крови, и в ткани мозга животных. Введение на этом фоне ацетилцистеина и пантенола уменьшают проявления окислительного стресса и нарушения метаболизма по пентозофосфатному пути в ткани мозга, но не в плазме крови.

### Список литературы

1. Дубинина, Е.Е. Роль окислительного стресса при патологических состояниях нервной системы / Е.Е. Дубинина // Успехи функциональной нейрохимии. Под ред. С.А. Дамбиновой и А.В. Арутюняна. — СПб.: Изд-во СПб. ун-та. — 2003. — С. 285–300.
2. Канунникова, Н.П. Метаболическая коррекция ишемических повреждений ткани мозга / Н.П. Канунникова // LAP Lambert, Academic Publishing. — 2015. — 180 с.
3. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stocks [et al.] // Clinical Science and Molecular Medicine. — 1974. — Vol. 47. — P. 215–222.
4. Durfinova, M. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues / M. Durfinova, M. Brechtlova, B. Liska, Z. Baroskova // Chem. Pap. — 2007. — Vol. 61 (4). — P. 321–325.
5. Gitler, A.D. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope / A.D. Gitler, P. Dhillon, P.J. Shorter // Disease Models and Mechanisms. — 2017. — Vol. 10. — P. 499–502. doi: 10.1242/dmm.030205.

6. Mancuso, M. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration / M. Mancuso // *J. Alzheimers Dis.* — 2006. — Vol. 10, № 1. — P. 59–73.
7. Ninfali, P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity is higher in the olfactory bulb than in other brain regions / P. Ninfali, A. Alnigi, A. Pompella // *Brain Res.* — Vol. 744. — P. 138 — 142.
8. 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.

---

---

**INFLUENCE OF ACETYLCYSTEINE AND PANTHENOL ON INDICATORS  
OF OXIDATIVE STRESS AND ENERGY METABOLISM IN BLOOD  
PLASMA AND CEREBRAL HEMISPHERES IN SYSTEMIC  
INFLAMMATION AND METABOLIC DYSBALANCE**

---

---

*Lukiyenko E.P.<sup>1</sup>, Titko O.V.<sup>1</sup>, Kanunnikova N.P.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances, National Academy of Science, Grodno,  
Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** Administration of bacterial lipopolysaccharide (0.5 mg/kg, i.p., once) and homopantothenic acid (200 mg/kg, i/gastr, for 7 days) to rats leads to the development of oxidative stress, which manifests itself in the blood and in the brain tissue of animals. The injection against this background of acetylcystein (200 mg/kg, i/gastr, 7 days) and panthenol (200 mg/kg, i/gastr, 7 days) reduce the manifestations of oxidative stress and metabolic disorders along the pentose phosphate pathway in the brain tissue but not in blood plasma.

## ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНАЛОГОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6

*Макаревич Д.А.<sup>1</sup>, Ермола Е.М.<sup>1</sup>, Рябцева Т.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** Рассмотрены вопросы структуры и физиологической роли интерлейкина-6 (ИЛ-6) в процессах функционирования организма. Показана возможность молекулярного моделирования низкомолекулярных аналогов ИЛ-6 и представлены результаты анализа полученного аналога. Отражена возможность создания «химерного» низкомолекулярного пептидного соединения, а также проведение экспериментов по моделированию аутокринного эффекта ИЛ-6.

**Введение.** Интерлейкин-6 (ИЛ-6) является одним из главных провоспалительных цитокинов, который обладает широким спектром иммунорегуляторных свойств. Выполняет функции медиатора образования, роста и прогрессии опухолей различной природы и локализации, а также различных хронических и острофазных заболеваний. Сигнальная передача ИЛ-6 является уникальной, поскольку она может происходить как через мембраносвязанный рецептор ИЛ-6 (ИЛ-6R), так и через растворимый рецептор ИЛ-6 (sIL-6R), который обеспечивает передачу сигналов в тканях, которые обычно не экспрессируют ИЛ-6R посредством процесса, называемого транс-ИЛ-6-сигналинг. Для ИЛ-6, как и для всех цитокинов, характерно проявление аутокринного эффекта — действует на клетку синтезирующую и секретирующую данный цитокин.

Последние годы ведется активная работа по поиску разнообразных способов ингибирования действия ИЛ-6. На данную тематику сейчас производится большой пласт работ, что подтверждается наличием широкого спектра статей. Блокирование ИЛ-6 представляет собой новый подход к лечению различных заболеваний, от онкологических, в том числе гемобластозов, например, В-лимфоидных опухолей, а также солидных опухолей (рак яичников), до дизиммунных заболеваний [3].

Однако, несмотря на то, что повышенная продукция ИЛ-6 может вызвать значительные изменения в гомеостазе организма, его недостаточность также может вызывать различные заболевания. Возможностью использования его аналогов для купирования некоторых симптомов различных заболеваний также не следует пренебрегать.

Также ИЛ-6 играет важную роль в энергетическом гомеостазе. Для животных (трансгенных мышей) с гиперсекрецией ИЛ-6 характерно нарушение роста, сочетающееся со снижением массы жировой ткани, а с недостаточностью ИЛ-6 — ожирение и связанные с ним метаболические нарушения, исчезающие при введении ИЛ-6.

ИЛ-6 стимулирует активность гипоталамо-гипофизарной системы и термогенез; тормозит активность гипоталамо-гипофизарно-половой системы, секрецию тиреотропного гормона и, возможно, гормона роста. Обнаружено тормозящее воздействие ИЛ-6 на импульсную секрецию лютеинизирующего гормона [2].

Введенный интраназально IL-6 способствует лучшему сохранению эмоциональных и процедурных воспоминаний во время сна, т. е. данный цитокин оптимизирует консолидацию эмоциональной памяти. Роль цитокинов в естественной регуляции сна оказалась весьма значительной. Например, IL-6 индуцирует глубокую, третью стадию медленного сна, но ингибирует REM сон (фаза сна с быстрым движением глаз).

Сочетание цитокинов, включающих IL-6, введенных через ольфакторный и тригеминальный пути, минует гематоэнцефалический барьер. Транспорт осуществляется очень быстро. Первый эффект часто появляется в первые 10 минут ингаляции.

Комплекс цитокинов имеет многоцелевое действие:

1. Предположительно снижает нейровоспаление глии.
2. Клинически и по результатам полисомнографии восстанавливает естественную структуру сна.
3. Восстанавливает полноценную работу глимфатической системы, по крайней мере, вплоть до следующей аутоиммунной атаки, которой может и не случиться [1].

На данный момент достаточно актуальным является лечение шизофрении и других нейродегенеративных расстройств цитокинами, в частности IL-6. Кроме того, функция IL-6 в нервной системе не до конца изучена и ведущие нейробиологи и биохимики ведут активные исследования в этом направлении.

Поэтому, на наш взгляд, является актуальной разработка низкомолекулярных аналогов IL-6. Для реализации вышеуказанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Определить участок контакта IL-6 с белком gp130 и м-IL6R.
2. Произвести расчет оптимальных олигопептидных аналогов IL-6.

**Материал и методы исследования.** При помощи программы Chimera 1.11.2 были получены целевые пептиды, которые в дальнейшем были рассмотрены в качестве аналогов IL-6, и проведена оценка свободной энергии их взаимодействия с поверхностью рецептора IL-6 при использовании подпрограммы *AutoDockVina* и *ViewDock*.

Синтез олигопептида RAV был проведен классическими методами пептидного синтеза в лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Аналоговые свойства олигопептида RAV проверялись в ходе экспериментов моделирования «аутокринного эффекта» IL-6 в цельной венозной крови условно здоровых доноров. Для отрицательного контроля был взят пептид *Gly-Pro*. Для активации синтеза IL-6 использовали классический иммуномодулирующий агент — экстракт дрожжей (производство Института биоорганической химии НАН Беларуси). В качестве нулевого образца использовали цельную венозную кровь и NaCl 0,9 %. Определение концентрации IL-6 в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом с использованием набора реагентов «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ».

При проведении иммуноферментного анализа по определению концентрации IL-6, измерение величин оптических плотностей осуществлялось на компактном микропланшетном фотометре iMark (Bio-Rad Laboratories, Inc.) версии 1.02.01.

Исходя из характеристик сравниваемых групп оптимальным для оценки достоверности является непараметрический метод статистического анализа для независимых групп — U-тест, или тест Манна – Уитни.

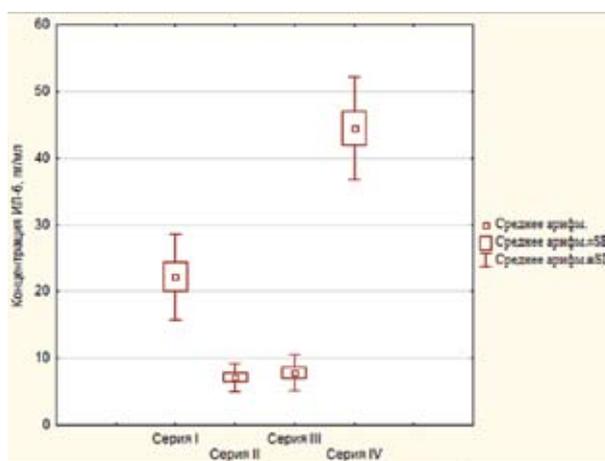
**Результаты исследования и их обсуждение.** Проведен поиск трехмерных моделей интересующих нас молекул в Международном банке данных белковых макромолекул. В частности нас интересовали молекулы IL-6 и комплекс IL-6 с его рецептором gp130/м-IL6R.

Был проведен анализ 3D-структуры комплекса, состоящего из молекулы IL-6 и его рецептора — мембранный IL-6-рецептор и gp130. Целью изучения явилось определение поверхностных взаимодействий структурных составляющих рецептора с поверхностью IL-6. Для этого применяли программный пакет Chimera 1.11.2. Показано, что во взаимодействии с  $\alpha$ -цепью рецептора участвуют аминокислоты из прямых повторов IL-6, а с  $\beta$ -цепью —  $\alpha$ -спирали молекулы.

Определение целевых аминокислот проводилось по следующим критериям: гидрофильность, близость расположения к сайтам взаимодействия с рецептором. В результате были определены возможности взаимодействия полученных пептидов с поверхностью рецептора IL-6. По результатам докинга были получены энергии связывания целевых молекул с поверхностью рецептора. По итогам анализа были отобраны результаты с наименьшей энергией. Так, наименьшую энергию взаимодействия при анализе энергий стыковки показали пептиды: RAV (arg-ala-val) (-5,6 ккал/моль), RYI (arg-tyr-ile) (-5,3 ккал/моль), AITT (ala-ile-thr-thr) (-5,3 ккал/моль). Данные пептиды могут быть использованы в качестве низкомолекулярных аналогов IL-6.

Синтезированный перспективный низкомолекулярный пептидный аналог RAV (arg-ala-val) был выбран как лучший в своей группе по энергетическим характеристикам при взаимодействии с поверхностью рецептора IL-6. Нами было выдвинуто предположение, что низкомолекулярный пептидный аналог IL-6 будет стимулировать выработку IL-6, имитируя «паракринный эффект» цитокинов.

Как видно из приведенных выше данных, в результате проведения иммуноферментного анализа было обнаружено значительное увеличение продукции клетками крови IL-6 под воздействием изучаемого низкомолекулярного пептидного аналога RAV (arg-ala-val) и экстракта *Saccharomyces cerevisiae*. Наблюдается также несущественное повышение концентрации IL-6 под влиянием контрольного пептида Gly-Pro.



**Рисунок 1 — Общее содержание IL-6 в отдельных сериях эксперимента:**  
SE — стандартная ошибка средней, SD — стандартное отклонение

По результатам проведенного статистического анализа были получены значения р-критерия (рис. 1). В случае сравнения значений контрольной группы с сериями эксперимента I и IV, р-критерий составляет 0,00041 и 0,000412 соответственно, он позволяет принять альтернативную гипотезу ( $p < 0,05$ ), согласно которой влияние анализируемого низкомолекулярного пептидного аналога RAV (arg-ala-val) и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на продукцию клетками крови IL-6 является не случайным и статистически значимым. При сравнении значений конт-

рольной группы с серией III эксперимента, р-критерий принимает значение  $p > 0,05$  (0,427 соответственно), что позволяет принять нулевую гипотезу, согласно которой влияние контрольного пептида Gly-Pro на продукцию клетками крови ИЛ-6 является случайным и статистически незначимым.

Поскольку содержание ИЛ-6 в нулевом образце составило  $10 \pm 1,99$  пг/мл (достоверно при  $p \leq 0,05$ ,  $n = 9$ ), можно отметить отсутствие влияния раствора натрия хлорида концентрацией 9 мг/мл на цельную венозную кровь в образцах. Данное сведение является обоснованием использования серии II эксперимента в качестве контрольной.

В таблице 1 приведены данные об изменении концентрации ИЛ-6 в образцах в зависимости от серии эксперимента к контрольной серии (серия II: интактная кровь с добавлением раствора натрия хлорида 9 мг/мл).

**Таблица 1 — Изменение содержания ИЛ-6 в различных экспериментальных сериях**

Серия	Количество образцов в серии (n)	Содержание ИЛ-6, пг/мл $X \pm SD$	Процент к контролю, %
I. Интактная кровь+аналог	9	$22,19 \pm 0,69^*$	332,7
II. Интактная кровь+NaCl	9	$7,14 \pm 0,27$	100
III. Интактная кровь+контрольный пептид	9	$7,86 \pm 0,24$	109,4
IV. Интактная кровь+дрожжевой экстракт	9	$44,48 \pm 1,2^*$	650,8

*Примечание:* \* — результаты достоверны при  $p \leq 0,05$  ( $n = 9$ ). Достоверность эффектов низкомолекулярного пептидного аналога RAV (*arg-ala-val*) и экстракт дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* рассчитывалось по отношению к показателям контрольной серии (\*).

Анализируя данные, представленные выше, можно отметить, что целевой низкомолекулярный пептидный аналог ИЛ-6 — RAV (*arg-ala-val*) — увеличивает продукцию исследуемого цитокина на 232,7 %, контрольный пептид Gly-Pro — на 9,4 %, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* — на 550,8 % по отношению к контрольной серии.

Значительное увеличение концентрации ИЛ-6 в образцах серии IV связано с моделированием воспалительного процесса, и реакцией организма на чужеродный агент — дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Увеличение продукции ИЛ-6 под влиянием контрольного пептида можно считать несущественным, поскольку значение концентрации ИЛ-6 в цельной крови без стимуляции может достигать в среднем до 12 пг/мл, что также подтверждается результатами статистического анализа.

**Заключение.** В результате изучения перспективных аналоговых свойств целевого низкомолекулярного пептида RAV было показано, что добавление его к образцам цельной крови приводит к увеличению продукции ИЛ-6 в среднем до  $22,19 \pm 0,69$  пг/мл (на 232,7 % к контрольной серии). Данный пептид может быть рассмотрен как перспективный аналог ИЛ-6 при продолжении изучения его аналоговых свойств.

Таким образом, предложенный нами низкомолекулярный пептид может считаться аналогом ИЛ-6 и в перспективе использоваться для лечения нарушений сна, шизофрении и других нейродегенеративных расстройств при условии дальнейшего изучения этого соединения.

### Список литературы

1. Воронов, А.И. Шизофрения, сон и лимфатическая система головного мозга / А.И. Воронов // Тюменский медицинский журнал. Клиническая медицина. — 2017. — Т. 19. — С. 41–48.

2. Дедова, И.И. Жировая ткань как эндокринный орган / И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко, С.А. Бутрова // Ожирение и метаболизм. — 2006. — № 1. — С. 6–13.
3. Росси, Ж.-Ф. Интерлейкин-6 как терапевтическая мишень при иммунопатологии и онкологических заболеваниях / Ж.-Ф. Росси // Иммунология гемопозза. — 2012. — Т. 10, № 2. — С. 8–34.

## POSSIBILITIES OF MOLECULAR SIMULATION FOR THE DEVELOPMENT OF LOW-MOLECULAR ANALOGUES OF INTERLEUKIN-6

---

*Makarevich D.<sup>1</sup>, Ermola E.<sup>1</sup>, Ryabtseva T.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>The Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>Belorussian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *The structure and physiological role of interleukin-6 in the functioning of the body were considered. The possibility of molecular modeling of low-molecular analogs of IL-6 was shown and the results of analysis of the obtained analog were presented. The possibility of creating a «chimeric» low-molecular-weight peptide compound was demonstrated, as well as conducting experiments to model the autocrine effect of IL-6.*

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АДЕНОЗИН-ТИАМИНТРИФОСФАТА

*Макарчиков А.Ф.<sup>1,2</sup>, Кудырко Т.Г.<sup>2</sup>, Лучко Т.А.<sup>2</sup>,  
Русина И.М.<sup>2</sup>, Колос И.К.<sup>2</sup>, Гуринович В.А.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

**Резюме.** В статье описаны некоторые свойства химически синтезированного аденозин-тиаминтрифосфата (АТТФ) – природного соединения с неизвестными функциями, которое было обнаружено в различных биологических объектах. Приведены данные по гидролизу АТТФ в водных растворах, его стабильности при хранении, а также спектральные характеристики.

**Введение.** Витамин В<sub>1</sub> в форме тиаминдифосфата (ТДФ) играет важную роль в обмене углеводов, аминокислот и энергетическом метаболизме, являясь коферментом дегидрогеназных комплексов 2-кетокислот и транскетолазы. Кроме того, в клетках млекопитающих в небольших концентрациях присутствуют свободный тиамин, тиаминмонофосфат (ТМФ), тиаминтрифосфат (ТТФ) и тиаминовый нуклеотид – аденоденозин-тиаминтрифосфат (АТТФ) [2]. В настоящее время метаболизм, биохимические функции и физиологическая роль АТТФ в силу ряда причин мало изучены. Прежде всего, это обусловлено крайне низким содержанием этого соединения в биологических объектах, что затрудняет его надежное количественное определение методом ВЭЖХ даже с помощью самых чувствительных флуоресцентных детекторов. С другой стороны, следует отметить отсутствие коммерческого препарата АТТФ, а также отсутствие сведений о его стабильности и физико-химических, в частности оптических, свойствах. Все это существенно ограничивает возможности исследований в области энзимологии АТТФ, изучения различных аспектов его метаболизма, физиологического действия и потенциального применения как фармакологического средства. Цель настоящей работы состояла в получении препарата АТТФ и характеристике его физико-химических свойств.

**Материалы и методы исследования.** Производные тиаминина определяли методом ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией. Перед инъекцией в хроматограф пробы окисляли с помощью 4,3 мМ феррицианида калия в 15 % КОН. Разделение проводилось на хроматографе Agilent 1100 при скорости потока 0,5 мл/мин на аналитической колонке PRP-1 (Ø 4,1 × 150 мм, поли(стирол-дивинилбензол), размер частиц 5 мкм; Hamilton Co) с протекторным колоночным картриджем (Ø 2,3 × 25 мм). Мобильная фаза состояла из 50 мМ К-фосфатного буфера, рН 8,5, содержащего 25 мМ тетра-н-бутиламмонийгидрогенсульфат и 4 % тетрагидрофуран. Производные тиохрома детектировали по флуоресценции при длине волны возбуждения 365 нм, эмиссии – 433 нм [5].

Расчет средних величин и стандартных отклонений ( $M \pm SD$ ) осуществляли с помощью программы GraphPad Prism.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Ранее нами предложен способ препаративного синтеза и очистки АТТФ, позволяющий по сравнению с оригинальным методом, описанным в статье [9], значительно увеличить выход продукта, сократив при этом ресурсные и временные затраты. Исследования препарата, полученного по разработанному методу, на чувствительность к кислотному гидролизу показали, что 10-мин нагревание раствора в 1 М НСl на кипящей водяной бане приводит к деградации АТТФ на 97,5 %. По данным Penttinen [7] а аналогичных условиях ТДФ и ТТФ полностью гидролизуются до ТМФ, тогда как последний дефосфорилированию не подвержен. Инкубация при 100 °С в течение 20 мин приводила к полному гидролизу АТТФ, при этом единственным флуоресцирующим продуктом реакции являлся ТМФ. При гидролизе в более мягких условиях (0,1 М НСl) через 10 мин нагревания в образце оставалось 71 % исходного количества АТТФ, а спустя 20 мин – 46 %. Судя по составу реакционной смеси, кислотный гидролиз АТТФ до ТМФ протекает через промежуточное образование аденозин-тиаминдифосфата (данные не приведены). В ходе реакции молекула АТТФ, по-видимому, расщепляется в области «трифосфатного мостика» на два фрагмента, которые затем объединяются после удаления одного из фосфатов. Этот феномен представляет интерес для дальнейших исследований с позиций установления реакционного механизма.

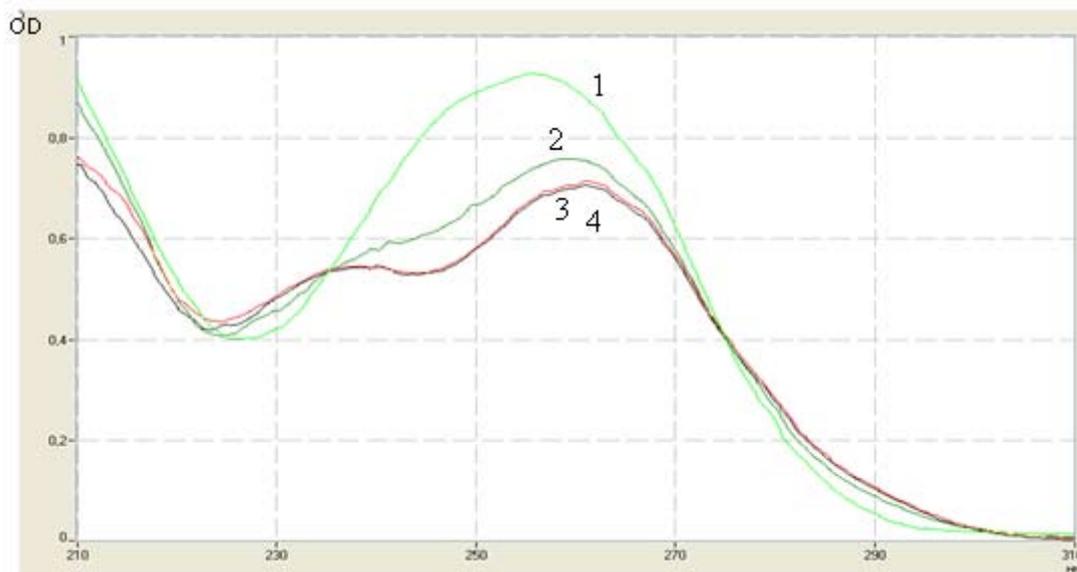
Препарат АТТФ отличается исключительно высокой стабильностью в растворе при слабощелочных рН. Так, хранение замороженного раствора АТТФ в 10 мМ трис-НСl буфере, рН 7,3, при  $t = -25$  °С не приводило к сколь-нибудь заметному гидролизу по крайней мере в течение 1,5 года. Более того, признаков деградации АТТФ не наблюдалось при нагревании раствора на кипящей водяной бане в течение 60 мин.

Известно, что витамин В<sub>1</sub> способен поглощать электромагнитные волны в УФ области благодаря наличию в молекуле пиримидинового и тиазолового колец с сопряженными системами электронов, при этом наблюдаемый абсорбционный спектр сильно зависит от рН раствора. При рН 7 и выше на тиаминовом спектре присутствуют две выраженные полосы поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$  около 235 нм и 265 нм, тогда как в кислых растворах, при рН 5,5 и ниже, отчетливо наблюдается только одна полоса с  $\lambda_{\text{макс}}$  в области 245–247 нм [3].

Абсорбционный спектр АТТФ, снятый в диапазоне 210–310 нм при различных значениях рН, представлен на рис.1. Как видно, в условиях высокой кислотности (рН 1,0) для АТТФ характерно наличие одной спектральной полосы с максимумом 255–256 нм. В результате подщелачивания раствора этот максимум немного смещается bathochromно до 259–262 нм. В слабокислой среде (рН 4,91) на спектре проявляется второй, едва различимый из-за сливания спектральных полос, максимум с  $\lambda = 237$ –238 нм. Этот максимум поглощения АТТФ, отчетливо выражен в щелочной среде. На УФ-спектрах АТТФ имеются две изобестические точки – при 235,1 нм и 274,5 нм.

Судя по характеру зависимости спектра АТТФ от рН, в максимум поглощения ( $\lambda = 255$ –256 нм), наблюдаемый в кислой среде, существенный вклад вносят как пуриновый цикл аденозинового компонента молекулы, так и пиримидиновое кольцо тиаминовой части. Об этом может свидетельствовать снижение интенсивности данной спектральной полосы с ее bathochromным сдвигом при увеличении рН. Подобный гипохромный эффект отчетливо прослеживается для спектров тиамин и его фосфорных эфиров [3]. В то же время, интенсивность единственной спектральной полосы аденозинфосфатов в ближней УФ области не зависит от кислотности среды; имеет место лишь небольшое (на 1–2 нм) смещение  $\lambda_{\text{макс}}$  в длинноволновую область с ростом рН раствора от 2,2 до 7,9 [1]. Следует отметить, что для АТТФ характерна сильная абсорбция и более коротковолнового излучения (< 210 нм). Это не удивитель-

но, поскольку присутствие подобных полос в спектрах молекул, в которых имеются хромофоры с неподеленными парами электронов, обусловлено  $n \rightarrow \sigma^*$  электронными переходами. Установить точные величины  $\lambda_{\text{макс}}$  и  $\epsilon$  для таких полос в обычных условиях не представляется возможным ввиду поглощения света в дальней УФ-области растворенным кислородом. Кроме того, в этом диапазоне поглощением обладают даже все обычно применяемые растворители и буферы.



**Рисунок 1 – Спектр поглощения АТТФ при различных рН**

Примечание: 1 – рН 1,0, 2 – рН 4,91, 3 – рН 8,5, 4 – рН 10,5

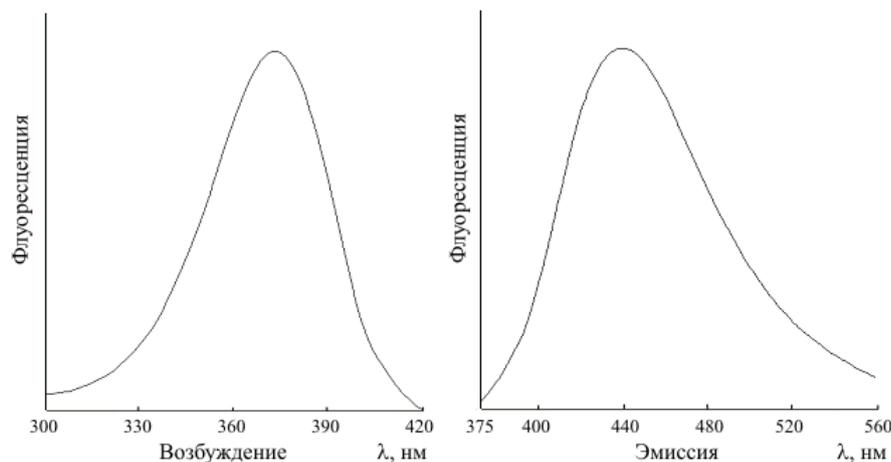
Подобно тиамину и его фосфорным эфирам АТТФ легко окисляется в щелочной среде под действием  $K_3[Fe(CN)_6]$  в производное тиохрома, обладающее интенсивной голубой флуоресценцией (на чем, собственно говоря, и основана его детекция при ВЭЖХ). По данным М. Frédérich et al. [9], которые провели сравнение флуоресценции АТхТФ и тиохрома в водных растворах, максимум спектра эмиссии флуоресценции АТхТФ приходится на длину волны 439 нм, что несколько ниже величины, полученной для тиохрома (443 нм) и хорошо соотносящейся со значениями  $\lambda_{\text{макс. эмис}}$  нейтральной формы тиохрома, приводимыми в литературе – 440 нм [6], 445 нм [3]. Вместе с тем, максимумы спектров возбуждения флуоресценции АТхТФ и тиохрома наблюдались при 353 нм. Это существенно расходится с данными других авторов, согласно которым максимум возбуждения флуоресценции тиохрома лежит в области более длинных волн – 370 нм [10], 375 нм [6] – вблизи его адсорбционного максимума при 370–375 нм [3].

На рис. 2 представлены полученные нами спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции водных растворов АТТФ после обработки  $K_3[Fe(CN)_6]$  (в 15 %-ном NaOH) и удаления желтой окраски с помощью  $H_2O_2$ .

Как видно на рис. 2, максимум спектра возбуждения флуоресценции АТхТФ приходится на 373 нм, а максимум спектра эмиссии флуоресценции – 443 нм. Оба значения соответствуют литературным данным для тиохрома [3, 4, 6, 8, 10]. Таким образом, наличие аденозинтрифосфатного компонента в молекуле не влияет на флуоресцентные свойства, характерные для тиохрома.

Отсутствие сведений о величине коэффициента молярного поглощения не позволяет готовить растворы АТТФ точно заданной концентрации. Соответственно, не представляется воз-

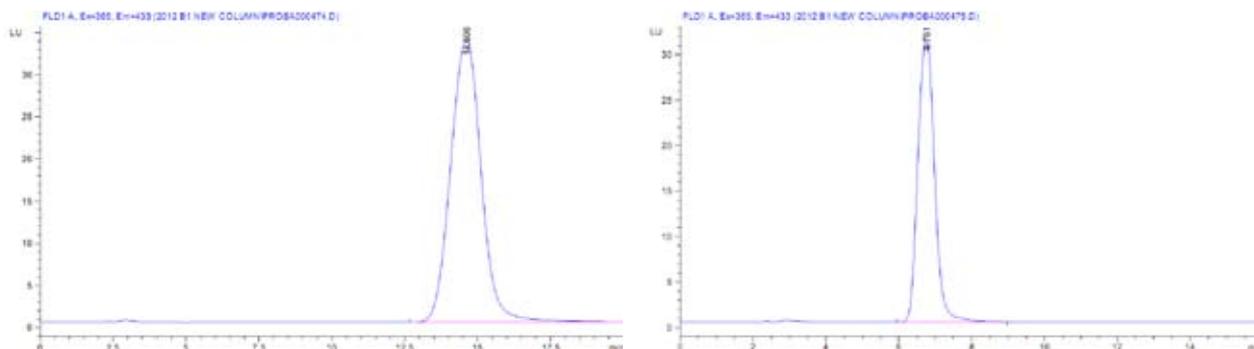
можно проводить количественные исследования кинетических свойств ферментов, участвующих в его метаболизме (гидролизе) в биологических объектах. Поскольку получаемый в результате химического синтеза препарат АТТФ содержат соли и кристаллизационную воду, определить  $\epsilon$ , исходя из навески вещества, весьма проблематично. В связи с этим, для решения данной задачи мы разработали другой подход, основанный на исследовании процесса кислотного гидролиза.



**Рисунок 2 – Спектры флуоресценции АТхТФ. А – Спектр возбуждения флуоресценции при  $\lambda_{эмис} = 440$  нм. Б – Спектр эмиссии флуоресценции при  $\lambda_{возб} = 350$  нм**

Гидролиз АТТФ проводили при 100 °С, инкубируя препарат вещества, полученного в форме кислоты, в 1 М НСl в течение 40 мин. На рис.3 представлены хроматограммы реакционной смеси до и после гидролиза, на которых видно, что реакция протекает полностью, а единственный флуоресцирующий продукт, образующийся в данных условиях, соответствует по подвижности ТМФ-стандарту. Инкубация коммерческого препарата ТМФ в тех же условиях не вызвала сколько-нибудь заметного разложения вещества, что согласуется с данными литературы о его высокой устойчивости в кислой среде [7]. Таким образом, концентрацию АТТФ в неизвестном растворе можно найти после кислотного гидролиза по флуоресценции путем сопоставления ее с флуоресценцией стандартного образца ТМФ. Поскольку флуоресценция любого вещества сильно зависит от действия различных факторов, в т. ч. присутствия в растворе посторонних соединений, для получения более точных результатов мы разделяли продукты кислотного гидролиза АТТФ методом ВЭЖХ и сравнивали площади пиков, соответствующих образующемуся в результате реакции ТМФ и ТМФ-стандарту. Хотя по стехиометрии реакции 1 моль АТТФ дает 1 моль ТМФ, из представленных на рис. 3 данных видно, что площадь пика АТхТФ значительно превосходит площадь пика ТхМФ, получившегося при его гидролизе, т. е. для АТхТФ характерна более интенсивная флуоресценция.

Для расчета коэффициента молярного поглощения АТТФ мы сравнили оптическую плотность препарата АТТФ при 274,5 нм и ТМФ-стандарта при 272,5 нм, поскольку эти длины волн соответствуют изобестическим точкам данных соединений. Так как коэффициент молярного поглощения ТМФ при  $\lambda = 272,5$  нм известен ( $\epsilon = 7400 \text{ M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$  [3]), располагая сведениями о величинах оптической плотности растворов АТТФ и ТМФ и соответствующих им площадях пиков ТМФ после кислотного гидролиза, нетрудно рассчитать значение  $\epsilon_{274,5}$  для АТТФ. Исходные данные, использованные для этой цели, представлены в таблице 1. Эксперименты проводились с двумя коммерческими препаратами ТМФ (Fluka и Sigma) и образцами двух синтезов АТТФ.



**Рисунок 3 – Хроматограммы препарата АТТФ до (слева) и после (справа) кислотного гидролиза**

**Таблица 1 – Исходные данные для расчета коэффициента молярного поглощения АТТФ**

Образец	ОД в 0,1-см кювете	Концентрация, мМ	Эксперимент	Площадь пика АТТФ, усл. ед.	Площадь пика ТМФ, усл. ед.
ТМФ-стандарт 1	0,7319	0,989	1	—	2006,5
			2	—	1971,4
АТТФ, образец 1	0,6414	?	1	2426,5	986,1
			2	2555,4	1025,8
ТМФ-стандарт 2	0,7301	0,987	3	—	1976,6
			4	—	1989,0
АТТФ, образец 2	0,6489	?	3	2373,3	987,1
			4	2476,1	993,9

Из таблицы 1 видно, что концентрации ТМФ-стандарта 1 (Fluka) 0,989 мМ отвечает средняя площадь пика 1989,0 усл. ед. следовательно, площадям пиков  $S_1 = 986,1$  усл. ед. и  $S_2 = 1025,8$  усл. ед. соответствуют молярные концентрации образца АТТФ первого синтеза  $c_{m1} = 0,490$  мМ и  $c_{m2} = 0,510$  мМ. Отсюда по закону Бугера-Ламберта-Бера находим значение  $\epsilon_{274,5}$  для образца АТТФ 1:  $\epsilon_1 = 6,414/0,000490 = 13090 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ;  $\epsilon_2 = 6,414/0,000510 = 12576 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ . Аналогичным образом, в случае АТТФ образца 2 (второй синтез) и ТМФ стандарта 2 (Sigma)  $\epsilon_3 = 6,489/0,000491 = 13216 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ;  $\epsilon_4 = 6,489/0,000495 = 13109 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ . Средняя величина  $\epsilon_{274,5}$  АТТФ по результатам четырех экспериментов составила  $12998 \pm 143 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ . Исходя из найденного  $\epsilon_{274,5}$ , по форме спектров поглощения АТТФ можно рассчитать величины  $\epsilon$  при различных длинах волн в зависимости от рН раствора. Так, в первой изобестической точке  $\epsilon_{235,1} = 16299 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ , а в максимуме поглощения – при рН 1,0 ( $\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ нм}$ )  $\epsilon = 28895 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ , при рН 4,91 ( $\lambda_{\text{max}} = 259 \text{ нм}$ )  $\epsilon = 23577 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ , при рН 8,5 ( $\lambda_{\text{max}} = 261 \text{ нм}$ )  $\epsilon = 21829 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ .

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что АТТФ отличается исключительно высокой стабильностью в растворе при слабощелочных рН: признаков деградации соединения не наблюдалось при нагревании раствора на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Хранение замороженного препарата АТТФ в 10 мМ трис-НСl буфере, рН 7,3, при  $t = -25 \text{ }^\circ\text{C}$  не приводит к сколь-нибудь заметному гидролизу по крайней мере в течение 1,5 года. Впервые исследован УФ-спектр АТТФ и влияние на него рН раствора. Показано, что в спектре имеются две изобестические точки, соответствующие длинам волн 235,1 нм и 274,5 нм. Определен коэффициент молярного поглощения АТТФ, который при  $\lambda = 274,5 \text{ нм}$  составляет  $12998 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ . Установлено, что максимум спектра возбуждения флуоресценции АТТФ приходится на 372–373 нм, а максимум спектра эмиссии флуоресценции – 443 нм.

## Список литературы

1. Кантор, Ч. Биофизическая химия: В 3-х т. Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — Т. 2. — 496 с.
2. Макаричов, А. Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub> / А. Ф. Макаричов. — Минск: Белорусская наука, 2008. — 433 с.
3. Островский, Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиаминтрифосфата / Ю. М. Островский. — Минск: Наука и техника, 1975. — 424 с.
4. Bubeshko, N. N. Fluorescent properties of thiochrome in solvents of different polarity / N. N. Bubeshko, V. I. Stsiapura, I. I. Stepuro // J. Appl. Spectrosc. — 2011. — Vol. 78. — 337–343.
5. Determination of thiamin and its phosphate esters in cultured neurons and astrocytes using an ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatographic method / L. Bettendorff [et al.] // Anal. Biochem. — 1991. — Vol. 198. — P. 52–59.
6. Novel spectrofluorimetric method for the determination of thiamine with iron(III) tetrasulfonato phthalocyanine as a catalyst / Q. Y. Chen [et al.] // Analyst. — 1999. — Vol. 124. — P. 771–775.
7. Penttinen, H. K. Differences in thiochrome fluorescence produced by thiamine and its mono-, di-, and triphosphate esters / H. K. Penttinen // Acta Chem. Scand. B. — 1976. — Vol. 30. — P. 659–663.
8. Stability-indicating photochemical method for the assay of thiamine by spectrophotometry / I. Ahmad [et al.] // J. Spectrosc. — 2018. — Article ID 3178518.
9. Thiaminylated adenine nucleotides. Chemical synthesis, structural characterization and natural occurrence / M. Fr̄idřich [et al.] // FEBS J. — 2009. — Vol. 276. — P. 3256–3268.
10. Yu, Y. A Simple and fast fluorimetric method for thiamine (vitamin B<sub>1</sub>) detection by Au<sup>3+</sup>-mediated formation of thiochrome / Y. Yu, Y. J. Ching, Y. N. Tan // Austin J. Biosens. Bioelectron. — 2015. — Vol. 1(1): id1004.

## PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ADENOSINE-THIAMINTRIPHOSPHATE

---

---

*Makarchikov A.F.<sup>1,2</sup>, Kudyko T.G.<sup>2</sup>, Luchko T.A.<sup>2</sup>,  
Rusina I.M.<sup>2</sup>, Kolos I.K.<sup>2</sup>, Gurinovich V.A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Republican Scientific Research Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus”, Grodno, Republic of Belarus;

<sup>2</sup>Grodno State Agrarian University, Grodno, Republic of Belarus

**Summary.** *The paper concerns with some physico-chemical properties of a chemically synthesized adenosine thiamine triphosphate (AThTP), a natural thiamine nucleotide with unknown functions which has been found in biological objects. The hydrolysis of AThTP in water solutions, its stability during storage as well as spectral characteristics are described*

## АНАЛИЗ КОМОРБИДНЫХ РАССТРОЙСТВ У ПАЦИЕНТОВ С ЗАВИСИМОСТЬЮ ОТ АЛКОГОЛЯ

*Максимчук В.П.<sup>1</sup>, Лисковский О.В.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Государственное учреждение*

*«Республиканский научно-практический центр психического здоровья»,*

*г. Минск, Республика Беларусь;*

*<sup>2</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,*

*г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** Наличие группы инвалидности было выявлено у 1,7 % пациентов психиатрического профиля и у 0,3 % пациентов наркологического профиля. Общее число коморбидных заболеваний у пациентов с наркологическими заболеваниями наблюдалось у 1,1 % пациентов. Снижение смертности, связанной с алкоголем и употреблением наркотических средств, позволит существенно понизить уровень общей смертности населения и тем самым повысить уровень эффективности лечения данных пациентов.

**Введение.** Злоупотребление алкоголем наносит серьезный вред физическому и психическому здоровью человека, увеличивает смертность от различных соматических заболеваний. По данным Всемирной организации здоровья [7], только алкоголизм ежегодно уносит около 6 млн человеческих жизней. Статистика свидетельствует, что продолжительность жизни пьющих людей укорачивается в среднем на 15 лет; примерно половина всех дорожных происшествий совершается в нетрезвом виде; алкоголизм резко снижает качество жизни того, кто страдает этим пороком. В Республике Беларусь ежегодно только от внешних причин в среднем умирает 12,3 %. Немаловажную роль в смертности пациентов наркологического профиля оказывают коморбидные соматические заболевания у наблюдаемых пациентов [1].

Среди больных алкоголизмом, наркоманиями и токсикоманиями почти пятая часть обнаруживает процессуальные эндогенные психические заболевания.

Результаты различных исследований показали, что от 20 до 80 % пациентов, получавших лечение по поводу психических расстройств, имеют проблемы (злоупотребление или зависимость) с алкоголем или наркотиками [4, 12].

В последние годы наблюдается растущее признание того, что сочетание зависимости от алкоголя или других психоактивных веществ и психических заболеваний является весьма частым [1, 11]. Наиболее частыми коморбидными психическими расстройствами, встречающимися у больных с алкогольной/наркотической зависимостью, являются расстройства настроения (депрессия) тревожно-фобические расстройства и расстройства личности [3, 6].

**Цель и задачи исследования.** Провести анализ причин смертности пациентов наркологического профиля, изучить коморбидность и инвалидность пациентов с синдромом зависимости от алкоголя, разработать предложения по снижению смертности данных пациентов.

**Материал и методы исследования.** Изучены статистические данные о распространенности алкоголизма и смертности диспансерных пациентов с синдромом зависимости от алкоголя, по данным отчетов о работе областных (городских) наркологических диспансеров Ми-

нистерства здравоохранения Республики Беларусь, а также наличия у них коморбидных заболеваний и инвалидности.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В Республике Беларусь число пациентов с синдромом зависимости от алкоголя на 01.01.2020 года составило 154 842 чел. (1634,2 на 100 тыс. населения).

За последние десять лет число диспансерных пациентов с синдромом зависимости от алкоголя уменьшалось на 13,9 %: (в 2010 г. — 179 871 чел. или 1865,2 на 100 тыс. населения).

Ежегодно с диспансерного учета в связи со смертью снимается в среднем около 4000 пациентов. В 2019 г. снято с диспансерного наркологического учета в связи со смертью 4155 пациента, из которых 3772 пациента с синдромом зависимости от алкоголя и 40 пациентов, перенесших алкогольные психозы, 343 пациента от других заболеваний (наркомания, токсикомания, отравления алкоголем и др.). В 2014 г. снято с диспансерного учета в связи со смертью 4325 пациента (уменьшение на 3,9 % в 2019 г. по сравнению с 2014 г.).

Наибольшее уменьшение смертности диспансерных наркологических пациентов за этот период времени наблюдается в г. Минске 321 чел. (в 2014 г. 706 чел., снижение на 54,5 %), а наибольшее увеличение смертности диспансерных пациентов наблюдается в Минской области — 572 чел. (в 2014 г. 492 чел., рост на 16,3 %).

Анализ смертности диспансерных наркологических пациентов в зависимости от нозологического заболевания за 2019 г. показал следующие результаты: от случаев отравления алкогольными напитками умерло 132 чел. (3,2 %), совершили суицид 167 чел. (4,0 %), от несчастного случая умерло 459 чел. (11,1 %), от соматических заболеваний умерло 3397 чел. (81,7 %).

Наибольшая смертность диспансерных наркологических пациентов наблюдается в возрасте 41–59 лет (в среднем ежегодно умирает 57,8 % пациентов, на втором месте в возрасте старше 60 лет (18,2 %), на третьем месте в возрасте 31–40 лет (18,6 %) и наименьшая смертность отмечена в возрасте от 18–30 лет — 2,3 % (в 2018 г. 2,5 %).

За 12 месяцев 2019 г., в сравнении с аналогичным периодом 2018 г., отмечается снижение суицидальной активности пациентов в группе диспансерного наблюдения на 4,8 %. Так, за 12 месяцев 2019 г. всего по республике зарегистрировано 178 случаев суицидов среди диспансерной группы наблюдения.

**Анализ инвалидности пациентов наркологического и психиатрического профилей.** Важным индикатором наличия сопутствующих соматических заболеваний у пациентов наркологического и психиатрического профилей (далее — психических расстройств), является наличие у них группы инвалидности.

Были изучены медицинские карты 3273 пациентов наркологического профиля и 1887 медицинских карт пациентов психиатрического профиля, которые проходили стационарное лечение в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр психического здоровья» в 2019 г.

Наличие группы инвалидности было выявлено у 402 пациентов, из которых 83 случая (20,6 %) были у пациентов наркологического профиля и 319 случаев (79,4 %) у пациентов психиатрического профиля.

У пациентов наркологического профиля инвалидность встречалась у 2,5 % наблюдаемого контингента, а у пациентов психиатрического профиля у 16,9 %, что в 6,7 раза больше, чем среди пациентов наркологического профиля.

Анализ инвалидности показал, что процент пациентов с первой группой инвалидности среди пациентов психиатрического профиля в 1,4 раза больше, чем среди пациентов нарколо-

гического профиля, а третья группа инвалидности в 2,3 раза меньше, чем у пациентов наркологического профиля.

Отдельно были изучены медицинские карты пациентов 17-го наркологического отделения для лечения пациентов, страдающих наркоманией (648 карт). Наличие инвалидности было выявлено у 69 пациентов (10,6 % от числа всех пациентов с наркоманией), из числа которых у 66 чел. (10,2 %) была вторая группа инвалидности, а у 3 чел. (0,5 %) третья группа инвалидности.

Таким образом, наличие инвалидности было выявлено у 1,7 % пациентов психиатрического профиля и у 0,3 % пациентов наркологического профиля. Процент пациентов, у которых имеется группа инвалидности среди пациентов психиатрического профиля в 6,7 раза больше, чем среди пациентов наркологического профиля. Первая группа инвалидности среди пациентов психиатрического профиля в 1,4 раза больше, чем среди пациентов наркологического профиля, а третья группа инвалидности в 2,3 раза меньше, чем у пациентов наркологического профиля. У пациентов с синдромом зависимости от наркотических средств инвалидность была обнаружена у 10,6 % пациентов.

**Анализ коморбидности у пациентов с психическими расстройствами.** Наличие инвалидности у пациентов с психическими расстройствами в большинстве случаев нередко обусловлена наличием сопутствующих (коморбидных) соматических заболеваний.

Проведенный анализ показал, что число коморбидных заболеваний у пациентов психиатрического профиля в среднем составляет 5,3 % у обследуемых пациентов (в 4,8 раз больше, чем у пациентов наркологического профиля с синдромом зависимости от алкоголя — 1,1 %). У пациентов с синдромом зависимости от наркотических средств процент коморбидных заболеваний составил 16,8 %, что в 15,3 раза больше, чем у пациентов с синдромом зависимости от алкоголя.

У пациентов наркологического профиля были выявлены следующие коморбидные заболевания: мультифактная деменция (F.01.1, F.02.8), органически бредовое (шизофренические расстройства) и органические эмоционально лабильные (астенические) расстройства (F.06.2, F.06.6), шизотипическое расстройство (F.21.1), острое полиформное психотическое расстройство с симптомами шизофрении (F.23.1), шизоаффективное расстройство (F.25.2), биполярное аффективное расстройство (F.31.0), диссоциативные расстройства моторики (F.44.4), легкая умственная отсталость (F.70.0), несоциализированное расстройство поведения (F.91.1) и другие единичные заболевания.

Помимо указанных заболеваний, были выявлены и другие коморбидные заболевания. В частности, анализ коморбидности у 968 пациентов 9-го наркологического отделения, прошедших лечение в 2019 г., показал, что у 0,9 % пациентов (9 чел.) были выявлены коморбидные психотические расстройства (F.11.20 — употребление опиоидов, F.19.24 — употребление других психоактивных веществ, F.70.0 — легкая умственная отсталость, F.61.0 — смешанные расстройства личности, а у 58,4 % пациентов были выявлены психотические расстройства преимущественно галлюцинаторного типа F.10.52 (включая и алкогольный галлюциноз), у 8,45 % пациентов (106 чел.) наблюдалось состояние отмены, осложненное делирием F.10.40.

На частоту смертности пациентов наркологического профиля, кроме прочих причин, влияет и наличие коморбидных заболеваний у данных пациентов. Анализ коморбидной патологии у пациентов наркологического профиля: были выявлены коморбидные психотические расстройства (F.11.20 — употребление опиоидов, F.19.24 — употребление других психоактивных веществ, F.70.0 — легкая умственная отсталость, F.61.0 — смешанные расстройства личности).

Проблема сочетания алкогольной и наркотической зависимостей с другой психической патологией является весьма актуальной. Кроме того, необходимо учитывать, что имеется определенный патоморфоз, свойственный целому ряду психических заболеваний, в том числе и алкогольной зависимости, что изменяет клиническую картину заболевания и требует соответствующего лечения.

Чаще всего диспансерные пациенты наркологического профиля умирают от болезней системы кровообращения (в 39,1 % случаях).

В настоящее время наиболее известны 4 гипотезы, пытающиеся объяснить возникновение коморбидности: гипотеза накопления факторов риска, гипотеза самолечения, диатезно-стрессовая гипотеза и гипотеза нарушений в системе положительного подкрепления.

Одна из указанных теорий рассматривает причину коморбидности нейробиологическую предрасположенность к развитию психоза или обострению уже имеющейся шизофрении под воздействием внешних стрессов, таких как злоупотребление психоактивными веществами, в частности алкоголем, а другая указывает на значительное количество общих факторов, участвующих в патогенезе и шизофрении и зависимости от психоактивных веществ [13].

Традиционно является представлением о том, что сочетание эндогенной депрессии и алкогольной зависимости утяжеляет течение последней [3]. В то же время некоторые авторы отмечали, что углубление эндогенной депрессии ведет к прекращению алкоголизации [9, 14]. Данные авторы считают, что полученные результаты свидетельствуют об относительно малой прогрессивности алкогольной зависимости, возникающей на фоне первичных хронических расстройств.

Примерно в 30 % случаев у больных с алкогольной зависимостью имеют место коморбидные депрессивные расстройства различной степени тяжести [3, 8]. Развернутые депрессии, отвечающие критериям большого депрессивного эпизода, встречаются приблизительно у 10 % больных с алкогольной зависимостью, субдепрессия на уровне дистимии — у 30 % больных [2, 10]. Имеется ассоциация повышенного уровня депрессии и количество дней тяжелого пьянства [10]. Нейрохимические механизмы депрессивных расстройств и синдрома влечения к алкоголю связаны с нарушениями, в том числе генетически детерминированными, катехоламиновой (в первую очередь дофаминовой) и серотининовой нейромедиации [5].

Таким образом, у пациентов с психическими расстройствами число коморбидных заболеваний в среднем составляет 5,3 % у обследуемых пациентов (в 4,8 раз больше, чем у пациентов наркологического профиля — 1,1 %).

**Заключение.** Анализ проведенного исследования показал, что смертность, связанная с алкоголем и употреблением наркотических средств, вносит значительный вклад в уровень общей смертности в Беларуси. Общее число лиц, умерших от внешних причин, в среднем составляет 12,3 %. Смертность диспансерных пациентов наркологического профиля уменьшилась за последние 6 лет на 3,9 % и составляет в среднем около 4000 чел. в год.

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать следующие выводы:

1. В динамике за последние десять лет число пациентов с синдромом зависимости от алкоголя уменьшалось на 13,9%: (в 2010 г. — 179 871 чел. или 1865,2 на 100 тыс. населения).

2. Смертность диспансерных наркологических пациентов за последние 10 лет уменьшилась на 14,4 % (с 5493 случая в 2010 г. до 4155 случаев в 2019 г.).

3. Наибольшая смертность диспансерных наркологических пациентов наблюдается в возрасте 41–59 лет (в среднем ежегодно умирает 57,8 % пациентов, на втором месте в возрасте

старше 60 лет (18,2 %), на третьем месте возрасте 31–40 лет (18,6 %) и наименьшая смертность отмечена в возрасте от 18–30 лет — 2,3 % ( в 2018 г. 2,5 %).

4. Наличие инвалидности было выявлено у 1,7 % пациентов психиатрического профиля и у 0,3 % пациентов наркологического профиля. Процент пациентов, у которых имеется группа инвалидности среди пациентов психиатрического профиля в 6,7 раза больше, чем среди пациентов наркологического профиля.

5. Процент пациентов, у которых имеется первая группа инвалидности среди пациентов психиатрического профиля в 1,4 раза больше, чем среди пациентов наркологического профиля, вторая группа в 1,2 раза, третья группа инвалидности в 2,3 раза меньше, чем у пациентов наркологического профиля.

6. У пациентов с психическими расстройствами число коморбидных заболеваний у пациентов психиатрического профиля в среднем составляет 5,3 % у обследуемых пациентов (в 4,8 раз больше, чем у пациентов наркологического профиля — 1,1 %).

7. Анализ коморбидной патологии у пациентов психиатрического профиля показал, что наибольшее число (у 4,2 %) у данных пациентов встречается сопутствующая патологии по МКБ-10 — F.10.3 (состояние отмены или появление симптомов при полном или частичном прекращении приема алкоголя, а у пациентов наркологического профиля были выявлены коморбидные психотические расстройства (F.11.20. — употребление опиоидов, F.19.24 — употребление других психоактивных веществ, F.70.0. — легкая умственная отсталость).

**В целях предупреждения смертности диспансерных пациентов наркологического профиля целесообразно следующее:**

1. Ежегодно проводить мониторинг наркологической ситуации в республике, который должен проводиться как на республиканском уровне, так и на региональном. Основными целями мониторинга должно быть определение состояния распространенности сочетанности наркологических, психических и соматических заболеваний, оценка эффективности проводимой медико-социальной работы с пациентами с психическими расстройствами, подготовка предложений по профилактике смертности пациентов наркологического и психиатрического профилей.

2. Ежегодно изучать коморбидность пациентов с психическими расстройствами в целях профилактики их смертности и разработки методов лечения.

Таким образом, снижение смертности, связанной с алкоголем и употреблением наркотических средств, позволит существенно понизить уровень общей смертности населения и тем самым повысить уровень эффективности лечения данных пациентов.

### Список литературы

1. Бузик, О.Ж. Коморбидные расстройства у больных с зависимостью от алкоголя / О.Ж. Бузик, Т.В. Агибалова // Московский научно-практический центр наркологии. — М., 2008. — С. 7.

2. Варфоломеева, Ю.Е. Субдепрессивные состояния при алкоголизме / Ю.Е. Варфоломеева // Независимый психиатрический журнал. — 2011. — № 1. — С. 21–23.

3. Гофман, А.Г. Эндогенные депрессивные состояния и злоупотребление алкоголем / А.Г. Гофман // Вопросы наркологии. — 2014. — № 3. — С. 120–126.

4. Гофман, А.Г. О сочетании психических заболеваний с зависимостью от алкоголя / А.Г. Гофман, П.А.Понизовский // Вопросы наркологии. — 2018. — № 2. — С. 102–113.

5. Кибитов, А.О. Клиническая генетика наркологических заболеваний: роль генов системы дофамина / А.О. Кибитов // Вопросы наркологии. — 2013. — № 6. — С. 60–80.

6. Менделевич, В.Д. Наркозависимость и коморбидные расстройства поведения / В.Д. Менделевич. — М.: Медпресс-информ, 2003. — 328 с.

7. Мировая статистика здравоохранения. Мониторинг показателей здоровья в отношении Целей устойчивого развития (ЦУР) / ВОЗ. — 2018. — С. 103.
8. Сочетание алкогольной зависимости и депрессивных расстройств / А.Е. Николишин [и др.] // Вопросы наркологии. — 2015. — №5. — С. 66–78.
9. Пятницкая, И.Н. Проблема дифференциального диагноза при атипичной прогрессивности алкоголизма / И.Н. Пятницкая, Д.Д. Еникеева // Актуальные вопросы невропатологии, психиатрии и нейрохирургии: тезисы докладов. — Рига, 1981. — С. 309–313.
10. Рыбакова, К.В. Дифференциальные диагностические критерии первичных и вторичных психических расстройств, коморбидных алкогольной зависимости / К.В. Рыбакова // Вопросы наркологии. — 2019. — № 12(183). — С. 34–54.
11. Сиволап, Ю.П. Злоупотребление алкоголем и депрессия / Ю.П. Сиволап, В.А. Савченко // Наркология. — 2012. — № 5. — С. 79–82.
12. Bradizza, C.M. Relapse to alcohol and drug use among individuals diagnosed with co-occurring mental health and substance use disorders A review / C.M. Bradizza, P.R. Stasiewicz, N.D. Paas // Clin. Psychol. Rev. — 2006. — Vol. 26. — P. 162–178.
13. Chambers, R.A. A neurobiological basis for substance abuse comorbidity in schizophrenial / R.A. Chambers, J.H. Krystal, D.W. Self // Biological Psychiatry. — 2001. — Vol. 50. — P. 71–83
14. Winokur, G. Alcoholism and depression in the same family / G. Winokur // Alcoholism and affective disorders. — New York : Scientific books, 1979. — P. 49–56.

## ANALYSIS OF COMORBID DISORDERS IN PATIENTS WITH ALCOHOL DEPENDENCE

---

*Maksimchuk V.P.<sup>1</sup>, Liskovsky O.V.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Republican Scientific and Practical Center of Mental Health,  
Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>Belarusian State Medical University,  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *The presence of a disability group was detected in 1,7 % of patients with a psychiatric profile and in 0,3 % of patients with a narcological profile. The total number of comorbid diseases in patients with narcological diseases was observed in 1,1 % of patients. Reducing mortality associated with alcohol and drug use will significantly reduce the overall mortality rate of the population and thereby increase the effectiveness of treatment of these patients.*

**Key words:** *patients with mental disorders, alcohol dependence syndrome, mortality rate of drug addiction patients, disability groups, comorbidity.*

## ПОЛУЧЕНИЕ «НЕФОЛДИРУЕМЫХ» РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ: СРАВНЕНИЕ ПРЯМОЙ ЭКСПРЕССИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА С ЭКСПРЕССИЕЙ ХИМЕРНОГО БЕЛКА V1-ЭФР, ВКЛЮЧАЮЩЕГО ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ «АССИСТЕНТ» ФОЛДИНГА

---

*Марцев С.П., Власов А.П., Пашкова О.Л.*

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр  
трансфузиологии и медицинских биотехнологий»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** Проведено сравнение двух альтернативных подходов к получению важного для клеточных технологий эпидермального фактора роста (ЭФР) человека. Белок относится к группе так называемых нефолдируемых (*non-foldable*) белков и поэтому требующих дополнительных N-концевых полипептидов в качестве внутримолекулярных шаперонов — ассистентов фолдинга. При экспрессии ЭФР в составе химерной двухдоменной конструкции, включающей N-концевой домен V1 белка G стрептококка в качестве внутримолекулярного шаперона показано 2-кратное увеличение уровня синтеза химерного белка (по сравнению с прямой экспрессией ЭФР (60 мг и 30 мг белка на 1 л культуры *E.coli BL21(DE3)* соответственно). В то же время в отличие от ранее опубликованных данных нами показано, что прямая экспрессия ЭФР при оптимизации критически значимых параметров процесса рефолдинга и очистки позволяет достичь величины конечного выхода индивидуального ЭФР, близкой к подходу «ассистированного» фолдинга (~8 мг на 1 л культуральной среды).

**Введение.** Развитие современных клеточных технологий, в том числе стволовых клеток, делает актуальной задачу обеспечения технологий критически важными компонентами. К числу таких компонентов в первую очередь относятся факторы роста и дифференцировки клеток, имеющие высокую стоимость, которая накладывает ограничения на масштабирование технологий для их практического применения.

Как один из основных факторов, используемых в технологиях стволовых клеток, эпидермальный фактор роста (ЭФР) представляет собой короткий (53 аминокислотных остатка, молекулярная масса, Мм, -6 кДа) одноцепочечный полипептид [1], присутствующий в большинстве внеклеточных и секреторных жидкостей организма.

Ввиду своих структурных особенностей, включая сложную стереохимию трох дисульфидных групп, ЭФР относится к категории так называемых нефолдируемых последовательностей. Белки этой категории *in vivo* синтезируются в виде предшественников значительно большей молекулярной массы, поскольку сами по себе не содержат достаточный потенциал структурных элементов для правильного фолдинга — формирования компактной, термодинамически стабильной и «растворимой» третичной структуры. Эти белки особенно сложны для получения методами генной инженерии и требуют применения особых подходов, среди которых можно выделить два основных.

Считающийся наиболее перспективным подход, появившийся на рубеже 2010-х годов [2, 3], основан на применении химерных белков, включающих дополнительный N-концевой белок — «ассистент» фолдинга. Его функция состоит в «проводке» чужеродного для бактерии целевого

белка к правильной третичной структуре, лишенной внутримолекулярных дефектов. В качестве «ассистентов» фолдинга выступают, как правило, белки бактериальной природы, хорошо растворимые и со структурой, адаптированной к успешному фолдингу благодаря значительному содержанию гидрофильных аминокислот при минимуме или отсутствии осложняющих фолдинг дисульфидных групп и остатков пролина. Примерами таких белков служат глутатион-S-трансфераза (GST), тиоредоксин (Trx), родственный убиквитину малый белок-модификатор (*small ubiquitin-related modifier*, SUMO) [2–4]. Из новых белков недавно предложен домен В1 белка G стрептококка [5], использованный в данной работе.

Второй консервативный подход к получению «нефолдируемых» рекомбинантных белков рассчитан на минорное количество (5–10 %) правильно фолдированного белка при потере основного пула целевого белка, формирующего нерастворимые агрегаты и в таком виде либо протеолитически деградирующего еще внутри клетки-продуцента, либо теряемые *in vitro* при рефолдинге из солюбилизата телец включения. Существование этого лишнего элементов новизны консервативного подхода связано с его технической простотой.

Однако, как показали работы последних лет, этот подход может быть значительно улучшен по конечному результату путем адаптации условий экспрессии и в особенности рефолдинга белка после его денатурирующей солюбилизации из телец включения. На основе собственных и опубликованных данных нами разработан интегрированный подход [6–9], включающий комбинацию операционных подходов: 1) индукции максимального формирования в бактериальном продуценте телец включения, что блокирует внутриклеточную деградацию целевого белка в состоянии неполного фолдинга; 2) инженерии сольвентных сред рефолдинга с применением ступенчатой схемы процесса, адаптированной для каждого отдельного белка, с исключением одностадийных схем, провоцирующих агрегацию; 3) применения пространственно ориентированных методов рефолдинга на сорбентах с пространственным разделением молекул целевого белка, что препятствует преждевременной ассоциации и агрегации не полностью компактных интермедиатов фолдинга; 4) применения биофизических методов (флуоресцентная спектроскопия, сканирующая калориметрия), наряду с базовыми методами (электрофорез, ВЭЖХ) для адаптации критически важных параметров рефолдинга.

В данной работе мы применили оба подхода с целью определения их перспектив для получения ЭФР и других сложных для бактериальной экспрессии белков. Конечная цель наших исследований — обеспечение динамично растущего сегмента отечественных клеточных технологий основными ростовыми факторами, критически влияющими на стоимость технологий, а также снятие экспортных ограничений.

**Материалы и методы исследования.** Для конструирования рекомбинантных белков использованы стандартные процедуры рекомбинантных ДНК. Оптимизированный по структурным кодонам ген 6His-В1-ЭФР синтезирован методом ПЦР из 8 синтетических олигонуклеотидов длиной от 55 до 68 оснований с взаимным перекрытием не менее чем 12 нуклеотидов. Продукт ПЦР-амплификации был очищен и клонирован в клонирующий вектор pJET1/blunt («Fermentas», Литва), после чего перенесен в экспрессионную плазмиду pET-22b(+) («Novagen», Германия). Синтез гена ЭФР-6His проведен на основе ампликона гена 6His-В1-ЭФР, используя ПЦР с парой праймеров длиной 57 и 39 нуклеотидов.

Для создания штаммов-продуцентов компетентные клетки штамма BL21(DE3) трансформировали плазмидами pET22-ЭФР-6His и pET22-6His-В1-ЭФР с помощью набора реагентов Transform Aid Bacterial Transformation Kit («Fermentas», Литва). Отбор клонов, содержащих плазмидную ДНК, осуществляли на агаризованной LB среде в присутствии 100 мкг/мл ампициллина.

Степень очистки белков оценивали электрофорезом в геле полиакриламида (12,5 %) в присутствии додецилсульфата натрия. Концентрацию плазмидной ДНК определяли спектрофотометрически. При расчетах оптическая плотность раствора ДНК с концентрацией 50 мкг/мл в 1 см кювете принималась равной 1. Концентрацию белков определяли спектрофотометрически, используя рассчитанные из аминокислотной последовательности коэффициенты поглощения 1%-ного раствора белка при 280 нм, равные 25,7 для ЭФР-6His и 21,4 для 6His-B1-ЭФР. Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра CM-2203 («Solar», Минск, Беларусь) в кювете 1 см, содержащей 70–80 мкг белка.

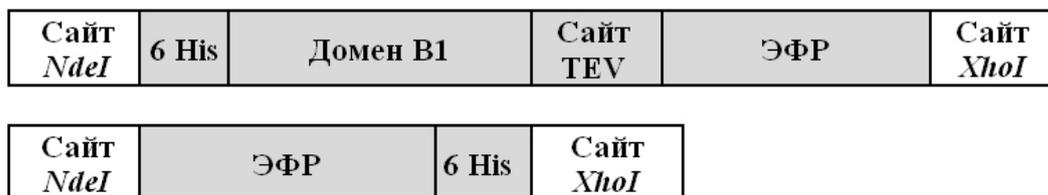
Биологическую активность ЭФР определяли по стимуляции пролиферативной активности клеточной линии 3T3 («Sigma-Aldrich», США) эмбриональных фибробластов мыши, культивируя клетки изначально во флаконах в среде ДМЕМ с эмбриональной сывороткой теленка. Затем клетки переносили в культуральные планшеты в количестве  $10^4$  клеток на лунку и после 24 ч «голодания» в среде ДМЕМ без эмбриональной сыворотки добавляли среду ДМЕМ с возрастающими концентрациями ЭФР. Спустя 48–72 ч в лунки добавляли по 20 мкл МТТ (5-дифенил-2Н-тетразолия бромид, «Roth» Германия, 5 мг/мл). Через 4 ч при 20–25 °С кристаллы образовавшегося формазана растворяли в диметилсульфоксиде и определяли оптическую плотность при 570 нм.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В настоящей работе мы применили два подхода к получению белка ЭФР с «нефолдируемой последовательностью»:

1) подход прямой экспрессии гена ЭФР, клонированного в экспрессионную плазмиду рЕТ22b без дополнительных структурных элементов. Исключение составляет последовательность, кодирующая пептид из шести гистидинов (6 His) в С-концевой части молекулы белка (рис.). Размер гена — 180 пар нуклеотидов, расчетная молекулярная масса кодируемого белка — 7,2 кДа (60 аминокислотных остатков);

2) подход, использующий домен В1 белка G стрептококка в качестве «ассистента», увеличивающего экспрессию и фолдинг белка. Кодирующая последовательность содержит ген ЭФР, «слитый» с геном домена В1 в качестве лидерного полипептида с N-концевым 6His «тегом» (рис.). Кроме того, ген химерного белка 6His-B1-ЭФР содержит нуклеотиды, кодирующие сайт протеолиза высокоспецифичной протеазой TEV (tobacco etch virus) из 7 аминокислот для отщепления ЭФР. Размер гена — 369 пар нуклеотидов, расчетная Мм белка — 14,0 кДа (121 аминокислотный остаток).

Обе генетические конструкции содержат сайты рестрикции нуклеаз *NdeI* и *XhoI* для клонирования в экспрессионный вектор рЕТ22b.



**Рисунок — Схематическое изображение структуры гена-вставки в составе экспрессионных конструкций белков 6His-B1-ЭФР (вверху) и ЭФР (внизу) на основе плазмиды рЕТ22b.**

Длина структурных сегментов на рисунке условна и не отражает соотношение числа нуклеотидов. Заливкой отмечены транскрибируемые последовательности. Сайт TEV — гептапептид, несущий сайт расщепления протеазой TEV

Экспрессия обоих рекомбинантных белков в клетках *E.coli* BL21(DE3) проведена в масштабированном формате в объеме 5 л (в биореакторе объемом 10 л) при +37 °С. Анализ клеточных лизатов показал, что экспрессия двух целевых белков, по данным электрофореза, приводит к преимущественному накоплению продукта в тельцах включения с незначительным процентом белка, локализованного в растворимой фракции клеточного лизата: менее 5 % для ЭФР-6His и 10–20 % для слитого белка 6His-V1-ЭФР. Экспрессия белков при температуре 22 °С показала тот же результат: синтезированные белки были локализованы в тельцах включения.

Уровень экспрессии составил ~30 мг на 1 л культуральной среды для индивидуального ЭФР-6His и ~60 мг на 1 л среды для «слитого» белка 6His-V1-ЭФР. Достигнутый эффект примерно 2-кратного увеличения по основным параметрам экспрессии — содержанию растворимой фракции химерного белка и общего уровня целевого белка — доказывает правомочность применения подхода «ассистированного» фолдинга. В то же время относительная небольшая величина позитивного эффекта позволяет предположить, что общее увеличение синтеза целевого белка V1-ЭФР-6His в клетке штамма-продуцента не поддержано сервисными белками клеточной «машинерии», ответственной за цитоплазматический транспорт, и белками-шаперонами. Одним из применяемых в подобном случае подходов является использование штаммов с дополнительными плазмидами, такими как *Origami*, *Rosetta-gami*, *CodonPlus(DE3)-RIPL*, несущими различные комбинации белков-ассистентов синтеза/фолдинга гиперэкспрессированных белков.

Дальнейшая процедура очистки белков проведена с тельцами включения, которые были предварительно отмыты раствором, содержащим 0,1 % тритон X-100 для максимального удаления белковых и нуклеиновых контаминантов, и затем солюбилизированы в 6М хлоргидрате гуанидина.

Для обоих белков использована двухстадийная процедура рефолдинга, на первой стадии которой целевой белок приводится к частично компактной третичной структуре типа «расплавленной глобулы», стабилизированной при промежуточной концентрации денатуранта (1М хлоргидрата гуанидина) и остающейся в растворимом состоянии за счет присутствия денатуранта. На втором, заключительном этапе процедуры, достигается полный фолдинг белка на Ni-NTA-агарозе, разделяющий фолдируемые молекулы за счет сорбции на хелатных центрах носителя, что блокирует агрегацию конформационных интермедиатов белка на стадии полного удаления денатуранта.

После удаления денатуранта ступенчатая элюция белка имидазолом в обоих случаях приводит к содержанию целевого белка на уровне 60–80 %. Для белка ЭФР-6His очистка до уровня 95 % достигнута на сильном анионообменнике HiTrap Q («GE Healthcare», США).

Для получения «протеолитического» ЭФР, изначально экспрессированного виде химерного белка 6His-V1-ЭФР с лидерным «ассистентом» фолдинга на N-конце — V1 доменом белка G стрептококка, применена более сложная схема. После элюции фолдированного белка на Ni-NTA-агарозе двухдоменная конструкция 6His-V1-ЭФР была «разрезана» высокоспецифичной TEV-протеазой по сайту протеолиза, введенному в состав химерного белка (рис.). Сайт-направленный протеолиз освобождает ЭФР как сегмент структуры, не содержащий 6His «тег» и поэтому не способный связываться с металл-хелатным сорбентом. Повторная хроматография гидролизата на Ni-NTA-агарозе отделяет целевой белок — «протеолитический» ЭФР от содержащих 6His «тег» белков: второго продукта протеолиза — N-концевого «ассистента» фолдинга 6His-V1, а также от нерасщепленного исходного белка 6His-V1-ЭФР (выход протеолиза со-

ставлял 50–60 %). Окончательная очистка гидролизата достигается хроматографией на анионообменнике HiTrap Q.

Оба использованных подхода позволяют решить задачу получения целевых белков — ЭФР-6His и «протеолитического» ЭФР с содержанием основного компонента ~95 %. Анализ спектров флуоресценции показал, что, судя по положению максимума эмиссии в районе 335 нм, полученные белки обладают компактной третичной структурой с основными ароматическими флуорофорами, погруженными в гидрофобное «ядро» и за счет этого экранированными от контакта с растворителем, что характерно для белков с нативной третичной структурой. В соответствии с этими данными оба белка показали близкую биологическую активность, выявляемую по стимуляции роста клеток эмбриональных фибробластов мыши линии 3Т3 с величиной концентрации полумаксимальной стимуляции ( $C_{05}$ ) в диапазоне 0,1 — 0,5 нг/мл, что соответствует опубликованным данным.

Оба подхода обеспечивают близкие величины конечного выхода целевого белка в расчете на 1 л полученной в ферментере высокоплотной культуры штамма-продуцента: для ЭФР-6His, полученного прямой экспрессией — 8 мг на 1 л культуры, для протеолитического ЭФР, полученного расщеплением химерного белка 6His-V1-ЭФР — 8,5 мг на 1 л культуральной среды.

Фактором сближения результатов двух подходов является, во-первых, успешная оптимизация подхода прямой экспрессии по нескольким критическим параметрам и, во-вторых, еще не проведенная на данный момент оптимизация параметров второго подхода — «ассистированного» процесса экспрессии/фолдинга. Неиспользованным резервом повышения эффективности подхода «ассистированного» фолдинга остается увеличение выхода конечного продукта — ЭФР при протеолизе «полупродукта» — химерного белка 6His-V1-ЭФР — с помощью фермента TEV, а также снижение потерь при дополнительной металл-хелатной хроматографии. Однако более значимым резервом является отмеченная выше возможность увеличения уровня экспрессии химерного белка 6His-V1-ЭФР за счет применения дополнительных плазмид (Origami и других), повышающих в штамме-продуценте содержание шаперонов и других внутриклеточных ассистентов синтеза и фолдинга белков.

Принципиальный вывод данного исследования состоит в применимости обоих подходов для решения задачи получения ЭФР как белка с изначально декларированной «нефолдируемой» последовательностью аминокислот. Важно отметить, что «нефолдируемый» характер структуры ЭФР остается таковым в условиях *in vivo*, а также и при неадаптированных сольвентных условиях *in vitro*, дефектно имитирующих физиологические при экспрессии и (ре)фолдинге. Однако «нефолдируемость», как следует из проведенного исследования, может быть преодолена в адаптированном по критическим параметрам биотехнологическом процессе. Эффективность ресурсосберегающего подхода прямой экспрессии, как показано нами в отличие от предшествующих данных, может достигать приемлемого уровня благодаря использованию разработанного интегрированного подхода, включающего набор условий, адаптированных для каждого индивидуального белка.

### Список литературы

1. Dorow, D.S. And sequence analysis of a cDNA for rat epidermal growth factor / D.S. Dorow, R.J. Simpson // Nucl. Acids Res. — 1988. — Vol. 16, № 23. — P. 9338.
2. Li, Y. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in Escherichia coli / Y. Li // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2009. — Vol. 54. — P. 1–9.

3. Li, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review / Y. Li // *Protein Expr. Purif.* — 2011. — Vol. 80. — P. 260–267.
4. High-level expression and purification of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) with SUMO fusion / W. Lu [et al.] // *Mol. Biotechnol.* — 2010. — Vol. 44. — P. 198–203.
5. Expression and purification of human epidermal growth factor (hEGF) fused with GB1 / X.M. Zhenga [et al.] // *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* — 2016. — Vol. 30, № 4. — P. 813–818.
6. Fusion of the antiferritin antibody VL domain to barnase results in enhanced solubility and altered pH stability / S.P. Martsev [et al.] // *Prot. Eng. Design Select.* — 2004. — Vol. 17. — P. 85–93.
7. Folding of an antibody variable domain in two functional conformations in vitro: calorimetric and spectroscopic study of the anti-ferritin antibody VL domain / Ya.S. Tsybovsky [et al.] // *Protein Engineering, Design & Select.* — 2007. — Vol. 20. — P. 481–490.
8. Amyloid fibril formation of the mouse VL domain at acidic Ph / S.P. Martsev [et al.] // *Biochemistry.* — 2002. — Vol. 41, № 10. — P. 3389–3395.
9. Рекомбинантный фактор роста фибробластов (ФРФ-2): экспрессия и анализ фолдинга и стабильности сканирующей калориметрией и флуоресцентной спектроскопией / А.П. Власов [и др.] // БГМУ — в авангарде медицинской науки и практики: сб. трудов / БГМУ. — Минск, 2019. — Вып. 8. — С. 244–251.

---

**OBTAINING NON-FOLDABLE RECOMBINANT PROTEINS:  
A COMPARISON OF DIRECT EXPRESSION OF HUMAN EPIDERMAL  
GROWTH FACTOR AND EXPRESSION OF CHIMERIC PROTEIN B1-EGF  
COMPRISING INTRAMOLECULAR “FOLDING ASSISTANT”**

---

*Martsev S.P., Vlasov A.P., Pashkova O.L.*

*National Research Center for Blood Transfusions,  
and Medical Biotechnology,  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *In this study, we compared two alternative approaches to obtain the human epidermal growth factor, EGF, which is essential for cell technologies. The protein belongs to the family of non-foldable sequences that need assistance of N-terminally located polypeptides playing a role of intramolecular chaperones that promote driving a target protein to a completely folded state. When EGF was N-terminally fused to the B1 domain of Streptococcal protein G, we observed a 2-fold increase in expression of the chimeric protein in comparison with the directly expressed «leaderless» EGF (60 mg versus 30 mg per 1 L of culture, E.coli BL21(DE3)). Unlike previously reported data, here we demonstrate that the approach comprising EGF direct expression/purification, when optimized with regard to the critical parameters of the process, might provide the final yield (8 mg protein per 1 L bacterial culture) that is virtually identical to that obtained for the assisted folding approach.*

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ ФОРМИРОВАНИЯ И КОРРЕКЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА СТРУКТУР ЦНС ПОСРЕДСТВОМ РЕДОКС-АКТИВНЫХ ФОРМ КАЛЬЦИФЕРОЛОВ И ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

*Мойсеёнок А.Г.<sup>1</sup>, Канунникова Н.П.<sup>1,2</sup>, Гуринович В.А.<sup>1</sup>,  
Лукиенко Е.П.<sup>1</sup>, Максимчик Ю.З.<sup>1</sup>, Катковская И.Н.<sup>1</sup>, Хвесько И.С.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Республиканской научно-исследовательское унитарное предприятие  
«Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук  
Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь*

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

**Резюме.** Обзор ключевых работ и обоснование перспективы исследований по формированию редокс-статуса ЦНС, предполагающие взаимодействие нутритивных факторов-кальциферола и пантотеновой кислоты в форме систем функционирования кальцитриола и кофермента А. Обращено внимание на взаимосвязь этих факторов в формировании аутоиммунной патологии, кофермент А-зависимой модуляции белков и системы глутатиона. Впервые рассматривается ассоциация процесса демиелинизации и локального дефицита пантотеновой кислоты. Указывается на необходимость применения предшественников кофермента А и кальцитриола в профилактике и лечении демиелинизирующей патологии.

В связи с неблагоприятной демографической ситуацией в РБ и других европейских странах, старением населения, увеличением периода трудовой деятельности населения, возрастает уровень задач по профилактике и лечению возрастной патологии [9]. Помимо сохраняющейся неблагоприятной ситуации с первичной профилактикой сердечно-сосудистой патологии остается открытым вопрос принятия мер по снижению нейродегенеративной патологии. Реальные достижения в изучении этиологии и патогенеза заболеваний ЦНС, генетических факторов, эпидемиологии и индивидуализации профилактики и лечения не приносят существенных результатов [1, 3, 5, 6]. В этой связи приобретают особую актуальность исследования, связанные с изучением характера питания человека, воздействия на фактор риска этой патологии таких ключевых нутрициологических факторов как витамин D (кальциферол) и пантотеновая кислота [13, 14]. Обнаружение их новых молекулярно-биологических характеристик и прямые указания на этиотропность этих витаминов при нейродегенеративной патологии обосновывает целесообразность углубленных исследований в данном направлении.

В числе нейродегенеративных заболеваний устойчивая и характерная для РБ патология — рассеянный склероз. За последние десятилетия показатели распространенности этого заболевания по РБ постоянно превышают 50 случаев на 100 тыс. населения [3]. Показатель смертности у пациентов с рассеянным склерозом относительно невелик: один на 100 тыс. населения, но чрезвычайно высок риск инвалидизации трудоспособного населения.

Достижения последних лет свидетельствуют о перспективности и вместе с тем о малоизученности проблемы оценки и практического использования показателей окислительно-восстановительного потенциала клеточных систем и структур ЦНС в инициировании нейродегенеративных процессов и вклада систем метаболизма коферментной формы пантотеновой кислоты (КоА), кальцитриола

(гормональной формы витамина D) во взаимосвязи с основным фактором поддержания восстановительного потенциала клеток нервной системы — глутатионом и ферментами его метаболизма. Вызывает недоумение, что, несмотря на убедительность экспериментальных данных, применение витамина D и витамина B5 (пантотеновой кислоты) не находит адекватного применения в комплексной терапии нейропатий. Есть основания полагать, что взаимодействие этих факторов образуют редокс-систему, обеспечивающую устойчивость нейронов и клеток нейроглии к действию патологических факторов. Очевидной проблемой в их изучении является недостаток методологии как в смысле моделирования патологического процесса, так и молекулярно-биохимической оценки трансформации этих факторов в структурах ЦНС, обеспечивающий нейропротективный эффект.

Как известно, поддержание восстановительного потенциала системы глутатиона и внутриклеточного редокс-баланса может быть важным звеном в минимизации внутриклеточного повреждения нейронов при нейродегенерации и перспективным направлением в поиске новых средств патогенетической терапии нарушений при нейродегенеративных заболеваниях [2, 12].

Генетический дефект нарушения экспрессии пантотенаткиназы второго типа (PANK2) в митохондриях, приводящий к развитию нейродегенерации с накоплением железа (NBIA) в структурах головного мозга, а также дефицит пантотеновой кислоты в миелиновых волокнах нервной ткани при болезни Хантингтона, боковом амиотрофическом склерозе сопровождается нарушением биосинтеза кофермента А, ацетилхолина и развитием окислительного стресса [7, 13]. Исследования самого последнего времени указывают, что локальный дефицит пантотеновой кислоты является первопричиной возникновения процесса демиелинизации [13]. При этом исследования трансформации пантотената в КоА и роль 4-фосфо-пантотената остаются не изученными.

Характерной чертой такого нейродегенеративного заболевания как рассеянный склероз является мультифокальное хроническое нейровоспаление, обусловленное локальной инфильтрацией Т-лимфоцитов и макрофагов, а также гибелью олигодендроцитов с последующим разрушением миелиновой оболочки, демиелинизацией и разрушением аксонов. В последние годы установлено, что при рассеянном склерозе наблюдается существенное снижение активности одного из основных ферментов окислительно-восстановительных превращений глутатиона — глутатионпероксидазы 4 — GPx4 [8, 10]. Этот фермент способен ингибировать липоперекисление липидов биологических мембран, используя глутатион в качестве донора электронов. Он ингибирует ферроптоз, который развивается при многих видах неврологических заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом.

Несомненно, перспективным может быть исследование функциональной связи между коферментом А и метаболизмом глутатиона, в том числе в регуляции глутатионпероксидаз или биотрансформации их изоформ.

С недостатком витамина D в питании, а также недостаточной солнечной инсоляцией связана высокая частота заболеваемости рассеянным склерозом в Беларуси. Более того, с учетом аутоиммунного патологического процесса при недостатке витамина D соотносится целый ряд нейрохимических нарушений [13].

Известно, что активные формы витамина D участвуют в передаче Ca-зависимых сигналов между нейронами и регулируют синаптическую пластичность, экспрессию нейротрофических факторов, противовоспалительных цитокинов, синтез нейромедиаторов, антиоксидантную активность клеток, что позволяет говорить о некотором контроле иммунного ответа, предупреждении аутоиммунных заболеваний.

Комплексное нейропротекторное действие витамина D особенно важно при хроническом повышенном оксидативном стрессе в ЦНС, нарушениях иммуномодуляции, недостаточной

регенеративной способности мозга. Имеющиеся данные о вкладе дефицита витамина D в патогенез многих заболеваний, в том числе аутоиммунных, демонстрирует необходимость лечения возможности коррекции статуса витамина D как компонента профилактических и лечебных мероприятий. Так как многочисленные исследования показывают, что большинство пациентов с рассеянным склерозом имеют дефицит витамина D, актуальным является установление оптимальных доз, режима дозирования и продолжительности коррекции статуса витамина D в организме при патологических состояниях ЦНС, что может существенно оказать влияние на характер течения заболевания.

Решение указанных задач предполагает моделирование аутоиммунного энцефаломиелита у лабораторных животных и достижение контролируемого процесса демиелинизации.

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) является наиболее часто используемой экспериментальной моделью для воспалительного демиелинизирующего заболевания человека, рассеянного склероза (РС). ЭАЭ представляет собой сложное состояние, при котором взаимодействие различных иммунопатологических и невропатологических механизмов приводит к приближению основных патологических признаков РС: воспаления, демиелинизации, потери аксонов и глиоза. Контррегуляторные механизмы разрешения воспаления и ремиелинизации также встречающиеся при РС могут служить моделью для этих процессов.

Классическими моделями ЭАЭ являются модели на инбредных линиях крыс Lewis и DarkAgouti. Иммунизацию животных проводят с применением выделенных или рекомбинатных антигенов таких как миелиновый олигодендроцитный гликопротеин (MOG), протеолипидный белок (PLP), миелиновый основной белок (MBP), миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG), миелин-ассоциированный олигодендроцитарный основной белок (MOBP) [4, 11]. Возможной альтернативой моделирования АЭМ применение в числе адьювантных факторов вакцины БЦЖ, которая была апробирована заслуженным деятелем науки РБ профессором Я.Я. Гордеевым.

**Заключение.** Таким образом, перспективы исследований в рассматриваемой области могут открыть механизмы участия метаболитов витамина D в стабилизации редокс-статуса нейроструктур при недостаточности и избытке кальциферолов, а также их возможную роль в поддержании метаболического гомеостаза в ЦНС, дают возможность представить новые приоритетные данные о состоянии ключевых редокс-факторов нейроструктур, их взаимосвязи с метаболизмом кофермента А, глутатиона, кальцитриола и оценить возможность применения витаминсодержащих компонентов для первичной профилактики рассеянного склероза и других нейродегенеративных заболеваний

### Список литературы

1. Биологические функции пантотеновой кислоты. Пантотеновая кислота и мозг. Новые возможности метаболической и диетической терапии: матер. междунар. симпозиума, 28 июня 2013 г. / отв. ред. член-корр. А. Г. Мойсеёнок. — Гродно: ГрГМУ, 2013. — 88 с.
2. Мойсеёнок, А. Г. Редокс-механизмы нейродегенерации [Электронный ресурс] / А. Г. Мойсеёнок, Н. П. Канунникова // Кислород и свободные радикалы: Кислород и свободные радикалы: материалы междунар. научно-практической конференции, Гродно, 15–16 мая 2018 г. / под ред. проф. В. В. Зинчука. — Гродно: ГрГМУ, 2018. — С. 140–142. (1 электрон. опт. диск (CD-ROM)).
3. Пономарев, В. В. Пантотеновая кислота в патогенезе нейродегенеративных заболеваний / В. В. Пономарев // Биологические функции пантотеновой кислоты. Пантотеновая кислота и мозг. Новые возможности метаболической и диетической терапии: матер. междунар. симпозиума (28 июня 2013 г.) / Отв. ред.: член-корр. А. Г. Мойсеёнок. — Гродно: ГрГМУ, 2013. — С. 61–63.

4. Effects of exercise in experimental autoimmune encephalomyelitis (an animal model of multiple sclerosis) / R. E. Klaren [et al.] // *J. Neuroimmunol.* — 2014. — Vol. 274, №1–2. — P. 14–19.
5. Heemels, H. M. Neurodegenerative diseases / H. M. Heemels // *Nature.* — 2016. — Vol. 539. — P. 179.
6. Johnson, W. M. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases / W. M. Johnson, A. L. Wilson-Delfosse, J. J. Mieyal // *Nutrients.* — 2012. — Vol. 4, №10. — P. 1399–1440.
7. Levi, S., Finazzi, D. Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms / S. Levi, D. Finazzi // *Front. Pharmacol.* — 2014. — Vol. 7. — P. 95–99.
8. Maiorino, M. GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues / M. Maiorino, M. Conrad, F. Ursini // *Antioxid. Redox Signal.* — 2018. — Vol. 29, №1. — P. 61–74.
9. Perluigi, M. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: at the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy / M. Perluigi, F. Di Domenico, D. A. Butterfield // *Neurobiol. Dis.* — 2015. — Vol. 84. — P. 39–49.
10. Reduced expression of the ferroptosis inhibitor glutathione peroxidase-4 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis / C.L. Hu [et al.] // *Neurochem.* — 2019. — Vol. 148, №3. — P. 426–439.
11. The relevance of animal models in multiple sclerosis research / A. Denic [et al.] // *Pathophysiology.* — 2011. — Vol. 18, №1. — P. 21–29.
12. Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease / G. J. McBean [et al.] // *Redox Biol.* — 2015. — Vol. 5. — P. 186–194.
13. Vitamin B5 (D-pantothenic acid) localizes in myelinated structures of the rat brain: potential role for cerebral vitamin B5 stores in local myelin homeostasis / N. Ismail [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2020. — Vol. 522, №1. — P. 220–225.
14. Vitamin D Improves Neurogenesis and Cognition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease / M. Morello [et al.] // *Mol. Neurobiol.* — 2018. — Vol. 55, №8. — P. 6463–6479.

## **PROSPECTS OF STUDYING THE FORMATION AND CORRECTION OF THE REDOX STATUS IN CNS STRUCTURES BY MEANS OF REDOX-ACTIVE FORMS OF CALCIFEROL AND PANTOTHENIC ACID**

---

***Moiseenok A.G.<sup>1</sup>, Kanunnikova N.P.<sup>1,2</sup>, Gurinovich V.A.<sup>1</sup>, Lukiyenko Ye.P.<sup>1</sup>,  
Maksimchyk Y.Z.<sup>1</sup>, Katkovskaya I.N.<sup>1</sup>, Khvesko I.S.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>*Republican Scientific Research Unitary Enterprise «Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *It is provided the review of the key articles and publications as well as the rationale to carry out the prospective studies related to the formation of redox status in CNS suggesting the principles of the interaction of nutritional factors such as calciferol and pantothenic acid due to their abilities of acting in the form of calcitriol and coenzyme A. The attention is drawn to the involvement of the aforementioned factors in the processes of formation of autoimmune pathology as well as coenzyme A related modulation of proteins and the glutathione system. The interaction between demyelination processes and local deficiency of pantothenic acid is considered for the first time. The special attention is paid to the necessity to use the precursors of coenzyme A and calcitriol as a prevention and remedy for treatment of the pathological states leading to demyelination processes.*

## ПРОГРЕСС В ИЗУЧЕНИИ БИОСИНТЕЗА КОФЕРМЕНТА А, ЕГО ФУНКЦИЙ И АССОЦИИРОВАННЫХ ПРОЦЕССОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

*Мойсеёнок А.Г., Катковская И.Н.*

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

**Резюме.** Обзор современных представлений о механизмах биосинтеза и гидролиза кофермента А (КоА), его регуляции и взаимосвязи с метаболическими циклами клетки. Детально рассматривается феномен КоА-илирования белковых структур, его регуляторная роль и значимость в адаптации клетки к окислительному стрессу. Впервые описывается процесс ассоциации ферментов биосинтеза КоА и его особенности при голодании и окислительном стрессе. Анализируются данные о физиологическом уровне КоА в тканях, субклеточных структурах и соотношении с ацилированными метаболитами кофермента. Даны примеры развития нейродегенеративных патологий вследствие полиморфизма генов кодирующих ключевые ферменты биосинтеза КоА — пантотенаткиназу и КоА-синтазу. Указывается на роль дефицита КоА в развитии алкогольной и демиелинизирующей патологии. Предлагается изучение пантетеина как эффективного модулятора системы КоА.

Классические представления о биосинтезе и функциях кофермента ацетилирования (КоА, пантетеинадениннуклеотиддифосфат) в организме высших животных и человека [2, 7, 15] серьезно уточнены и пересмотрены в последнее 20-летие. Этому предшествовало получение новых данных об антиоксидантных свойствах предшественников биосинтеза КоА, в т. ч. о регуляции биосинтеза и редокс-статуса глутатиона, модификации белков коферментом, доказательство нейротропной активности производных пантотеновой кислоты (ПаК) и формирование концепции о ведущей роли 5-этапной системы биосинтеза КоА в реализации биологической и фармакологической активности ПаК, ее биотрансформеров и ксенобиотических аналогов (пантетин, пантенол, гомопантотенат и др.). В значительной степени указанные направления исследований были представлены в лаборатории коферментов Института биохимии НАН Беларуси в 1990-2003 гг. [6].

Принятые сокращения: ПаК — пантотеновая кислота, ФПК — 4'-фосфо-пантотеновая кислота, ФПН — 4'-фосфо-пантетеин, ПН (ПТ) — пантетеин (пантетин), дф-КоА — дефосфо-КоА, КоА — кофермент ацетилирования, РКАН — пантотенаткиназоассоциированная нейродегенерация, ОС — окислительный стресс, ВЭЖХ (HPLC) — высокоэффективная жидкостная хроматография, MS — масс-спектрометрия.

Особое внимание в этот период было обращено доказательству множественных форм пантотенаткиназы — ключевого фермента системы биосинтеза КоА и последствиям генетически детерминированного дефекта (мутации *PANK2* гена), влекущего пантотенаткиназоассоциированную нейродегенерацию (РКАН). Рассмотрение этих находок в наших предыдущих обзорах [6], с учетом универсального распространения ПаК в биологических объектах, позволило высказать предположение об участии системы ПаК→КоА в регуляции редокс-потенциала и редокс-сигналирования [1] в метаболизме клеток и целого организма.

Выявленное нами впервые ковалентное лигирование белков цитозоля коферментом А по дисульфидному механизму [3] приобрело новое звучание в постулированном процессе КоА-илирования целого ряда ферментов ЦТК, обмена кетоновых тел и гликолиза [22] и стало предметом углубленного изучения его значимости и вклада в регуляции метаболических процессов в целом. На сегодняшний день более чем 500 белков в клетках животных были идентифицированы как КоА-илированные, большинство из которых причастны к метаболическим циклам трикарбоновых кислот, бета-окислению жирных кислот, метаболизму кетоновых тел, глюкозы и аминокислот, в которых КоА и его производные являются кофакторами или метаболитами [28]. Наиболее выражен процесс КоА-илирования при окислительном стрессе (ОС) и опосредован взаимодействием тиоловой формы кофермента с остатком цистеина в полипептидной цепи, окисляющимся до сульфеновой кислоты, облегчающей реакцию дисульфидообразования [28].

Показано, что КоА-илирование белков коррелирует с концентрацией КоА в клетке, аналогично глутатионилированию белков при окислительном стрессе, является обратимым процессом и может быть неэнзиматическим. Интригующими являются данные об участии КоА-редоксина в этом процессе и его взаимосвязь с состоянием питания животного организма. Уровень КоА-илированных белков существенно снижен в печени мышей ов/ов с ожирением. В целом КоА-илированию подвержены не только белки метаболических циклов, но и участвующие в ответе на стрессовое воздействие и участвующие в синтезе белка [28]. Остаток цистеина, модифицируемый КоА-SH, локализован в сайте белков, причастных к энзиматическому катализу, сигнальной трансдукции, структурной стабилизации, связыванию металлов [16]. Характерным примером является КоА-илирование митохондриальной ацетил-КоА-ацетилтрансферазы, трансформирующего фермент в две частично активные формы с 70% и 50% нативной активности. Активность антиоксидантного фермента 2-Cys-пероксиредоксина (субкласс Prd x 5) при ОС снижается под воздействием КоА-илирования. В аналогичных условиях увеличение КоА-илирования киназы пируватдегидрогеназы в мультиферментном комплексе миокарда способствует его дефосфорилированию и, в итоге, увеличению активности [26]. В таргетной терапии опухолей приобретает приоритет возможность механизма КоА-илирования ингибировать сверхэкспрессию протеинкиназы Auroga A (регулятор митоза) с учетом представительства последней в различных видах опухолей [13].

Изначально КоА-илирование рассматривалось как альтернативный редокс-регулирующий механизм посттрансляционной модификации белковых тиолов посредством ковалентной модификации КоА. Взаимодействие кофермента с Cys149 активного центра глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ключевого гликолитического фермента *Cytrobacter*), выявленное посредством метода LC-MS/MS, продемонстрировало инактивацию фермента и возможность его восстановления при инкубации с дитиотрейтолом, глутатионом и КоА. Установлено, что присутствие субстрата, глицеральдегид-3-фосфата, предупреждает КоА-илирование и инактивацию, которая является необратимой при обработке H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или NaOCl (имитируя ОС), но обратимой при взаимодействии с КоА или КоА-S-S-КоА [18]. Причастность феномена КоА-илирования к клеточному ответу на ОС не исчерпывает его биологические функции. На примере процесса споруляции различных видов *Bacillus* показано значительное КоА-илирование белков во время споруляции с утратой метаболизма в спорах, что свидетельствовало о наличии КоА-зависимого механизма обеспечения метаболического покоя спор [24].

Иерархия тиол-дисульфидного взаимодействия посттрансляционной модификации белков пока не определена, а число потенциальных модификаций достаточно велико [21]. Наиболее изученным внутриклеточным тиолом является глутатион (GSH), взаимодействующий в реакции

S-глутатионилирования с более чем 15% белков при ОС (в нестрессируемых клетках < 0,1%) [30]. Другими представителями этой группы модуляторов белковых тиолов являются цистеин, гомоцистеин [30], вероятно также 4'-фосфопантетеин (ФПН), пантетеин (ПН) и дефосфо-КоА (ДКоА). Особую значимость приобретает тиол-дисульфидное взаимодействие КоА и глутатиона, а также участие кофермента в биосинтезе последнего [1].

Субстратная роль КоА в фосфопантетеинтрансферазной реакции основана на переносе группировки ФПН на сериновый остаток белка синтетазы жирных кислот с инактивацией апосинтазы и ее трансформацией в активный голо-фермент [1]. Фактически наблюдается процесс фосфопантетеинилиации, происходящий не вследствие взаимодействия с тиольной группой, а модификации серинового остатка апофермента. В этом случае собственная сульфгидрильная группа ФПН становится основным функциональным рычагом процесса элонгации синтезируемых жирных кислот [5]. Иная сторона вопроса — процесс ацетилирования белков (например, гистонов) и низкомолекулярных соединений (ПАБК, сульфаниламиды и др.) с участием ацетил-КоА, ацетил-дефосфо-КоА, ацетил-ФПН, на что было обращено внимание в наших ранних исследованиях [5-7]. На этом основании функциональная природа «кофермента ацетилирования» могла рассматриваться как суммарная ацетилирующая активность КоА и предшественников его биосинтеза. Не говоря о роли процесса ацетилирования в механизмах детоксикации ксенобиотиков и природных метаболитов, нужно упомянуть вклад ацетилирования в модификации белковых структур, обеспечивающей стабильность элементов цитоскелета и модуляцию активности ферментов, а также регуляцию экспрессии генов. Общепринято, что высокая степень ацетилирования гистонов корректирует с увеличением транскрипционной активности, т. к. действие большинства факторов транскрипции и корегуляторов модифицируется ацетилированием (TFIIВ, белки сигнальных путей p53, NF-κB, Rb) [28].

В самое последнее время обсуждается соотношение двух механизмов посттрансляционной модификации белков, описанного выше КоА-илирования и 4'-фосфопантетеинилирования, зависящих от уровня КоА. Обращается внимание, что процесс КоА-илирования возрастает при увеличении уровня кофермента, тогда как ФПН-илирование снижается, что может проявиться в разнонаправленных эффектах таргетных к КоА белков [12].

Уникальным и практически незаменимым субстратом биосинтеза КоА является пантотеновая кислота, источниками которой является пища (широко распространена в продуктах и пищевом сырье), кишечная микрофлора и продукты гидролиза КоА из внутриклеточного метаболизма, экспортируемые экзоцитозом. Более 85% витамина поступает с пищей в форме КоА и ФПН и после гидролиза абсорбируется энтероцитами с участием Na-зависимого мультивитаминного переносчика (SMVT). Транспортировка ПаК в кровообращении осуществляется эритроцитами [19]. Начальный этап биосинтеза кофермента заключается в детально изученном процессе фосфорилирования витамина пантотенаткиназой (PANK) с образованием фосфо-пантотеновой кислоты (ФПК). Последующие этапы биосинтеза КоА являются отражением достаточно консервативного пути трансформации витамина (и его метаболита пантетина) с функционально существенными особенностями субклеточной локализации. На рис. 1 отражено поэтапное превращение ФПК конденсацией с цистеином под воздействием фосфопантотеноилцистеин-синтетазы (PPCS), последующее декарбоксилирование фосфопантотеноилцистеин-декарбоксилазой (PPCDC) с образованием ФПН. Заключительные ферменты, катализирующие образование кофермента, представляют 4'-фосфопантетеинаденил-трансферазу (PPAT) и дефосфо-КоА-киназу (DPCK), интегрированные в бифункциональный комплекс КоА-синтазы (COASY).

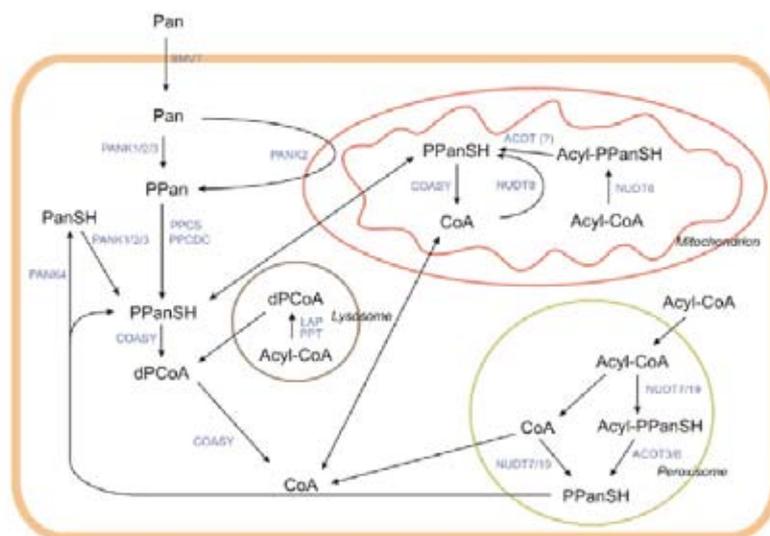


Рисунок 1 — Компартментализация и взаимодействие внутриклеточных путей синтеза и деградации КоА

Примечание: Pan - пантотенат, PPan — 4'-фосфопантотенат, PPanSH — 4'-фосфопантетеин, dPCoA - дефосфо-КоА, PANK - пантотенаткиназа, PPCS — фосфопантотеноилцистеин-синтетаза, PPCDC — фосфопантотеноилцистеин-декарбоксилаза, COASY — КоА-синтаза, PanSH — пантетеин, NUDT — внутриклеточная деградация, нудикс — тип нудикс-мотива (фрагмент X, связанный с нуклеозиддифосфатом), LAP — лизосомальная кислая фосфатаза, SMVT — натрий-зависимый поливитаминный переносчик и ACOT — ацил-КоА-тиоэстераза. Рисунок составлен на основе данных статьи Naquet et al. [21, 26]

Регуляция синтеза КоА преимущественно осуществляется на уровне первой реакции, то есть PANK. В тканях млекопитающих присутствуют четыре активные изоформы (PANK1 $\alpha$ , PANK1 $\beta$ , PANK2 и PANK3), кодируемые тремя генами (PANK1-3). Их локализация в различных субклеточных компартментах обеспечивает реализацию эффектов локальных сенсоров уровня КоА и регуляцию активности всего биосинтетического пути. В тканях человека белки PANK имеют гомологичные С-концевые каталитические домены, но отличные N-окончания. PANK1 $\alpha$  исключительно локализуется в клеточном ядре, PANK1 $\beta$  — в цитозоле и ассоциирована с везикулами (clathrin-coated) и эндосомами. В ядрах и митохондриях присутствует PANK2, определено в межмембранном пространстве. Изоформа PANK3 присутствует в цитозоле. В механизме регуляции пантотенаткиназ первостепенную роль играют КоА-SH и ацетил-КоА, соотношение которых играет ключевую роль в направленности клеточного метаболизма и активности метаболических путей в субклеточных структурах. Активность PANK2 и PANK3 не проявляется при физиологических условиях, что объясняется эффектом ацетил-КоА, в особенности митохондриального, но активация изоформ происходит чрезвычайно быстро в ответ на изменяющийся уровень кофермента [2, 20].

Относительно недавно показано, что вторым регуляторным сайтом биосинтеза КоА является также COASY, проявляющаяся в условиях сверхпродукции PANK. Ген COASY кодирует три изоформы фермента. В тканях животных его локализация — внутренняя митохондриальная мембрана, а характерная особенность — активация под воздействием фосфолипидов [26]. Кроме того, показано, что активность COASY регулируется фосфорилированием/дефосфорилированием по остаткам тирозина. Эта посттрансляционная модификация происходит за счет взаимодействия белка COASY с SH2 доменом рода сигнальных белков. Предполагается, что COASY может быть белковой конструкцией для образования всего КоА-биосинтетического комплекса.

В целом, система биосинтеза КоА активируется при голодании, ОС, под воздействием глюкагона, глюкокортикоидов, гиполипидемических препаратов, приводя к росту общего (total) уровня КоА. Напротив, воздействие гипергликемии, гиперинсулинемии, гиперпирувинемии, гиперлипидемии урежает биосинтез КоА и влечет снижение внутриклеточного КоА [28].

В самое последнее время применение метода близости лигирования (PLA, Proximity Ligation Assay) для изучения межбелкового взаимодействия ферментов биосинтеза КоА на культурах клеток HEK293/ PANK1 $\beta$  и линии легочного рака A549 *in situ* выявило феномен ассоциации синтетических белков и фиксацию CoASY к внешней митохондриальной мембране через гидрофобное N-окончание. Высказано предположение, что образование биосинтетического комплекса КоА представляет динамический и сложный процесс, контролируемый сигнальными метаболическими путями. Показано, что культивирование клеток в бессывороточной среде и обработка H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, приводящих к ОС, влечет двукратное усиление связи между PANK1 и CoASY, тогда как инсулин ослабляет детектируемую флюоресценцию комплекса вследствие диссоциации ферментов. Взаимодействие ферментов, отсутствующее в клетках культуры A549, проявлялось при «сывороточном» голодании и стрессорном воздействии, моделируя процесс ассоциации ферментов в цельный биосинтетический комплекс. Напротив, инкубация активированных голоданием клеток с инсулином или фактором сигналинга роста F6F-2 приводила к диссоциации ферментов биосинтеза КоА [24].

Трудно переоценить значимость рассматриваемого исследования, позволяющего вернуться к пониманию природы субстратного канала аналогичного процессу «тунелирования» для достижения эффективного катализа субстратов при их последовательной трансформации от ПаК (ПН) до КоА. Объединение ферментов в кластеры с образованием комплекса, синтезирующего КоА, обеспечивает много структурных и функциональных преимуществ, по сравнению с отдельными ферментами [10].

Процессы деградации КоА тесно связаны с реакциями биосинтеза (см. рис. 1), прежде всего с возможностями реутилизации ПаК-содержащих компонентов гидролиза. Различают вне- и внутриклеточные ферментативные реакции, которым подвержены не только кофермент, но и его ацильные производные [23]. Первоначальный этап заключается в гидролизе дифосфатной связи КоА с освобождением ФПН, катализируемого эктонуклеотид-пирофосфатазой/ фосфодиэстеразой (ENPP). Возможно действие фермента, расщепляющего 5'-фосфодиэстеразную связь нуклеотидов, в т.ч. КоА и дефосфо-КоА. Образование последнего из КоА катализируется щелочной фосфатазой из клеточной каемки энтероцитов, а в дальнейшем подвергается воздействию ENPP, присутствующего в форме гомодимеров гликопротеина в межмембранном пространстве и в виде растворимой формы. Процесс гидролиза ФПН, вероятно, осуществляется щелочной фосфатазой или иным, более специфичным к субстрату ферментом [28]. Завершающий этап внеклеточного пути более специфичен и катализируется пантетеиназой, известной как белок ванин (VNN). В процессе ванин-катализируемой реакции образуется ПаК и цистеамин — важный субстратный и регуляторный продукт метаболизма. У млекопитающих идентифицированы две изоформы (VNN1 и VNN3) и три изоформы в тканях человека. VNN1 присутствует в мембранах эпителиальных клеток (например, в энтероцитах тощей кишки и в эпителии проксимальных канальцев почки). Показана секреция VNN1-активного белка гепатоцитами. Изоформа VNN3 имеет широкое тканевое распространение, не связанное с мембранами, и сверхэкспрессируется при системном воспалении и ОС [28].

Внутриклеточные механизмы распада КоА и ацил-КоА происходят подобно внеклеточным, но отсутствуют VNN-катализируемые реакции. Механизмы распада действуют в мито-

хондриях, пероксисомах и лизосомах. Для митохондриального матрикса характерно наличие нуклеозиддифосфатазы нудикс (nudix, NUDT8), расщепляющей дифосфатные связи КоА и ацил-КоА с образованием ФПН или ацил-ФПН и 3',5'-АДФ. Семейство NUDT-гидролаз различается по специфичности к ацил-КоА. Помимо NUDT8 также NUDT17 и NUDT19 могут участвовать в гидролизе самого КоА. Присутствие NUDT8 установлено в митохондриях почек, сердца, бурой жировой ткани, печени, мозге, миокарде и скелетных мышцах. Дальнейшая судьба внутримитохондриального ацил-ФПН не ясна, предполагается его трансформация в ФПН под действием ацил-КоА-тиоэстеразы (ACOT).

В деградации ацил-КоА в пероксисомах участвуют NUDT17 и NUDT19, и обе активны в отношении КоА. Экспрессия обоих ферментов зависит от состояния голодание/кормление, по всей вероятности, через сигнальный путь PPAR $\alpha$ . Образующийся ФПН переносится в цитозоль либо специфическим транспортером или путем свободной трансмембранной диффузии. По-прежнему не ясна утилизация поступающего ФПН цитозольной системой биосинтеза КоА [28].

Наконец, пероксисомальный компартмент гидролиза КоА и ацил-КоА отличается участием кислой фосфатазы 2 (LAP2), освобождающей фосфатную группу с образованием дефосфо-КоА или ацил-дефосфо-КоА. Этот фермент также гидролизует длинноцепочечные ацил-КоА. Фермент ассоциирован с пальмитоилтиоэстеразой (PPT), что приводит к выходу продукта в форме дефосфо-КоА. Транспорт последнего из лизосом изучается [28], причем возможным кандидатом трансформации ФПН в ПН рассматривается пантотенаткиназа 4 (PANK4), бифункциональный фермент с фосфатазной активностью [25]. По всей вероятности, синтез и деградация КоА регулируются таким образом, что обеспечивается метаболическая пластичность в различных субклеточных компартментах. Пантотеиназная реакция высвобождает ПАК в кровоток, что обеспечивает биодоступность ключевого субстрата для синтеза КоА *de novo* как альтернативного пути поступления с пищей или из биоценоза кишечника. В целом, внеклеточные и внутриклеточные механизмы деградации КоА (ацил-КоА) скоординированы и разнонаправлены в зависимости от пищевого статуса, стабилизируют метаболические потоки в основном КоА-депонирующем органе (печень) в условиях состояний сытости или голодания [23].

Определение уровня КоА в тканях и субклеточных структурах представляет сложную аналитическую задачу. С учетом лабильности фонда кофермента в зависимости от избранных методов пробоподготовки, реальной ситуации пищевого и метаболического статуса колебания полученных результатов были более чем 10-кратными. Определенный прогресс был достигнут при использовании циклического метода на основе фосфотрансацетилазной (ФТА) реакции и нескольких вариантов ВЭЖХ с преимущественно спектрофлуориметрической детекцией. Разделение предшественников биосинтеза КоА при использовании радионуклидов производных ПАК достигнуто в нашей лаборатории [1]. Как ФТА-энзиматический анализ, так и разделение ВЭЖХ позволило определить уровень кофермента в кровообращении, хотя остается неясным предпочтительность оценки статуса кофермента в эритроцитах или лейкоцитах (или иных форменных элементах) [1].

Обзорные публикации указывают на диапазон величин общего (тотального) КоА в ткани печени животных, находящихся в состоянии кормления *ad libitum*, в пределах от 87 до 434 нмоль/г сырой ткани [28]. По данным нашей лаборатории 153 $\pm$ 5 нмоль/г [1] митохондриальный пул КоА значительно превышает цитозольную и микросомальную фракцию [24]. Некоторые представления об этом дает таблица 1.

По нашим данным [1] лейкоциты человека содержат ФТА-реагирующего КоА в количестве 0,106 $\pm$ 0,002 нмоль/10<sup>-6</sup> лейкоцитов. Сообщается, что КоА и ацетил-КоА ( $\approx$  0,3 нМ) быстро разрушаются в кровообращении и этот подход к оценке статуса КоА нуждается в дальнейшем изучении и валидации.

**Таблица 1 — Уровень общего кофермента А в тканях крыс\***

Ткань	Концентрация общего КоА
Гомогенат печени	87–434 нмоль/г
Цитозоль печени	0,1–0,14 мМ
Митохондрии печени	5,29 мМ
Пероксисомы печени	0,7 мМ
Гомогенат миокарда	≈ 100 нмоль/г
Цитозоль миокарда	0,014 мМ
Митохондрии миокарда	2,26 мМ
Плазма крови	≈ 9 нМ

Примечание — \*измененная таблица [8].

Синхронно с изменением активности PanK уровень КоА меняется в печени, содержащей основной пул кофермента и его ацилированных производных и модулируется состоянием и качеством питания, гармональными факторами, лекарственными препаратами (например, фибратами) и степенью обеспеченности организма пантотеновой кислотой [7]. Количество ацил-КоА (включая ацетил-КоА) достигает до 80% общего уровня кофермента. Соотношение ацетил-КоА, ацил-КоА и свободного кофермента оказывает ключевую роль на реакции ацил-КоА-синтетаз, мультиферментные комплексы дегидрогеназ  $\alpha$ -кетокислот. Предполагается существование ядерных пор, благодаря которым концентрация КоА-SH в цитозоле уравнивается с ядерным компартментом. В митохондриях сердца содержится до 95 % тканевого КоА. Приблизительно половина длинноцепочечных ацил-КоА обнаруживаются в микросомах [23].

Существует семейство митохондриальных мембранных транспортеров КоА и некоторых аденин-содержащих нуклеотидов, классифицируемых как SLC25A42. Возможно, он идентичен КоА-транспортирующей системе, наблюдаемой при инкубации митохондрий с пируватом и другими субстратами окислительных процессов. В пероксисомах идентифицирована иная транспортная система ABCD 1-3, опосредующая транспорт ацил-КоА. Кроме того, в пероксисомальной мембране активен переносчик SLC25A17, осуществляющий транспорт нескольких коферментов (КоА, ФАД, НАД<sup>+</sup>), а в эндоплазматическом ретикулуме существует транспортер ацетил-КоА (AT-1), осуществляющий перенос субстрата по обменному механизму со свободным КоА. Показано, что блокирование влечет индуцирование процесса клеточной аутофагии [17].

Детально изучена пантотенаткиназоассоциированная нейродегенерация (PKAN) обусловленная мутацией в гене *PANK2*. Заболевание протекает с избыточным накоплением железа в ЦНС и проявляется характерными неврологическими симптомами. В результате возрастает накопление цистеина и хелатирование железа в нейроструктурах. На клеточных культурах и в модельных экспериментах продемонстрировано падение уровня КоА-SH и ацетил-КоА в ЦНС и клетках печени. По мнению Lambrechts et al. [11] дефицит КоА влечет за собой падение активности митохондриальных ацетилпереносящих белков и процесса липилирования, приводящих к снижению пируватдегидрогеназного комплекса. Сходная картина наблюдается при мутации *COASY* с развитием КоА-синтаза-ассоциированной нейродегенерации — CoPAN. Оба вида нейродегенеративной патологии характеризуются признаком накопления железа в ЦНС, т.н. синдром NBIA, хотя блокада пируватдегидрогеназного комплекса бесспорно является важным патогенетическим механизмом нейродегенеративного процесса [28]. Рассматривается и механизм блокады синтеза сукцинил-КоА и редукции генов, ответственных за синтез гема и гемоглобина, что реально приводит к нарушению кис-

лородного транспорта и (или) редокс-баланса в структурах ЦНС [8]. Эксперименты *in vitro* демонстрируют эффективность добавления экзогенного КоА в предупреждении нейрональной гибели. Осуществлено доклиническое изучение и апробация применения аллостерического активатора PANK, в частности соединения пантазиновой группы (PZ-2891) [9]. На модели PANK2<sup>-/-</sup>-нокаутных мышей показана эффективность препарата предшественника ПАК-фосфометпантотената в восстановлении уровня КоА в клетках мозга и разработка серии циклофосфатных предшественников ФПК, способных корректировать метаболизм у пациентов, страдающих синдромом РКАН [14]. Фармакокинетические параметры фосфометпантотената [3С3-15N-180] сравнительно с меченой ПАК и биотрансформация соединений в КоА были изучены на мышах обоего пола при внутримозговом (*intrastriatally*) или внутреннем (*per os*) введении с использованием метода HPLH/MS.

Установлена более высокая скорость метаболизма пантотенатов в печени по сравнению с мозгом в обоих гендерных группах. При введении *per os* полупериод жизни КоА-SH в печени составил 69±5 ч (самцы) и 82±6 ч (самки) и 136±14 ч (самцы) и 144±12 ч (самки) в ткани мозга. Измерен период полупериода жизни ацетил-КоА, который составил 71-74 ч в печени и 117-158 ч в головном мозгу. Близкие результаты получены при внутримозговом введении фосфометпантотената (общий КоА 144±17 ч в мозгу) [17].

Полиморфизм гена *COASY* выявлен как причина понтоцеребеллярной гипоплазии (PCN) группы нейродегенеративных синдромов, но не исключается, что имеет место тотальный дефицит витаминного предшественника КоА. Сходным образом полиморфизм гена *COASY* ассоциируется с возникновением риска развития симптоматики болезни Альцгеймера. Показано, что в этой патологии возрастает метилирование гена *COASY*, что приводит к падению его экспрессии, хотя рассматривается роль фактора ацетил-КоА в возникновении холинэнергической дисфункции [27]. Обстоятельные исследования зависимости систем КоА и ацетил-КоА при моделировании неврологической патологии выполнены в Гданьском медицинском университете А. Шутовичем [1]. Локальный дефицит аккумуляции ПАК в структурах ЦНС выявлен при болезни Хантингтона, а также у пациентов с рассеянным склерозом. Предполагается, что система КоА ответственна за процесс метаболизма миелина [31]. Следует указать, что биосинтез КоА, регуляция *COASY* фосфатидилхолином и фосфатидилэтаноламином модулируется фосфолипидами (см. выше). Специфическое неврологическое расстройство описано у арабских пациентов, имеющих мутацию транспортера КоА SLC25A42 и проявляющегося падением уровня общего КоА в фибробластах, изолированных у пациентов [1].

В завершении следует добавить итог цикла работ нашей лаборатории по выявлению дефицита ПАК и КоА у пациентов с алкогольным абстинентным синдромом и алкогольным делирием. Дефицит системы КоА был у пациентов глубоко выраженным, сопутствовал интоксикационному синдрому и эффективно устранился дозозависимым назначением пантотената кальция или пантетина. Последний предшественник КоА является особо эффективным, обладает плеiotропным действием и рассматривается как перспективное фармакологическое средство для терапии неврологической патологии [1, 4].

### Список литературы

1. Мойсеёнок, А. Г. — отв. ред. Биологические функции пантотеновой кислоты. Пантотеновая кислота и мозг. Новые возможности метаболической и диетической терапии: матер. междунар. симпозиума, 28 июня 2013 г. / отв. ред. член-корр. А. Г. Мойсеёнок. — Гродно : ГрГМУ, 2013. — 88 с.

2. Мойсеёнок, А. Г. Всасывание и транспорт пантотеновой кислоты, биосинтез ее коферментной формы и возможность метаболической регуляции витаминным предшественником CoA / А. Г. Мойсеёнок, В. А. Гуринович // Питание и обмен веществ: сб. науч. ст. Вып. 1 / под ред. А. Г. Мойсеёнка. — Гродно, 2002. — С. 53–70.
3. Мойсеёнок, А. Г. Биосинтез кофермента А как универсальный механизм сопряженности экзогенности и множественности функций пантотеновой кислоты / А. Г. Мойсеёнок // Укр. биохим. ж. — 2004. — Т. 76, №4. — С. 68–81.
4. Мойсеёнок, А. Г. Пантетин: фармакологические свойства и клиническое применение / А. Г. Мойсеёнок, С. Ф. Садовникова // Пантетин: метаболизм, фармакология и регуляция обмена липидов. — Рига: Зинатне, 1991. — С. 86–92.
5. Мойсеёнок, А. Г. Пантотеновая кислота (биохимия и применение витамина) / А. Г. Мойсеёнок — Минск: Наука и техника, 1980. — 262 с.
6. Мойсеёнок, А. Г. Пантотеновая кислота: от универсального распространения к универсальным функциям / А. Г. Мойсеёнок // Биохимия, фармакология и клиническое применение производных пантотеновой кислоты: сб. науч. ст. / под ред. член-корр. НАН Беларуси А. Г. Мойсеёнка — Гродно, 2003 — 187 с.
7. Мойсеёнок, А. Г. Производные пантотеновой кислоты: разработка новых витаминных и фармакотерапевтических средств / А. Г. Мойсеёнок [и др.] — Минск: Наука и техника, 1989. — 216 с.
8. A pantothenate kinase-deficient mouse model reveals a gene expression program associated with brain coenzyme A reduction / C. Subramanian [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* — 2020. — Vol. 186. — P. 165663.
9. A therapeutic approach to pantothenate kinase associated neurodegeneration / L. K. Sharma [et al.] // *Nat. Commun.* — 2018. — Vol. 9. — P. 1–15.
10. Analysis of disulphide bond linkage between CoA and protein cysteine thiols during sporulation and in spores of *Bacillus* species / A. Zhyvoloup [et al.] // *Microbiol. Lett.* — 2020. — Vol. 367, №23. — P. 74.
11. CoA-dependent activation of mitochondrial acyl carrier protein links four neurodegenerative diseases / R. A. Jonas [et al.] // *EMBO Mol. Med.* — 2019. — Vol. 11 — e10488.
12. Coenzyme A levels influence protein acetylation, CoAlation and 4'-phosphopantetheinylation: expanding the impact of a metabolic nexus molecule / Y. Yu [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* — 2021. — Vol. 1868, №4. — P. 118965.
13. Covalent Aurora A regulation by the metabolic integrator coenzyme A / Y. Tsuchiya [et al.] // *Redox Biol.* — 2020. — Vol. 28. — P. 101318.
14. Cyclic phosphopantothenic acid prodrugs for treatment of pantothenate kinase-associated neurodegeneration / A. Giulio [et al.] // *J. Med. Chem.* — 2020. — Vol. 63, №24. — P. 15785–15801.
15. Decker, K. Die aktivierte essigsäure. Das coenzyme A und seine acyl-derivate im stoffwechsel der zelle / K. Decker. — Stuttgart, 1959.
16. Gout, I. Coenzyme A, protein CoAlation and redox regulation in mammalian cells / I. Gout // *Biochem. Soc. Trans.* — 2018. — Vol. 46. — P. 721–728.
17. Jonas, M. C. AT-1 is the ER membrane acetyl-CoA transporter and is essential for cell viability / M.C. Jonas, M. Pehar, L. Puglielli // *J. Cell Sci.* — 2010. — Vol. 123. — P. 3378–3388.
18. Kohsei, T. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 is post-translationally modified by CoA (protein CoAlation) under oxidative stress / T. Kohsei, Ki-S. Yoon, S. Ogo // *FEBS Open Bio.* — 2018. — Vol. 9, №1. — P. 53–73.
19. Pantothenic acid. / P. Trumbo [et al.] // *Modern Nutrition in Health and Disease.* — 2014. — P. 351–357.
20. Physiological roles of the pantothenate kinases / L. E. Dansie [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* — 2014 — Vol. 42. — P. 1033–1036.

21. Popov, D. Protein S-glutathionylation: from current basics to targeted modifications / D. Popov // Arch. Physiol. Biochem. — 2014. — Vol. 120. — P. 123–130.
22. Protein CoAlation: A redox-regulated protein modification by coenzyme A in mammalian cells / Y. Tsuchiya [et al.] // Biochem. J. — 2017. — Vol. 2. — P. 2489–2508.
23. Regulation of coenzyme A levels by degradation: The ‘Ins and Outs’/ P. Naquet [et al.] // Prog. Lipid Res. — 2020. — Vol. 78. — P. 101028.
24. Regulation of the CoA biosynthetic complex assembly in mammalian cells / J. Baković [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2021. — Vol. 22, №3. — P. 1131.
25. Shibata, K. Hydrolysis and absorption of pantothenate and its coenzymes in the rat small intestine / K. Shibata, C. J. Gross, L. M. Henderson // J. Nutr. — 1983. — Vol. 113. — P. 2107–2115.
26. Subcellular localization and regulation of coenzyme A synthase / A. Zhyvoloup [et al.] // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 50316–50321.
27. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction / R.T. Bartus [et al.] // Science. — 1982. — Vol. 217. — P. 408–417.
28. The pathophysiological role of CoA / A. Czumaj [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2020. — Vol. 21. — P. 9057–9087.
29. Turnover rate of coenzyme A in mouse brain and liver / L. Orsatti [et al.] // PLoS One. — 2021. — Vol. 16, №5. — e0251981.
30. Van Laer, K. Low-molecular-weight thiols in thiol-disulfide exchange / K. Van Laer, C. J. Hamilton, J. Messens // Antioxidants Redox Signal. — 2013. — Vol. 18. — P. 1642–1653.
31. Vitamin B5 (D-pantothenic acid) localizes in myelinated structures of the rat brain: potential role for cerebral vitamin B5 stores in local myelin homeostasis / N. Ismail [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2020. — Vol. 522. — P. 220–225.

---

## THE ADVANCEMENTS IN THE STUDIES OF THE COENZYME A BIOSYNTHESIS AND FUNCTIONS IN RELATION TO THE PROCESSES ASSOCIATED WITH NEURODEGENERATION

---

*Moiseenok A.G., Katkovskaya I.N.*

*Republican Scientific Research Unitary Enterprise «Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *The review is presented with the current understanding of mechanisms related to the biosynthesis and hydrolysis of coenzyme A, including their regulation and interaction with metabolic cell cycle. The phenomenon of CoAlation of protein structures is discussed in details, putting an emphasis on regulatory properties and the significance of it in the processes of the cell adaptation to oxidative damage. It is considered for the first time the process of association between the enzymes involved in CoA biosynthesis and the specific characteristics of this process under starvation and oxidative stress are described. The analysis is provided on physiological levels of CoA in biological tissues and subcellular structures corresponding to the levels of acylated metabolites of the coenzyme. The examples are given of the development of neurodegenerative pathologies due to polymorphism of genes coding key regulatory enzymes in the CoA biosynthetic pathway, including pantothenate kinase and CoA synthase. The emphasis is taken on the roles CoA deficiency in the development of alcohol dependence and the pathological states leading to demyelination processes. It is proposed to conduct the studies of pantetheine taking into account its roles being an effective modulator in the CoA biosynthetic pathways.*

## ВОЗМОЖНЫЕ D-ВИТАМИННЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

*Мойсеёнок А.Г.<sup>1</sup>, Максимчик Ю.З.<sup>1</sup>, Мойсеёнок Е.А.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup>Учреждение 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.

Распространенность инфицирования вирусом SARS-Cov-2, приобретающая характер пандемии и поразившая более 13 млн человек, приведшая к более чем 0,5 млн жертв, ставит перед медицинской общественностью и наукой проблемы безотлагательного выявления ключевых факторов как эпидемиологического процесса, так и устойчивости популяции и индивидуума к действию этого патогенного фактора. 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 короновиральной инфекции на начальном этапе, опубликованный 7 мая 2020 г. [21]. Научно-медицинское видение проблемы короновиральной 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 [39].

В дни неблагоприятного течения вирусной патологии и ее распространения на более чем 20 стран в издательстве «Беларуская наука» завершилась работа над сборником научных работ «Питание и обмен веществ», вып. 5 (научный редактор А.Г. Мойсеёнок), представляющим фактически коллективную монографию по проблеме предупреждения и диагностики дефици-

та витамина D, имеющего характер пандемии, в том числе в РФ, Республике Беларусь, Украине, и отличающейся недостаточным осознанием и восприятием со стороны медицинского сообщества в плане принятия необходимых действенных мер по ликвидации недостаточного потребления этого эссенциального фактора питания при наличии многочисленных медицинских последствий наряду с рахитом, остеопорозом, саркопенией [3]. Достаточно упомянуть неопределенность ситуации с регламентацией оптимальных доз витамина D в питании населения РФ и Республики Беларусь. 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 [8, 28]. Это активно эксплуатируется клинической медициной путем назначения препаратов витамина D при аутоиммунном тиреоидите Хасимото [2], ревматоидном артрите [37], рассеянном склерозе [34].

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<sup>+</sup> 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- $\gamma$  [1]. 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- $\gamma$ , IL-12, а также процент клеток CD4<sup>+</sup>, содержащих интрацитоплазматический IL-2 и IFN- $\gamma$ . Эффект кальцитриола наблюдался в концентрации 10<sup>-7</sup>–10<sup>-9</sup>, был очевиден в отношении секреции IL-10 и IL-5, но не IL-4. Кроме того, уменьшалась секреция IL-1, TNF- $\alpha$  и MG-CSF нормальными клетками. Ингибирующий эффект кальцитриола был получен на Th1 клонах (падение секреции IL-2 и IFN- $\gamma$ ) и Th2 клонах (IL-4). Авторы рекомендуют применение производных 1 $\alpha$ , 25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> в иммуносупрессивной терапии [26]. 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 [20, 10, 14].

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 [36]. Схожие результаты были получены при заболеваемости гриппом [25], осложненные формы которого характеризуются повышенной концентрацией в крови цитокинов IL-1 и IL-6, т. е. синдромом «цитокинового шторма», аналогичного вызываемому COVID-19 [13, 18].

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 [7]. 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) [29]. 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) [16] 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 [16]. 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 [5].

Онлайн-публикация Tibi Puiu от 05.05.2020 представляет результаты и мнение ученых [23], заостряя внимание на критическом уровне витамина D у пожилых и престарелых людей и необходимости ежедневного приема не менее 800 МЕ витамина D [23]. Есть основание полагать, что лечебно-профилактические эффекты кальциферолов достигаются при разовой дозировке превышающей 2000 МЕ [3, 4].

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 [6].

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 (22)**

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
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

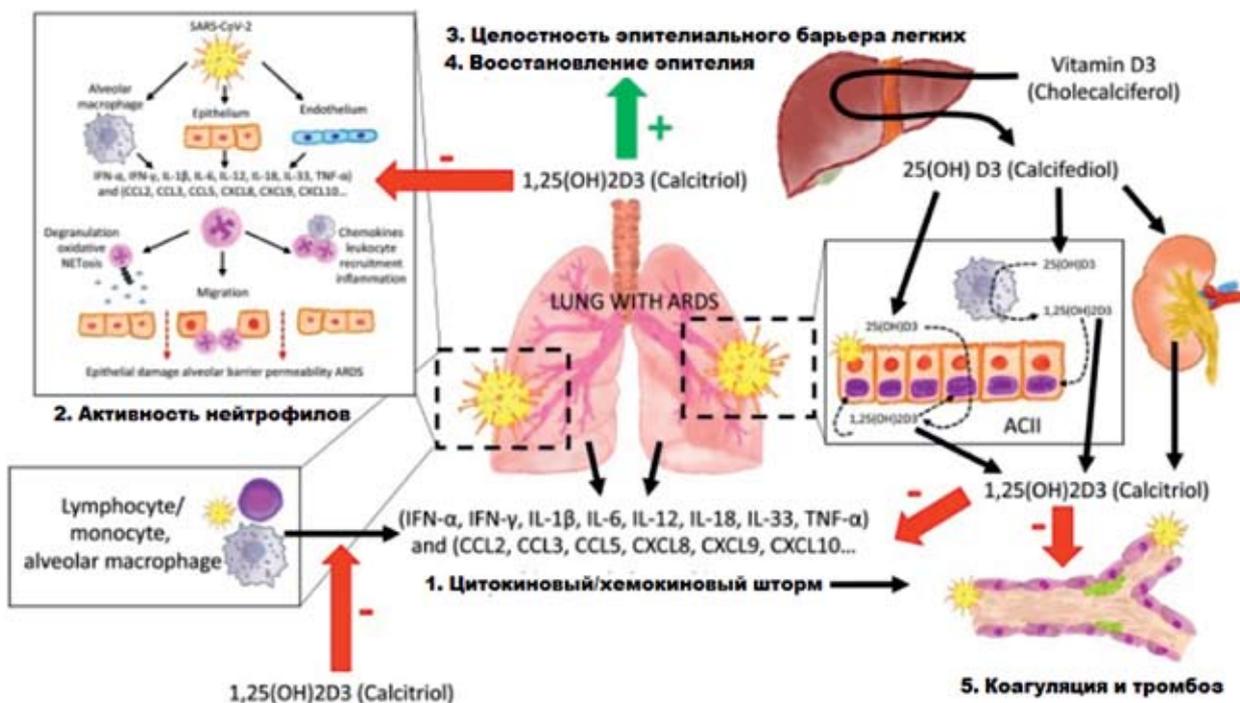
Оценка фактора риска (OR) летального исхода оказалась у пациентов в возрасте  $\geq 50$  лет — 10,45, у мужчин — 5,73, с наличием коморбидности — 11,24, с недостаточностью витамина D — 12,55, с дефицитом витамина D — 19,12. При этом показатель оценки шансов (ОШ) смертного исхода ассоциировался в высокой 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 [22].

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 активизирует нативную систему иммунной защиты снижая потенциал приобретенной иммунной защиты [3, 8, 2, 38]. 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 [27]. Возникновение и тяжесть острого респираторного дистресс-синдрома (*Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS*), (ОРДС) [13, 24] 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 [39] диктуют необходимость усиления первичной профилактики и предупреждения собственно ОРДС в фазе «цитокинового шторма», проявляющегося неконтролируемым высвобождением в кровообращение провоспалительных цитокинов (IFN- $\alpha$  и  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-33, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$  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 [24], а концентрация и соотношение цитокинов являются фактором тяжести заболевания, вследствие чрезмерной активации и привлечения нейтрофилов, Т-лимфоцитов и НК-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 продуктов 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 [12].

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 [24, 32]. В обобщенном виде механизмы действия кальцитриола и его предшественника кальцидиола (кальцидиола) представлены на рис. 1 [24].



**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 патогене-

нетическому 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 легочного эпителия [24, 31]. Более подробно этот механизм рассматривается в обзорной части работы [24].

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* [15]. Ауто- и паракринные эффекты кальцитриола проявляются в клетках альвеолярного покрытия в увеличении экспрессии антимикробного фактора пептидной природы – кателицидина, что доказано на модели вирусной инфекции [33]. В упомянутых альвеолярных клетках продемонстрирована активность кальцитриола в стимуляции фактора сурфактанта и генов плотного соединения [35]. Недавно проведенные исследования в ГрГМУ показали недостаточность витамина D как один из предикторов формирования бронхо-легочной дисплазии у недоношенных детей, получающих сурфактантную терапию [3]. Результаты упомянутых, а также некоторых иных наблюдений и экспериментов [24] 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 тромбозомболических осложнений [35]. 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 [19].

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  $\geq 50$  % 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 [17, 30]. 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 [24] 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 D<sub>3</sub> 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 метанизмов функционирования VDR [3, 4, 9]. Это обуславливает значительные проблемы в изучении и понимании потенциала противовирусной активности системы кальциферолов.

Приведенные выше проекты и ряд других демонстрируют 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

### Список литературы

1. Новиков, Д.К. Клиническая иммунология: учеб. пособие / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. — Витебск : ВГМУ, 2006. — 392 с.

2. Роль гипокальциемии и витамина D<sub>3</sub> в патогенезе фобий при хроническом аутоиммунном тиреоидите Хасимото / Ю.И. Строев [и др.] // Педиатр, 2017. — Т. 8, вып. 4. — С. 39–42.

3. 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.

4. Якубова, Л.В. Обеспеченность организма витамином D и сердечно-сосудистые заболевания / Л.В. Якубова. — Гродно : ГрГМУ, 2018. — 256 с.

5. Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung / X. Xie [et al.] // *Life Sci.* — 2006. — Vol. 78, № 19. — P. 2166–2171.
6. 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](https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3571484). — Date of access: 16.07.2020.
7. 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.
8. 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.
9. Bouillon, R. Genetic and environmental determinants of vitamin D status / R. Bouillon // *Lancet.* — 2010. — Vol. 376, № 9736. — P. 148–149.
10. 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.
11. 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.
12. Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review / Y. Zheng [et al.] // *Eur. Radiol.* — 2020. — P. 1–9.
13. 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.
14. 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.
15. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice / A. F. Fernandes [et al.] // *Nature.* — 2018. — Vol. 558, № 7708. — P. 136–140.
16. 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 // *J. Anging Clin. Exp. Res.* — 2020. — P. 1–4.
17. 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.
18. 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. 327–331.
19. Is there any association between thrombosis and tissue factor pathway inhibitor levels in patients with vitamin D deficiency? / O. Topaloglu [et al.] // *J. Clin. Appl. Thromb. Hemost.* — 2015. — Vol. 21, № 5. — P. 428–433.
20. 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 // *J. Autoimmunity.* — 1992. — Vol. 14, № 1. — P. 37–43.
21. 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.
22. Patterns of COVID-19 mortality and vitamin D: an Indonesian study [Electronic resource] / P. Raharusuna [et al.] // *Emerginnova.* — Mode of access: <https://ssrn.com/abstract=3585561>. — Date of access: 16.07.2020.

23. 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.

24. 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.

25. 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.

26. Regulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells and allergen-specific Th cell clones by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> / X. Rausch-Fan [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2002. — Vol. 128, № 1. — P. 33–41.

27. 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.

28. 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.

29. Silberstein, M. Vitamin D: A simpler alternative to tocilizumab for trial in COVID-19? / M. Silberstein // J. Medical Hypotheses. — 2020. — Vol. 140. — P. 109767. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109767.

30. 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.

31. Vitamin D alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulation of the rennin-angiotensin system / J. Xu [et al.] // J. Mol. Med. Rep. — 2017. — Vol. 16, № 5. — P. 7432–7438. doi: 10.3892/mmr.2017.7546.

32. Vitamin D attenuates lung injury via stimulating epithelial repair, reducing epithelial cell apoptosis and inhibits TGF- $\beta$  induced epithelial to mesenchymal transition / S. Zheng [et al.] // J. Biochem. Pharmacol. — 2020. — Vol. 177. — P. 113955.

33. Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF- $\kappa$ 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.

34. Vitamin D for the management of multiple sclerosis / V. A. Jagannath [et al.] // Cochrane Database Syst Rev. — 2018. — № 9. — P. CD008422.

35. 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.

36. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data / A. R. Martineau [et al.] // J. Br. Med. — 2017. — № 356. — P. i6583.

37. Vitamin D, autoimmune disease and rheumatoid arthritis / S. R. Harrison [et al.] // Calcif. Tissue Int. — 2020 — Vol. 106, № 1. — P. 58–75.

38. Vitamin D's effect on immune function / P.-J. Martens [et al.] // Nutrients. — 2020. — Vol. 12, № 5. — P. 1248.

39. 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.

## POSSIBLE D-VITAMIN MECHANISMS OF BODILY RESISTANCE TO CORONAVIRAL INFECTION

---

*Moiseenok A.G.<sup>1</sup>, Maksimchyk Yu.Z.<sup>1</sup>, Moiseenok Ye.A.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds,  
NAS of Belarus,  
Grodno, Republic of Belarus;  
<sup>2</sup>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.*

## ВАРЬИРОВАНИЕ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

*Морозова Л.А., Савельев С.В.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН»,  
г. Фрязино, Российская Федерация*

**Резюме.** В работе на основе экспериментальных данных показано, что предварительное, перед применением облучение миллиметровым и терагерцовым излучением биологически активных веществ может кардинально изменять их свойства. Эксперименты проведены на фармакологическом препарате биологического происхождения «Пантовегин». Установлено, что облучение электромагнитными волнами приводит к повышению эффективности его действия. Установлено, что ТГц-излучение обладает более активным по сравнению с ММ действием на препарат «Пантовегин».

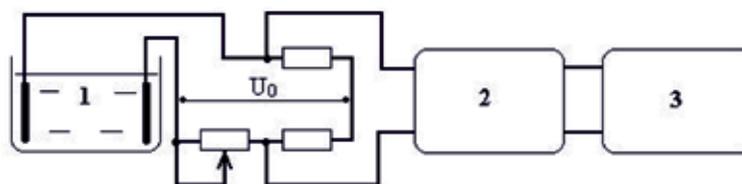
**Введение.** Воздействие миллиметрового и терагерцового излучения нетепловой интенсивности на живые объекты широко изучается и применяется на практике как средство альтернативной и восстановительной медицины [1]. Результаты воздействия разносторонни и повторяемы. Но методики исследования действия механизмов электромагнитного излучения (ЭМИ) обычно ограничены тем, что опытный живой объект состоит из великого множества сложных химических составляющих и выделить конкретную составляющую, которая и ответственна за рассматриваемый отклик на воздействие, чрезвычайно трудно. Поэтому наиболее перспективным направлением в решении поставленной задачи предлагается рассмотреть результат действия на живой объект заранее облученной субстанции. При этом субстанция должна быть получена из живого организма, частью которого она являлась.

В работе исследуется действие предварительно облученного миллиметровыми (ММ) и терагерцовыми (ТГц) электромагнитными волнами белковосодержащего препарата биологического происхождения «Пантовегин» на популяцию простейших микроорганизмов.

**Материалы и методы исследования.** Препарат «Пантовегин», широко применяемый в восстановительной медицине, является белковосодержащим препаратом, изготовленным на основе крови алтайских оленей-маралов взятых в определенный период. Субстанция препарата создана на основе обширного спектра белков и содержит большой набор минеральных веществ, аминокислот, развитую липидную фракцию, пептиды и нуклеиновые кислоты. Основное действие препарата на биологический организм состоит в воздействии белковой фракции на гомеостаз живого организма в результате образования новой биологической структуры «белок — живая клетка биологического организма».

В наших опытах показано, что предварительное облучение препарата «Пантовегин» ММ и ТГц-излучением приводит к более интенсивному и долговременному его действию на живую субстанцию.

В качестве экспериментального материала использовалась популяция одноклеточных, содержащихся в водопроводной воде. Исходя из результатов работ [2, 3], такая популяция простейших является удобным материалом для исследования воздействия ЭМИ.

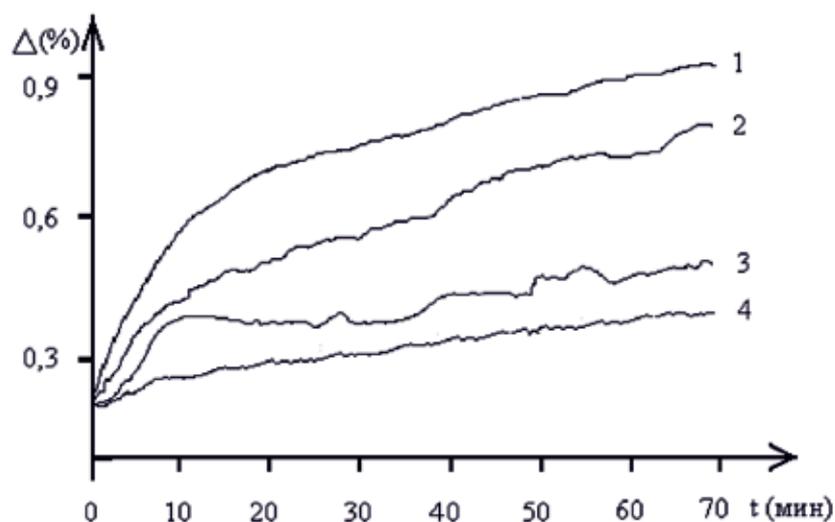


**Рисунок 1 — Схема установки измерения проводимости воды:**

1 — кювета с водой и популяцией простейших, 2 — усилитель, 3 — графопостроитель

Как и [2], в проводимых опытах концентрация простейших в исследуемой системе «популяция простейших — вода» была в пределах от 2000 шт/литр до 4000 шт/литр, так как именно такая концентрация простейших позволяла в экспериментах зафиксировать биологический эффект воздействия препарата «Пантовегин» при предварительном его облучении ММ и ТГц ЭМИ. При таких значениях концентрации простейших популяция ведет себя как единый организм, позволяя регистрировать изменения сопротивления водной среды.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Схема установки по измерению сопротивления водной среды в системе «популяция простейших — вода» при постоянном внешнем напряжении представлена на рис. 1. Кювета с системой «вода — популяция простейших» 1 емкостью 250 мл используется в качестве плеча электрической мостовой схемы, находящейся под действием постоянного внешнего напряжения  $U_0 = 20$  В. Изменение сопротивления воды в кювете приводило к возникновению напряжения разбаланса мостовой схемы, которое преобразовывалось усилителем 2 и регистрировалось в качестве временной диаграммы на графопостроителе 3, осуществлявшего графическую фиксацию изменения напряжения при однократной длительности развертки графопостроителя в течение 70 мин.



**Рисунок 2 — Временные зависимости сопротивления водной среды в системе «вода — обитающая в воде популяция» в контрольном опыте, кривая 1, и в случае облученного «Пантовегина» ММ излучением (кривые 2 и 3) и ТГц излучением (кривая 4). Время облучения для кривой 2–30 мин, для кривой 3 и 4 — 60 мин**

Разработанная методика эксперимента гипотетически базировалась на возможности фиксации отклика системы «вода — популяция простейших» в виде изменения параметров водной среды при внешнем воздействии ЭМИ. Согласно проведенным исследованиям [4–8], в соот-

ветствии с концепцией популяционного гомеостаза, внутривидовые отношения простейших обеспечивают единство популяции за счет действия популяции на воду как среду своего обитания. Тогда внешнее воздействие приводит к изменению параметров воды за счет взаимного влияния «вода — обитающая в воде популяция».

Эксперименты проводились для различных условий их проведения. Первоначально в исследуемой кювете находилась только вода с содержащейся в ней популяцией простейших с необходимой указанной выше концентрацией. В момент времени 0 в систему добавляли 5 мл препарата «Пантовегин», предварительно облученного ММ и ТГц-излучением с различной экспозицией облучения ЭМИ. При облучении использовались однонаправленные электромагнитные излучения круговой поляризации ММ излучения с длиной волны 4,2 мм (частота колебаний ЭМИ 61,2 ГГц) с плотностью потока мощности 10 мкВт/см<sup>2</sup> и ТГц диапазона с длиной волны 2 мм (частота колебаний ЭМИ 150 ГГц) с плотностью 5 мкВт/см<sup>2</sup>. Уровень облучения препарата «Пантовегин» варьировался путем изменения времени экспозиции препарата «Пантовегин» ЭМИ.

На рис. 2 представлены кривые зависимости проводимости водной среды системы «вода — обитающая в воде популяция» от времени при добавлении «Пантовегина» с различным уровнем облучения для разных длин волн. Нулевое время соответствует моменту попадания «Пантовегина» в кювету.

Кривая 1 отвечает временному изменению проводимости водной среды в контрольном эксперименте в случае необлученного «Пантовегина». Ход кривой отражает только процесс растворения «Пантовегина» и химические процессы на погруженных в водную среду контактах.

Кривая 2 отражает действие «Пантовегина» предварительно облученного 30 мин ММ-излучением. Ход кривой демонстрирует, что проводимость водной среды стабильнее в исследуемом временном интервале по сравнению с действием необлученного «Пантовегина». Однако процессы в системе «вода — обитающая в воде популяция», которые были вызваны 30-минутным облученным «Пантовегином», приводят к незначительной стабилизации проводимости водной среды. Эффект стабилизации проводимости, а значит, и гомеостаза исследуемой популяции простейших микроорганизмов наблюдается не менее, чем 140 мин.

Кривая 3 показывает действие «Пантовегина» с предварительной экспозицией 60 мин ММ-излучением. Ход кривой 3 подчеркивает более статичный процесс стабилизации сопротивления водной среды в системе «вода — популяция простейших», что говорит о более сильном воздействии 60-минутного облученного ММ-излучением «Пантовегина». Первоначальное 10-минутное изменение проводимости вызвано интенсивным процессом растворения добавляемого «Пантовегина». Длительность действия облученного «Пантовегина» с экспозицией 60 мин составляет не менее 240 мин.

Кривая 4 демонстрирует действие на исследуемую систему «вода — популяция простейших» «Пантовегина» предварительно облученного ТГц-излучением с экспозицией 60 мин. Из рис. 2 следует, что действие ТГц-излучения приводит к тому, что фармакологический препарат «Пантовегин» получает новые дополнительные свойства. Ход кривой 4 показывает, что в этом случае происходит практически полная стабилизация гомеостаза системы «вода — популяция простейших», при этом видно, что стабилизация процессов исследуемой системы начинается практически сразу после добавления препарата. Небольшой угол наклона кривой 4 относительно оси абсцисс, по порядку величины равный 1 градусу, определяется процессом растворения препарата «Пантовегин» в водной среде. Процесс стабилизации гомеостаза в проводимых экспериментах в данном случае продолжался не менее 240 мин.

В работе экспериментально устанавливалось действие препарата «Пантовегин», предварительно облученного ТГц-излучением с экспозицией 30 минут на систему «вода — популяция простейших». Эффективность воздействия препарата «Пантовегин» в этом случае была выше, чем для случая облучения ММ-излучением с аналогичной 30-минутной экспозицией. Ради простоты рис. 2 этот процесс не показан.

**Заключение.** Проведенные опыты показывают, что предварительная, перед применением экспозиция ММ и ТГц-излучением белковосодержащего препарата «Пантовегин» приводит к изменению его свойств. Воздействие препарата становится более активным, действие его способствует стабилизации гомеостаза живых организмов при внешних воздействиях. Облученный препарат «Пантовегин» с экспозицией 60 мин сохраняет свои нетрадиционные свойства не менее чем 240 мин.

Таким образом, эффект воздействия ММ и ТГц ЭМИ на лечебно-восстановительный препарат «Пантовегин» несомненно значим. Такие выводы подтверждают следующие полученные результаты.

1. Препарат «Пантовегин» может служить носителем действия ЭМИ ММ и ТГц-диапазонов длин волн. Воздействие облученного ЭМИ препарата на систему «популяция простейших — вода» говорит о том, что действие белковосодержащих лечебных средств биологического происхождения на живые организмы можно изменить (усилить или сделать более разносторонними) с помощью воздействия на них ЭМИ. Стоит отметить, что действие препарата «Пантовегин» при облучении ТГц ЭМИ более эффективно, чем при облучении ММ излучением.

2. Облученный ЭМИ ММ и ТГц диапазонов препарат «Пантовегин» может передавать это воздействие живым организмам в течение длительного промежутка времени, составляющее не менее 4 часов.

Это означает, что применение белковосодержащих препаратов биологического происхождения, подвергшихся облучению ЭМИ ММ и ТГц диапазонов длин волн, может быть целенаправленно использовано при комплексной лечебной и восстановительной терапии для оптимизации биохимических показателей организма, повышения резервных возможностей и оказания неспецифического стимулирующего действия.

### Список литературы

1. Бецкий, О.В. Миллиметровые волны и живые системы / О.В. Бецкий, В.В. Кислов, Н.Н. Лебедева. — М.: САЙНС-ПРЕСС, 2004. — 272 с.
2. Савельев, С.В. Взаимное влияние биологических систем и эффективность воздействия на них электромагнитного поля // Миллиметровые волны в биологии и медицине. — 2003. — № 4. — С. 20–27.
3. Савельев, С.В. Биологический эффект синхронизации поведения одноклеточных простейших под действием электромагнитного поля и высокоорганизованного биологического объекта / С.В. Савельев // VII Международная школа «Хаотические автоколебания и образование структур» — Хаос-2004. 1–6 октября, Саратов, Россия. — С. 100–101.
4. Савельев, С.В. О механизме воздействия миллиметровых волн / С.В. Савельев, И.В. Кузнецов // Биоэнергоинформационные взаимодействия — единство и гармония мира : труды Международной научной конференции. — Россия, Москва, 15–16 апреля 2010 г. — С. 69–71.
5. Савельев С.В. Механизм действия многочастотного и хаотического КВЧ-излучения на живые и водосодержащие объекты / С.В. Савельев, О.В. Бецкий, Л.А. Морозова // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2012. — № 11. — С. 9.

6. Савельев, С.В. Механизм действия КВЧ-излучения на живые объекты / С.В. Савельев, Л.А. Морозова // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине : науч. труды IV Международного конгресса. — Санкт-Петербург, 2–6 июля 2012. — С. 181.

7. Савельев, С.В. Влияние электромагнитного излучения на живые объекты / С.В. Савельев, Л.А. Морозова // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине : науч. труды IV Международного конгресса. — Санкт-Петербург, 2–6 июля 2012. — С. 30.

8. Савельев, С.В. Крайне высокочастотное излучение и его воздействие на живые организмы / С.В. Савельев, О.В. Бецкий, Л.А. Морозова // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2013. — Вып. 12. — С. 29–33.

## **VARIATION OF PROPERTIES OF PHARMACEUTICAL PREPARATIONS OF BIOLOGICAL ORIGIN EXPOSED TO MILLIMETER RADIATION**

---

*Morozova L.A., Savelyev S.*

*Federal State Budgetary Institution of Science V.A. Kotelnikov  
Institute of Radiotechnology and Electronics, RAN, Fryazino, Russia*

**Summary.** *Based on experimental data, it is shown that preliminary, prior to use, irradiation of biologically active substances with millimeter and terahertz radiation can dramatically change their properties. The experiments were conducted on a pharmaceutical preparation of biological origin «Pantovegin». It has been established that irradiation with electromagnetic waves leads to an increase in the efficiency of its action. It has been established that THz radiation has a more active effect on the Pantovegin preparation compared to MM.*

## ВОЗДЕЙСТВИЕ МИЛЛИМЕТРОВОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НЕТЕПЛОВОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА И ОРГАНИЗМЫ

---

*Морозова Л.А., Савельев С.В.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН»,  
г. Фрязино, Российская Федерация*

**Резюме.** В работе предложена и экспериментально подтверждена теория действия КВЧ-излучения на растворы биологически активных веществ и живые организмы. Механизм действия КВЧ-излучения основан на том, что непосредственное воздействие оказывает радиоотклик биологических и водосодержащих объектов при облучении миллиметровыми волнами.

**Введение.** Особенность воздействия ММ-волн состоит в том, что биологическая активность на живые организмы проявляется уже при низком нетепловом уровне плотности излучения ЭМВ. В конце 90-х годов для моделирования ММ-волн с живыми объектами была высказана гипотеза об информационно-резонансном характере взаимодействия ЭМВ ММ с биосредой. Однако с этих позиций оказалось трудно объяснить, каким образом информация об облучении передается вглубь водосодержащих субстанций и биологических организмов, так как ММ-волны проникают в водосодержащие биологические среды не более чем на 1 мм.

Кроме того, с точки зрения гипотезы об информационно-резонансном воздействии ЭМВ ММ на биологические среды оказалось затруднительно объяснить экспериментальные результаты и наблюдаемые эффекты. Исследования взаимодействия ММ-излучения с биообъектами различного уровня организации (молекулярный, клеточный, организменный) показывают необычные свойства такого взаимодействия. Это частотно-зависимые эффекты, зарегистрированные при исследовании процессов клеточного деления микроорганизмов [1], пороговый характер биологических эффектов по КВЧ-мощности, независимость биологического эффекта от интенсивности облучения в широком диапазоне изменения мощности облучения ЭМВ, составляющее во многих случаях несколько порядков [2]. Важно отметить и факт, зарегистрированный при клинических исследованиях показывающий, что в зависимости от характера заболевания наибольший терапевтический эффект наблюдается при воздействии на организм одновременно несколькими различными частотами ММ-диапазона [3]. Однако общепринятой трактовки теоретических основ, определяемых механизмы вышеуказанных эффектов, до сих пор предложено не было. Не объясняет и факта передачи в глубь биосреды информации о воздействии ЭМВ ММ-диапазона ни гипотеза об информационно-резонансном характере взаимодействия ММ ЭМВ с биосредой, ни другие предложенные физические и биомедицинские модели.

В настоящей работе предложен механизм информационной трансляции воздействия ЭМВ ММ диапазона в глубь биосреды на основе радиоотклика облучаемых объектов.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Разработанные радиофизические методы регистрации отклика процесса взаимодействия ММ-волны с объектами различной природы показывают, что отклик биологических объектов представляет собой сверхширокий спектр

электромагнитных колебаний, включающий, как минимум, ЭМВ от радио до сантиметрового диапазона длин волн [4–6; 9]. Спектральный состав отклика в каждом конкретном случае индивидуален и зависит от множества факторов, таких как спектр и мощность ММ волны, параметры облучаемого объекта, в которые входят: его состав, температура, физическое окружение и пр. Регистрация полного спектра отклика связана с непреодолимыми трудностями. Так, к примеру, отмечается, что при облучении потоком мощности  $10 \text{ мкВт/см}^2$  ММ ЭМВ на разрешенных длинах волн, 4,9 мм (60,12 ГГц), 5,6 мм (53,33 ГГц) и 7,1 мм (42,19 ГГц), для регистрации отклика от человека или животного на частотах 0,4 и 1 ГГц при полосе принимаемых частот 50 МГц необходима чувствительность  $10^{-16}$  Вт [4]. Отсюда и следует отсутствие возможности полной регистрации отклика объекта на воздействие ММ-волн.

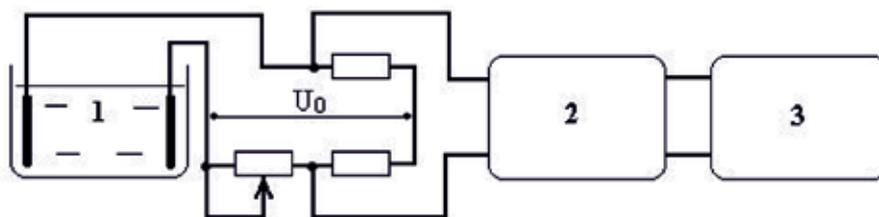
В настоящей работе на основе экспериментальных данных доказываем, что действие ММ ЭМВ на биологические объекты основано на воздействии именно радиоотклика водосодержащих и биологических объектов при облучении миллиметровыми волнами.

Для доказательства заявленного положения авторами проведены экспериментальные данные по воздействию ЭМВ различной длины волны на биологические водосодержащие объекты. Для этого были проведены эксперименты по фиксации воздействия ЭМВ различной длины (от метров до миллиметров) на популяцию простейших микроорганизмов. В экспериментах фиксировалась временная динамика изменения проводимости водной среды с обитающей в ней популяции простейших микроорганизмов. Приведены экспериментальные кривые зависимости проводимости водной среды от времени популяции простейших при облучении ЭМВ миллиметрового и сантиметрового диапазона. Динамика изменения сопротивления воды в реальном времени позволяет конкретизировать механизм действия ЭМИ на систему «вода — обитающая в воде популяция простейших микроорганизмов» (ВПП) с помощью сравнительного анализа такого действия для различных длин волн облучающих сигналов.

В качестве биологического водосодержащего объекта исследования была выбрана популяция простейших микроорганизмов в водной среде, так как достоверность результата воздействия ЭМИ в данном случае возможно было фиксировать по нескольким параметрам. Популяция простейших представляла собой набор особей микроорганизмов в результате их естественного развития при нормальных условиях в обычной водопроводной воде с концентрацией от 1000 до 4000 шт/литр.

Проведенные исследования показали, что действие ММ ЭМВ на систему ВПП при указанной концентрации простейших приводит к биологическому изменению проводимости водной среды [7]. В настоящей работе используется аналогичная методика биологической регистрации действия ЭМИ [7].

Схема экспериментальной установки по измерению проводимости водной среды системы (ВПП) при постоянном внешнем напряжении представлена на рис. 1. Кювета с ВПП 1 используется в качестве плеча мостовой схемы. Напряжение питания  $U_0 = 20$  В, что позволяет не учитывать электролитические напряжения воды — контактные электроды. Значения постоянных сопротивлений равнялись 10 кОм, значение переменного сопротивления составляло 15 кОм. Изменение сопротивления воды в кювете приводит к возникновению напряжения разбаланса мостовой схемы, которое преобразуется усилителем 2 и регистрируется в качестве временной диаграммы на графопостроителе 3, осуществляющего графическую фиксацию изменения напряжения при однократной длительности развертки графопостроителя в течение 70 мин. Значение постоянной времени измерительной цепи составляет 0,5 сек, что при чувствительности установки  $5 \cdot 10^{-2}$  %/см позволяет регистрировать процессы только большой длительности.

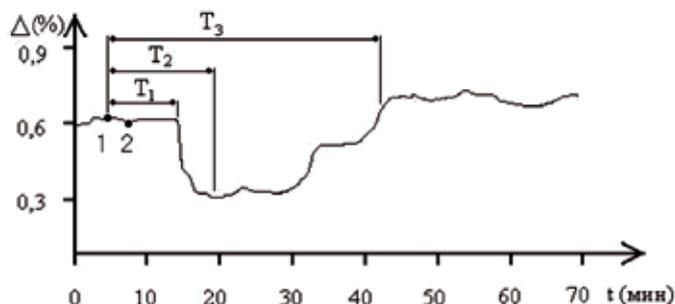


**Рисунок 1 — Схема установки измерения проводимости воды:**

1 — кювета с водой и популяцией простейших; 2 — усилитель-преобразователь;  
3 — графопостроитель

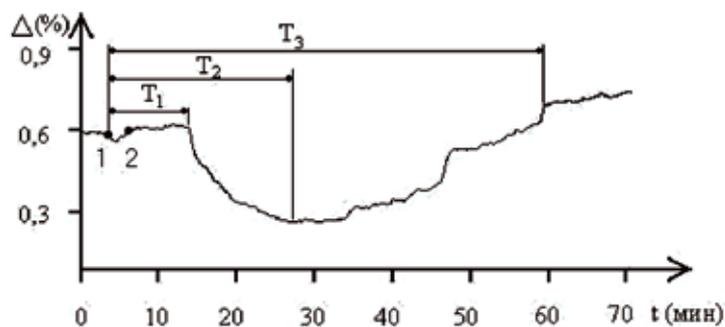
Разработанная методика эксперимента гипотетически базируется на возможности фиксации изменения параметров водной среды в системе ВПП при внешнем воздействии ЭМИ. Действительно, согласно концепции популяционного гомеостаза [8], внутривидовые отношения простейших обязаны обеспечивать единство популяции простейших за счет действия популяции на воду как среду своего обитания. Тогда воздействие ЭМИ произвольной длины волны на популяцию, в случае восприимчивости биологического объекта к ЭМИ, должно приводить к изменению параметров воды за счет взаимного влияния воды.

На рис. 2 и 3 представлены зависимости проводимости водной среды в системе ВПП от времени при облучении ЭМИ на частотах 5630 МГц (длина волны 5,33 см) (рис. 2), и 42,25 ГГц (разрешенная длина волны КВЧ-терапии — 7,1 мм) (рис. 3). Плотность потока ЭМИ в обоих случаях составляла 10 мкВт/см<sup>2</sup>. Значения концентраций и температур в исследуемых системах представлены в подписях к соответствующим рисункам.



**Рисунок 2 — Зависимость сопротивления водной среды от времени при действии ЭМИ на частоте 5630 МГц (длина волны 5,33 см) 1000 шт./литр, температура в системе ВПП — 16 °С**

Ход кривых на рис. 2 и 3 показывает идентичность протекающих процессов в системе ВПП при облучении ЭМИ с сильно разнесенными значениями длин волн. Рассмотрим рисунки более подробно. Облучение исследуемой системы ВПП ЭМИ производилось в обоих случаях в интервале между точками 1 и 2, показанных на рис., и составляло 1,5 мин. Качественно картины результатов действия ЭМИ повторяют друг друга. Ход приведенных кривых позволяет выделить три характерных временных интервала:  $T_1$  — время от облучения до начала процесса падения проводимости водной среды,  $T_2$  — время достижения минимума проводимости водной среды,  $T_3$  — время восстановления проводимости водной среды в системе ВПП. Наличие времени  $T_1$  равное по порядку величины 10 мин говорит о биологическом характере фиксируемых в системе ВПП процессов. Различие значений характерных времен в экспериментах объясняется постоянным изменением концентраций простейших и температур водной среды в исследуемых системах ВПП.



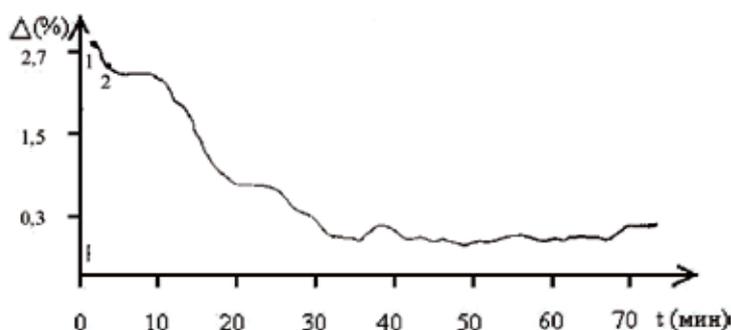
**Рисунок 3 — Зависимость сопротивления воды от времени при действии ЭМИ на частоте 42,3 ГГц (длина волны 7,1 мм) при концентрации простейших 2000 шт./литр, температура в системе ВПП — 19 °С**

Несовпадение значений характерных времен на рис. 2 и 3 может определяться также различием частот облучаемых сигналов. Действительно, в случае облучения ММ ЭМИ основное действие на систему ВПП производит излучение отклика. В то время как при облучении сантиметровыми волнами значительное воздействие на ВПП производится первичным излучением.

Исходя из результатов работы [4, 9], а также из представленных результатов настоящей работы, важным видится факт, что каждое конкретное воздействие ММ ЭМИ на биосреду характеризуется своим радиооткликом. Спектр радиоотклика зависит от типа облучаемого сигнала и от биосреды, что подтверждает значимость факта индивидуальности спектра радиоотклика от исследуемой системы в каждом конкретном случае облучения ЭМИ.

В рамках настоящей работы, кроме указанных частот, были проведены исследования проводимости водной среды системы ВПП для облучения ЭМИ на частотах 1, 3.3, 12, 53.33, 60.12, 112, 150 ГГц. Полученные кривые динамики проводимости водной среды в исследуемых системах ВПП также качественно аналогичны результатам, представленным на рис. 2 и 3. Отличаются количественные показатели процессов.

Так, на рис. 4 представлено изменение сопротивления водной среды популяции простейших микроорганизмов при действии ЭМИ на частоте 150 ГГц. Для наглядности рис. 4 представлен при той же самой развертке графопостроителя, что и рис. 2 и 3.



**Рисунок 4 — Зависимость сопротивления воды от времени при действии ЭМИ на частоте 150 ГГц (длина волны 2 мм) при концентрации простейших 4000 шт./литр, температура в системе ВПП — 18 °С**

Рисунок демонстрирует, что падение сопротивления воды наблюдается в системе вода — обитающая в воде популяция простейших практически сразу после начала облучения. Облучение системы вода — обитающая в воде популяция производилось во временном интервале

между точками 1 и 2. Процесс уменьшения сопротивления водной среды в этом случае более четко выражен: относительное падение сопротивления в три раза превышает данный параметр по сравнению с воздействием на частоте 42,3 ГГц. Так же увеличено и время падения сопротивления, которое составляет в данном случае 50 минут. Временной интервал роста сопротивления водной среды в данном эксперименте составил 110 минут и не вошел в состав рисунка. Столь значительное изменение характерных времен рассматриваемого процесса по сравнению с воздействием ЭМИ на частоте 42,3 ГГц определяется, по-видимому, увеличением энергии кванта действия ЭМИ. Однако качественно процессы изменения проводимости водной среды, представленные на рис. 2, 3 и 4 повторяют друг друга.

Качественное совпадение результатов полученных в проведенных экспериментах для различных значений частот облучения ЭМИ свидетельствует об идентичности механизма действия внешнего ЭМИ различной длины волны на водосодержащие и живые объекты. Это означает, что в случае облучения биологического объекта ММ ЭМИ основное воздействие на объект производит радиоотклик. Из проведенных исследований и работы [4] можно заключить, что спектр радиоотклика водосодержащего биологического объекта на воздействие ММ ЭМИ может находиться, как минимум, в пределах от метрового до верхнего края миллиметрового диапазона длин волн.

Предложенный в настоящей работе механизм взаимодействия ММ ЭМИ на водосодержащие и биологические объекты позволяет во многом по-новому подойти к объяснению многих ранее полученных экспериментальных материалов. Рассмотрим их:

1. Передача информации об облучении ММ ЭМИ вглубь водосодержащих и биологических сред происходит путем радиоотклика, зависящего как от вида воздействующего сигнала, так и от объекта облучения. Широкий диапазон радиоотклика объясняет проникновение в глубь водосодержащих сред информации о воздействии КВЧ-излучения.

2. Взаимодействие одночастотного КВЧ-излучения с биообъектами обычно носит частотно-зависимый характер [1], или, как принято говорить, зависимость эффекта взаимодействия может иметь резонансную характеристику от частоты облучаемого сигнала. Предложенный в работе механизм воздействия ММ ЭМИ на биообъект, а также результаты работы [4], дают возможность объяснить подобное явление. А именно, КВЧ-частоты на которых воздействие ЭМИ не проявляется, соответствуют близкому к нулю радиоотклику. Или радиоотклик на таких частотах не соответствует данному биологическому объекту.

3. Рассмотрим пороговый эффект по КВЧ-мощности, проявляющийся в том, что при достижении некоторого уровня мощности облучаемого сигнала значение эффекта остается практически постоянным. В этом случае удобно подойти с энергетической точки зрения. Значимым утверждением является то, что энергия радиоотклика в первом приближении прямо пропорциональна количеству молекул воды, попавших под облучение ММ ЭМИ, которое в свою очередь является линейной функцией глубины проникновения энергии облучения. Обычно в экспериментах глубина проникновения ММ ЭМИ не превышает размера исследуемых биообъектов из-за сильного поглощения. Тогда, исходя из экспоненциального закона поглощения ЭМИ водными средами, простой расчет показывает, что количество молекул воды попавших под облучение при увеличении мощности ММ ЭМИ облучения в 100 раз, его глубина проникновения увеличится в 5,6 раз, при увеличении мощности в 1000 раз глубина проникновения увеличится в 7,9 раза и т. д. Соответственно настолько же увеличится и количество облученных молекул воды, участвующих в генерации радиоотклика, а значит, как максимум, и его мощность и эффективность его действия. Логарифмический вид функциональной зависимости глубины про-

никновения ММ ЭМИ от мощности облучаемого сигнала и объясняет наблюдаемый в экспериментах пороговый характер эффективности воздействия по КВЧ-мощности.

4. Согласно клиническим исследованиям в лечебной практике наблюдается увеличение терапевтического эффекта при воздействии на организм сигнала одновременно на нескольких различных частотах ММ-диапазона. Исходя из предложенной в настоящей работе теории, такой результат объясняется тем, что в многочастотном случае КВЧ-облучения радиоотклик имеет более развитый спектр, а значит и большее число соответствующих для данного организма составляющих. Кроме того, вероятность попадания значения частоты облучаемого сигнала в «мёртвую зону» биологического объекта, где радиоотклик не коррелирует с исследуемым живым организмом или близок к нулю, резко снижена, по сравнению с одночастотным режимом облучения.

Предложенный механизм действия ММ ЭМИ на живые объекты и водосодержащие среды является значимым при объяснении практически всех спорных моментов в современной биофизике. Экспериментальные факты, ранее не имеющие теоретической трактовки, получили объяснение в рамках предложенной теории, что доказывает правомерность выдвинутой в настоящей работе концепции механизма взаимодействия КВЧ-излучения с водосодержащими и биологическими объектами.

**Заключение.** Анализ результатов, приведенных в работе, позволил предложить новую теорию о взаимодействии ММ ЭМИ водосодержащих сред и живых организмов. Основным положением является утверждение, что влияние ММ ЭМИ основано на действии радиоотклика. Теория подтверждается результатами проведенных в работе экспериментов по облучению биологических водосодержащих систем ВПП ЭМИ с существенно различными длинами волн.

На основе разработанной теории действия ММ ЭМИ на биологические и водосодержащие объекты нашли свое теоретическое объяснение такие основополагающие экспериментальные факты, как передача информации облучения ММ ЭМИ в глубь водосодержащих сред, частотно-зависимый характер такого взаимодействия, пороговый биологический эффект от мощности облучаемого КВЧ-сигнала, эффект повышения терапевтического действия КВЧ-терапии при одновременном облучении сложным сигналом с несколькими различными частотами.

### Список литературы

1. Сессия отделения общей физики и астрономии АН СССР, 17–18 января 1973 / Н.Г. Девятков [и др.] // Успехи физ. наук, 1973. — Т. 110, № 3. — С. 102–109.
2. Бецкий, О.В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в медицине и биологии / О.В. Бецкий, Н.Д. Девятков, В.В. Кислов // Биомедицинская радиоэлектроника. — 1998. — № 4. — С. 13–29.
3. Бецкий, О.В. Миллиметровые волны и живые системы / О.В. Бецкий, В.В. Кислов, Н.Н. Лебедева. — М.: САЙН-ПРЕСС, 2004. — 272 с.
4. Особая роль системы «миллиметровая волна — водная среда» в природе / Н.И. Синицын [и др.] // Биомедицинская радиоэлектроника. — 1999. — № 1. — С. 3–21.
5. Взаимодействие физических и биологических объектов с электромагнитным излучением КВЧ-диапазона / В.И. Петросян [и др.]. — РЭ. — 1995. — Т. 40. — Вып. 1. — С. 127–134.
6. Физика взаимодействия миллиметровых волн с объектами различной природы / В.И. Петросян [и др.] // Радиотехника, 1996. — № 9. — С. 24–29.
7. Савельев, С.В. Взаимное влияние биологических систем и эффективность воздействия на них электромагнитного поля / С.В. Савельев // Миллиметровые волны в биологии и медицине. — 2003. — № 4. — С. 20–27.

8. Шилов, А.И. Эколого-физиологические основы популяционных отношений у животных / А.И. Шилов. — М.: МГУ, 1997. — 260 с.
9. Савельев, С.В. Механизм действия крайне высоких частот на биологические и водосодержащие объекты / С.В. Савельев, Л.А. Морозова // РНТОРЭС им. А.С. Попова / Взаимодействия биологических объектов и радиоэлектронных устройств: материалы науч.-тех. семинара / С.В. Савельев. — М., 2012. — С. 24–30.
10. Савельев, С.В. Механизм действия многочастотного и хаотического КВЧ-излучения на живые и водосодержащие объекты / С.В. Савельев // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2012. — № 11. — С. 9.
11. Савельев, С.В. Механизм действия КВЧ-излучения на живые объекты / С.В. Савельев // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине: науч. труды IV Международного конгресса. — Санкт-Петербург, 2–6 июля 2012. — С. 181.
12. Савельев, С.В. Влияние электромагнитного излучения на живые объекты / С.В. Савельев // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине : науч. труды IV Международного конгресса. — Санкт-Петербург, 2–6 июля 2012. — С. 30.
13. Савельев, С.В. Крайне высокочастотное излучение и его воздействие на живые организмы / С.В. Савельев // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2013. — № 12. — С. 29–33.

---

## EFFECT OF MILLIMETER ELECTROMAGNETIC RADIATION OF NON-THERMAL INTENSITY ON BIOLOGICAL SUBSTANCES AND ORGANISMS

---

*Morozova L.A., Savelyev S.V.*

*Federal State Budgetary Institution of Science V.A. Kotelnikov  
Institute of Radiotechnology and Electronics, RAN, Fryazino, Russia*

**Summary.** *The theory of the action of EHF radiation on solutions of biologically active substances and living organisms is proposed and experimentally confirmed. The mechanism of action of EHF radiation is based on the fact that the radio response of biological and water-containing objects when irradiated by millimeter waves has a direct effect.*

## РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И РАЗРАБОТКА НА ИХ ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННО- ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

---

*Нефёдов Л.И.*

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

**Резюме.** Мини-обзор современных литературных и собственных данных о регуляторном действии свободных аминокислот и разработке на их основе лекарственно-профилактических препаратов.

Разработка и постоянное совершенствование высокоэффективных и высокочувствительных хроматографических методов аминокислотного анализа позволили идентифицировать в биологическом материале эндогенные концентрации ( $10^{-9}$ – $10^{-12}$  М) соединений этого класса и их многочисленных дериватов [1-2].

Результаты определения свободных аминокислот и их производных в жидкостях и тканях человека, полученные в последние десятилетия, позволили систематизировать накопленные данные и обозначить области эксплуатации их биологического действия, в первую очередь — в лабораторной диагностике целого ряда патологических процессов и применении в клинической практике в качестве лекарственно-профилактических препаратов [3].

Значимое число исследований посвящено поиску маркерных аминокислот или их структурных аналогов с целью диагностики различных заболеваний. Поскольку свободные аминокислоты представлены широким спектром родственных по химической структуре и метаболическим превращениям соединений, формирующих в физиологических жидкостях и тканях аминокислотный фонд, доказано, что количественное определение их пула применимо в диагностике нарушений гепатобилиарной, сердечно — сосудистой, иммунной систем, онкопатологии и цереброваскулярной недостаточности, алкоголизма и диабета [9 -12].

Оказалось, что в подавляющем большинстве случаев диагностическую и прогностическую весомость имеют групповые сдвиги в уровнях функционально и метаболически связанных аминокислот и их производных, а не специфические изменения концентраций отдельных соединений этого класса [5-10]. При этом достаточно высокую информативность имел характер аминокислотных профилей жидкостей и тканей организма животных и человека при их сравнении методами многомерного математического анализа и моделирования [11,12].

Одновременно, убедительно продемонстрировано, что устранение или коррекция изменений промежуточного обмена веществ могут быть достигнуты применением отдельных аминокислот и их дериватов, либо комбинацией их мини-композиций в качестве универсальных природных биорегуляторов — соединений, влияющих непосредственно на механизмы клеточного метаболизма в физиологических (эндогенных) концентрациях [1,3,4,7,12-14].

На сегодняшний день имеется более, чем достаточно доказательств значимости аминокислот не только в качестве строительных блоков для синтеза белка, но регуляторов экспрессии генов на уровне мРНК по mTOR-зависимому механизму, сигнальных молекул и модификаторов

биологических реакций, а также предшественников широкого спектра биорегуляторов, играющих ключевую роль в интеграции основных метаболических потоков [13-19].

С позиций метабомики аминокислотный пул биологических жидкостей и фонд свободных аминокислот тканей оценивается как единое информационное целое, представляющее собой своеобразную «химическую проекцию» генома, реализуемую через протеом. Такой подход не только развивает представления о пуле аминокислот как динамической системе, формируемой поступлением их извне, а также за счёт эндогенного синтеза, транспорта, деградации и выведения, но и позволяет выявлять «узловые пункты» промежуточного обмена веществ, сдвиг равновесия в которых может отражаться на соотношениях эндогенных уровней отдельных аминокислот и родственных (метаболически связанных с ними) соединений [14 - 18].

В современных условиях в комплексе лечения больных одно из ведущих мест занимает инфузионно-трансфузионная терапия, в основе которой лежит применение кровезаменителей. Вместе с тем, до настоящего времени 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 плазмозаменителей способствует реализации одной или нескольких задач, оставляя другие, не менее важные, на втором плане, что усложняет максимально адекватное лечение [20-25].

В последнее время в экспериментальной и клинической трансфузиологии все большее предпочтение отдается разработке и применению многокомпонентных кровезамещающих растворов полифункционального действия. Значимое место в этом направлении занимают растворы искусственных смесей высокоочищенных субстанций аминокислот. При этом препараты на основе аминокислот (Полиамин) (Россия), «Аминостерил КЕ 10%» (ФРГ), «Вамин» (Швеция), «Фриамин» (США) и многие другие разработаны в первую очередь на основе суточной потребности в белке для поддержания положительного азотистого баланса и применяются прежде всего с заместительной целью [26].

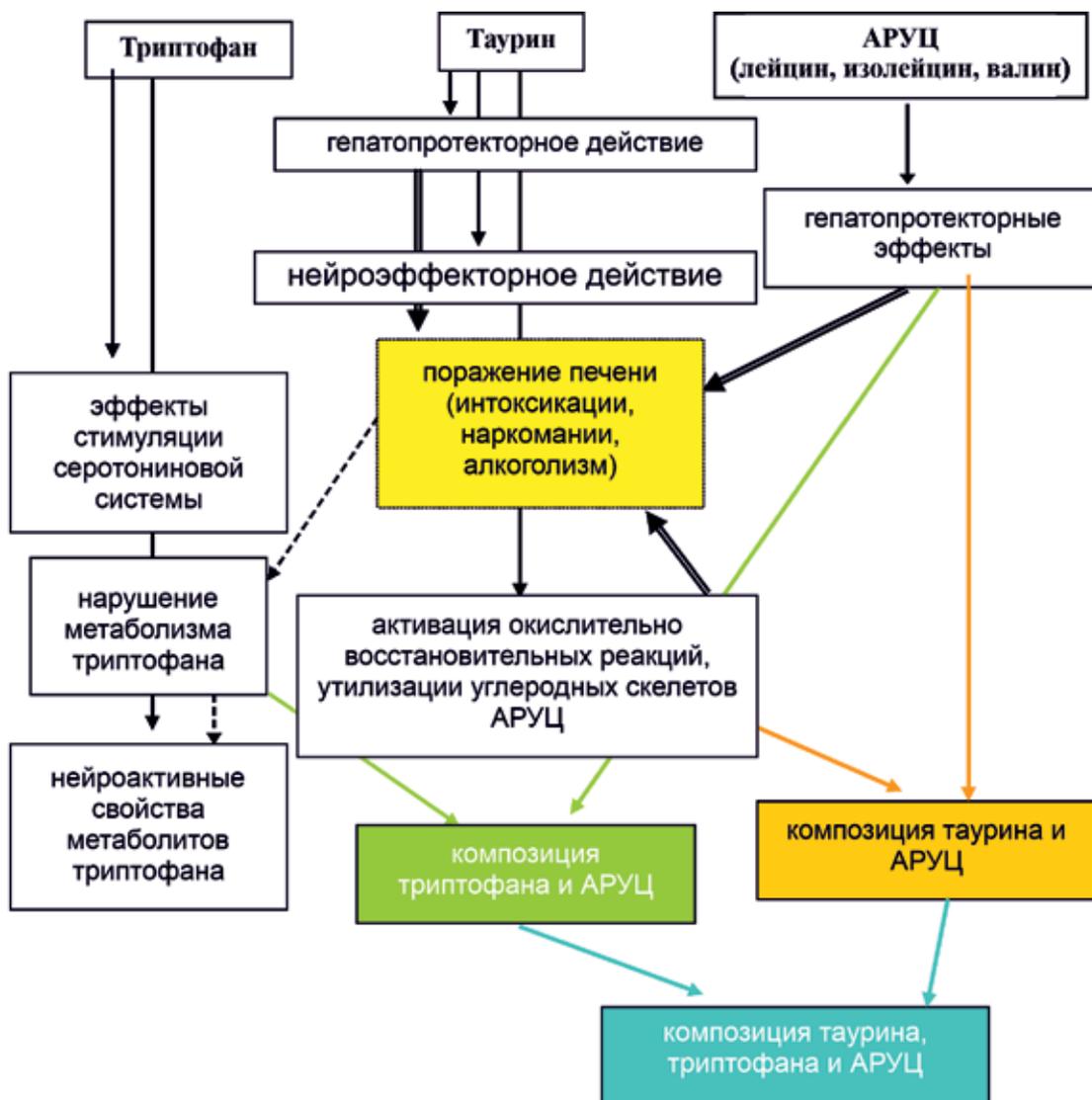
Исследования в ИБХ НАН Б в рамках выполнения (1994 - 2002 гг.) биохимического раздела государственной программы «Лекарственные препараты» позволили продемонстрировать регуляторное действие аминокислот, определяющих закономерности формирования метаболического дисбаланса при различных патологических состояниях и заболеваниях человека [6,7,9,10].

Далее, на основе органной специфики и особенностей межорганного метаболизма для реализации биохимически обоснованного действия отдельных аминокислот разработаны и применяются специализированные рецептуры их искусственных смесей, сочетающие условия парентерального питания и патогенетической коррекции патологии печени («гепаамины»), почек («нефроамины») или применения в педиатрической практике («аминопед»). Такие аминокислотные растворы содержат значимо больше (разветвлённые, серосодержащие) или меньше (ароматические) отдельных субстанций аминокислот или включают главным образом незаменимые аминокислоты. При оценке эффективности этой группы аминокислот пользуются результатами клинических лабораторных исследований и критериями их специфической фармакологической активности. [26].

Накопленный опыт экспериментальных исследований и клинического применения отечественных препаратов: радио- и гепатопротекторного действия - «таурин», иммуномодуляторного - «лейцин», антинаркотического - «триптофан») или их миникомпозиций (антиоксидантного действия - «тавамин», антинаркотического - «триптамин», нейромодуляторного - «нейрамин») вы-

сокоочищенных аминокислот [12, 29 - 31] свидетельствует о возможности применения многокомпонентных растворов аминокислот с концентрацией каждого соединения, рассчитанной в соответствии с его метаболическим профилем в крови человека при конкретном заболевании.

Предлагаемая нами методология разработки рецептур новых пероральных и инфузионных растворов на основе аминокислот и родственных соединений, предназначенных для коррекции возникающего при различных заболеваниях метаболического дисбаланса, основана на применении результатов исследования закономерностей формирования аминокислотного фонда в биологических жидкостях и тканях человека при различных патологических состояниях [9-17, 28].



**Рисунок 1 - Регуляторное действие аминокислот, определяющих закономерности формирования метаболического баланса при различных патологических состояниях и заболеваниях человека.**

Состав и количества высокоочищенных аминокислот в таких инфузионных растворах должен определяться прежде всего их физиологическими (эндогенными, регуляторными) концентрациями, что отличает их от традиционно применяемых растворов аминокислот для парентерального питания, где содержание их компонентов рассчитывается исходя из суточной потребности в них организма человека без должного учёта регуляторного действия вводимых соединений.

Предлагаемые для разработки многокомпонентные пероральные и инфузионные растворы на основе аминокислот 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 гемокорректоров, быть абсолютно безопасными, не вызывающими развитие аллергических реакций, предупреждающими развитие осложнений, вызванных повреждениями различного генеза.

### Список литературы

1. Fekkes D. State of the art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples / D. Fekkes // *J. Chromatography B*. — 1996. — Vol. 682, № 1. — p. 3–22
2. Amino Acids Application manual / Pickering Laboratories, Inc. // Cat. No. 0101-0004 Version 2.0. — 2002. — p. 1 — 46
3. Lubec C. Amino Acids (Chemistry, Biology, Medicine) / ed. C. Lubec, J.A. Rosenthal — N. Y.: Escom. — 1990. — 1196 p.
4. Островский Ю.М., Островский С.Ю. Аминокислоты в патогенезе диагностики и лечении алкоголизма / Островский Ю.М., Островский С.Ю. — Мн.: — 1995. — 280 с.
5. Дмитриев А.Л. Электрофизиологические процессы в скелетных мышцах и метаболизм свободных аминокислот при болевом синдроме и гипокинезии: способы коррекции: дис. ... докт. мед. наук: 14.00.17 / А.Л. Дмитриев — Гродно, 1996. — 169 л.
6. Amino Acids and their Derivatives / ed. V. Soldatov, L. Nefyodov // *Proc of Internat. Symp; Grodno*. — 1996. — 125 p.
7. Biological activity and transport of drugs / ed. L. Nefyodov // *Proc of Internat. Symp.; Grodno*. — 1999. — 189 p.
8. Климович И.И. Облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей и роль свободных аминокислот и их производных в патогенезе и лечении (клинико-экспериментальное исследование): дис. ... докт. мед. наук: 14.00.27 / И.И. Климович — Гродно, 2000. — 254 с.
9. VI Ordinary General Assembly Society of Biochemistry of Belarus / ed. L. Nefyodov // *Proc of Internat. Symp.; Grodno*. — 2000. — 225 p.
10. Amino Acids and their Derivatives / ed. L. Nefyodov // *Proc of Internat. Symp.; — Grodno*. — 2001. — 124 p.
11. Нефёдов, Л.И. Формирование фонда свободных аминокислот и их производных в условиях метаболического дисбаланса: ... дис. докт. мед. наук: 03.00.04 / Л.И. Нефёдов; ИРБ НАН Беларуси. — Минск, 1993. — 264 с.
12. Нефёдов Л.И. Итоги разработок и исследований биохимии азотсодержащих соединений природного происхождения: методология эксплуатации их биологических свойств в качестве универсальных природных регуляторов обмена веществ и лекарственных препаратов / Л. И. Нефёдов // *Вестник ГрГУ им. Янки Купалы*. — 2010. — Сер. 2, № 3, (102). — с. 150–153.
13. Nefyodov L.I. Planowa regulacja rywnowagi metabolizmu aminokwasami i strategia ich zastosowania w jakości nowych efektywnych preparatów leczniczych / L.I. Nefyodov // *XXXVII Zjazd Polskiego towarzystwa biochemicznego*. — Torun. — 2001. — s. 327.
14. Fafournoux P. Amino acid regulation of gene expression / P. Fafournoux [et al] // *Biochem. J.* — 2000. — Vol. 351, № 1. — p. 1–12
15. Каравай, А.В. Противоопухолевая активность и механизмы реализации метаболических эффектов композиции производных L-глутамина и L-фенилаланина: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14 / А.В. Каравай. — Гродно, 2001. — 106 с.
16. Meijer A. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways / A. Meijer // *J. Nutrition*. — 2003. — Vol. 6. № 1. — p. 243–257

17. Bruhat A. Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms / A. Bruhat [et al] // *Biofactors*. — 2009. — Vol. 35, №3. — p. 249–57.
18. Ihata Y. Amino acid profile index for early detection of endometrial cancer: verification as a novel diagnostic marker / Ihata Y [et al] // *Int J Clin Oncol*. — 2013. — Vol. 5, №3. — p. 23–44.
19. Nefyodov L. Amino acids in metabolomics: perspective for the use of regulatory effects of free amino acids in the creation on their basis of infusion solutions // *SCIREA Journal of Clinical Medicine*. — 2016. — Т. 1. — №1. — p. 58–62
20. Вретлинд, А. Клиническое питание / А. Вретлинд, А. Суджян // *Стокгольм-Москва: Interword F.B.* — 1990. — 354 с.
21. Руководство по парентеральному и энтеральному питанию / под. общ. ред. И.Е. Хорошилова // *СПб.: Нордмедиздат*. — 2000. — 376 с.
22. Константинов, Б.А. Трансфузиология в хирургии / Б.А. Константинов, А.А. Рагимов, С.А. Дадвани // *М.: АИР АРТ*, 2000. — 525 с.
23. Практическая трансфузиология. Под ред. Г. И. Козинца. М.: Практическая медицина, 2005. — 544 с.
24. USP 28. The United States Pharmacopeia. NF 23 The National Formulary. — Rockville: United States Pharmacopeial convention, Inc. — 2005. — 3187 p.
25. European Pharmacopoeia / 5th edition. — Strasbourg: Council of Europe. — 2004. — 2779 p.
26. Modern problems and solutions in environmental protection: Post-conference monograph of Current Environmental Issues 2019: Monografia / L. I. Nefyodov [et al.]. — Bialystok: Wydawnictwo Uniwersytetu w Białymstoku, 2019. — 156 с.
27. Nefyodov, L. Tumor, the formation of amino acid imbalances and metabolic processes in the background of malignant growth: The levels and nature of the interaction / L. Nefyodov, P. Karavay // *Journal of Oncology and Medicine*. — 2019. — Т. 3. — №3. — p. 260-262. ISSN: 2638-5945oajom.ms.id.000161. doi: 10.32474 / oajom.2019.03.000161
28. Nefyodov L. Metabolic Mechanisms of Specific Antitumor Activity of the Novel Medicinal Preparation Deglutame / *Weber Medicinal Plant Research* — Vol. 1 (1) 2015, Article ID wmpr\_123 138–140, 2015.
29. Nefyodov L. The Amino Acid Pool in Oncology: Plastic Substrates, Specific Regulators of Metabolism and Markers. / *J Pat Care* 2017 — 3: p.126
30. Nefyodov L. I. Amino Acids in the Diagnosis and Treatment of Liver Damage (Review) // *Archives of Hematology and Blood Diseases*. — 2019. — Vol. 2. — №2. — p. 27–34.
31. Nefyodov L.I. Amino Acid Imbalance in Atherosclerosis. Mini Review. // *International Journal of Nutrition* ISSN: 2379-7835 23, 2020 Accepted: 2020 Feb 13 doi: 10.14302

---

## **REGULATORY EFFECTS OF AMINO ACIDS AND DEVELOPMENT ON THEIR BASIS OF MEDICINAL-PREVENTIVE PREPARATIONS**

---

*Nefyodov L.I.*

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

**Summary.** Mini-review of modern literature and own data on the regulatory action of free amino acids and the development of prophylactic drugs on their basis

## ОЦЕНКА ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСТРАКТОВ САЛИЦИНА НА ВОДНОЙ ОСНОВЕ

*Нехорошев С.В.<sup>1</sup>, Нехорошева А.В.<sup>1</sup>, Сабутова А.Б.<sup>1</sup>, Ботиров Э.Х.<sup>2</sup>,  
Дренин А.А.<sup>2</sup>, Слепченко Г.Б.<sup>3</sup>, Горников Н.В.<sup>2</sup>*

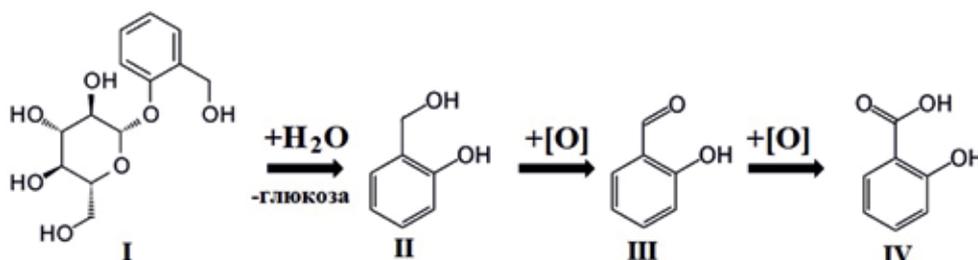
<sup>1</sup>Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа — Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», г. Ханты-Мансийск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа — Югры «Сургутский государственный университет», г. Сургут, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск, Российская Федерация

**Резюме.** Работа посвящена оценке гидролитической стабильности экстрактов салицина на водной основе. В результате было обнаружено, что скорость гидролиза салицина в водных растворах в большей степени зависит от кислотности среды, чем от температуры, а также установлена зависимость константы гидролиза салицина от температуры и кислотности раствора. Максимальная реакционная способность салицина наблюдается в водных растворах при температуре 90 °С и рН менее 1. Препараты салицина могут храниться более года при комнатной температуре и рН более 2.

**Введение.** Салицин — природное биологически активное вещество, являющееся натуральным «предшественником» синтетического лекарственного средства аспирин (ацетилсалициловая кислота). В настоящее время салицин считается веществом, определяющим биологическую активность препаратов, получаемых из различных вегетативных частей растений семейства ивовые [1]. Несмотря на то, что официально в Российской Федерации салицин и содержащее его растительное сырье не применяются в качестве лекарственных средств, в последнее время они находят все большее применение в составе биологически активных добавок [2–4]. При ферментативном и кислотном гидролизе салицина образуются салициловая кислота и глюкоза [5]. В ходе реакции ферментативного гидролизасалицина сначала образуется салициловый спирт (рис. 1), который в результате окисления последовательно превращается в салициловый альдегид и салициловую кислоту.



**Рисунок 1** — Схема гидролитического превращения салицина в салициловую кислоту

Несмотря на то, что для извлечения салицина из растительного сырья чаще всего применяется вода или ее смеси с этанолом [1] и этот гликозид в растворе может взаимодействовать с водой,

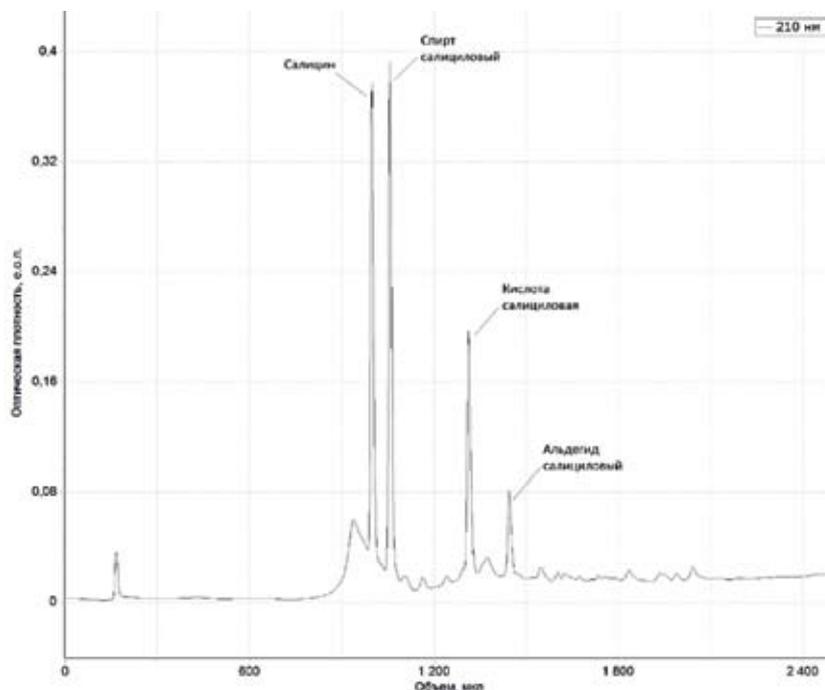
до настоящего времени не проводилось более подробных исследований процесса гидролиза салицина в водных растворах. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния температуры и концентрации ионов водорода на скорость реакции гидролиза салицина в разбавленных водных растворах и оценка его гидролитической стабильности в препаратах на водной основе.

**Материалы и методы исследования.** В экспериментах использовали следующие реактивы: салицин (С.А.С. 138–52–3) с содержанием основного вещества не менее 99 % (BiochemChemopharma); салициловый спирт (С.А.С. 90–01–7) с содержанием основного вещества не менее 99 % (Sigma-Aldrich); салициловый альдегид (С.А.С. 90–02–8) с содержанием основного вещества не менее 99 % (AlfaAesar); натрий салициловокислый, х.ч.; кислот.ч. хлористоводородная, бромистоводородная, серная; ацетонитрил (forUHPLC); концентрированный элюент (ИХ ЭКОНОВА), раствор №2 (4,0М LiClO<sub>4</sub> — 0,1МНСlO<sub>4</sub>), предназначенный для разбавления водой в 20 раз. Для изучения кинетики реакции гидролиза салицина в полипропиленовую пробирку емкостью 10 мл залили 5 мл водного раствора салицина с концентрацией 1 мМоль/мл и 5 мл 1н соляной кислоты. Гидролиз проводили на водяной бане при температуре 90 °С. Пробы реакционной массы для анализа отбирали периодически, через 30, 60, 120, 180, 240, 300 и 360 минут от начала реакции. Перед анализом каждую пробу нейтрализовали 1 н гидроксидом натрия и фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Аналогичные эксперименты проводили при температуре гидролиза 80 °С, 70 °С, 50 °С и 30 °С. Для определения рН растворов салицина и реакционной массы использовали рН-метр МРС-227 (MettlerToledo). Определение качественного и количественного состава реакционной массы выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием (ВЭЖХ-УФ) на жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ИХ ЭКОНОВА) при следующих условиях: колонка 75 × 2 мм заполнена адсорбентом «ProntoSIL-120–5-C18 AQ БД-2003», температура колонки 40 °С, детектирование осуществлялось на длине волн 210 нм, элюент А состава [4М LiClO<sub>4</sub> — 0,1МНСlO<sub>4</sub>]: Н<sub>2</sub>O = 1:19, элюент Б — ацетонитрил, режим элюирования градиентный с монотонным изменением содержания элюента Б от 5 до 100 %, управление хроматографом осуществляли с помощью программного обеспечения «Альфахром» (v. 1.0). Хроматограммы анализируемых проб обрабатывали с помощью программного обеспечения «Альфаспектр» (v. 1.0) и компьютерной базы данных «БД-2003», которые позволяют в автоматическом режиме идентифицировать на хроматограмме пик салицина, а также определять его концентрацию без использования стандартных образцов.

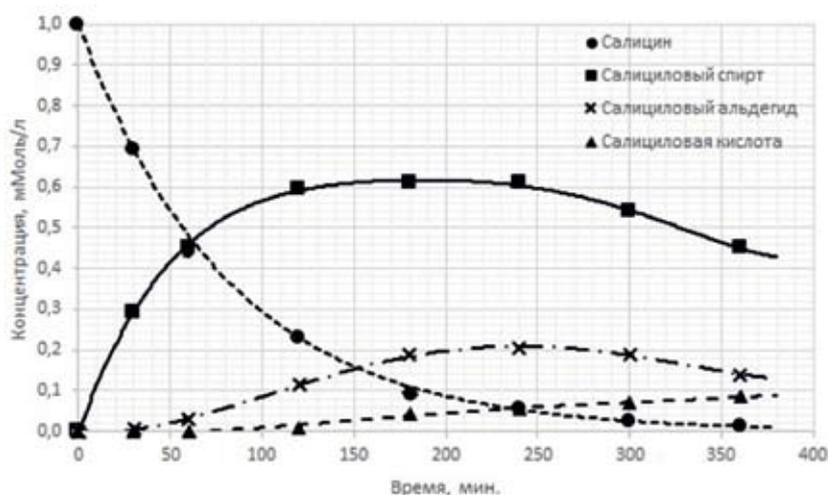
**Результаты исследования и их обсуждение.** Как и ожидалось, в процессе гидролиза салицина в кислой среде в реакционной массе сначала появился салициловый спирт, после чего стали появляться салициловый альдегид и салициловая кислота. На рис. 2. приведена типичная хроматограмма раствора салицина в 0,5 М соляной кислоте после его выдержки в течение 120 мин при температуре 90 °С. При этом на хроматограмме в качестве основных наблюдаются интенсивные хроматографические пики салицина, салицилового спирта, салицилового альдегида и салициловой кислоты. Измерения рН реакционной массы показали, что в процессе реакции концентрация ионов водорода практически не меняется и имеет значение рН = 0,3.

Изменения в количественном составе реакционной массы показаны на рис. 3 в графическом виде. При этом на фоне постоянного снижения концентрации салицина в первые 60 мин гидролиза резко повышается концентрация салицилового спирта, после чего рост его концентрации постепенно замедляется и в период от 120 до 240 мин концентрация салицилового спирта остается примерно на одном уровне, затем начинает плавно понижаться. Через 30 мин после начала реакции в реакционной массе в заметных концентрациях появляется салициловый альдегид, концентрация которого плавно нарастает и через 240 мин достигает своего максимума, после чего также плавно снижается. Салициловая кислота в заметных концентрациях появляется в реакционной массе через

120 мин после начала гидролиза и в остальное время ее концентрация монотонно повышается. Указанные изменения в составе реакционной массы подтверждают правильность приведенной схемы гидролиза салицина (см. рис. 1). В связи с тем, что из всех указанных компонентов реакционной массы только салицин участвует в первом элементарном акте реакции (после которого появляется возможность образования салицилового альдегида и салициловой кислоты), было решено изучить влияние температуры на кинетику реакции гидролиза салицина.



**Рисунок 2** — Хроматограмма 1,0 мМоль/л раствора салицина в 0,5 М водном растворе соляной кислоты через 120 мин после начала гидролиза при температуре 90 °С



**Рисунок 3** — Зависимость состава раствора 1,0 мМоль/л салицина в 0,5 М водном растворе соляной кислоты от времени протекания реакции кислотного гидролиза при температуре 90 °С

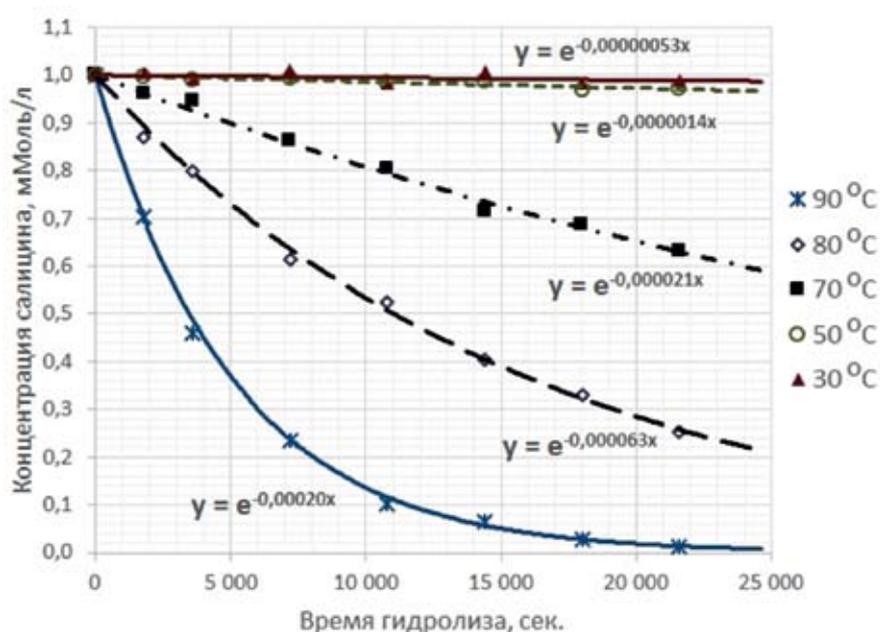
По результатам эксперимента для различных температур в диапазоне от 30 до 90 °С были построены графические зависимости концентрации салицина в 0,5 М соляной кислоте от времени протекания реакции гидролиза, а также выведены уравнения, наиболее близко опи-

сывающие характер полученных зависимостей (рис. 4). Было установлено, что построенные экспериментальные кривые имеют экспоненциальную зависимость, а описывающие их уравнения отличаются между собой только коэффициентом при переменной  $x$ , соответствующей времени протекания реакции. Учитывая, что концентрация молекул воды в реакционной массе намного больше концентрации молекул салицина, а концентрация ионов водорода в ходе реакции не изменяется и составляет 0,5 моль/л (рН = 0,3), можно отнести протекающую реакцию гидролиза салицина к реакциям 1-го порядка и оперировать множителем перед переменной  $x$ , как константой скорости реакции при конкретном значении водородного показателя раствора ( $k_{0,3}$ ). По установленным значениям константы скорости реакции гидролиза салицина в 0,5 М водном растворе соляной кислоты был построен график (рис. 5) ее зависимости от температуры (Т) и установлено уравнение, описывающее характер этой зависимости с высоким коэффициентом корреляции (0,974)

$$k_{0,3} = 9,32 \cdot 10^{-21} \cdot e^{0,103T}$$

С помощью данного уравнения можно рассчитать  $k_{0,3}$  для любых значений температуры раствора салицина в диапазоне температур от 0 до 100 °С.

Учитывая влияние концентрации ионов водорода, стало возможным рассчитать и истинную константу скорости реакции гидролиза ( $K_{\text{гидр}}$ ).



**Рисунок 4 — Зависимость концентрации салицина в 0,5 М водном растворе соляной кислоты от температуры и времени протекания реакции гидролиза**

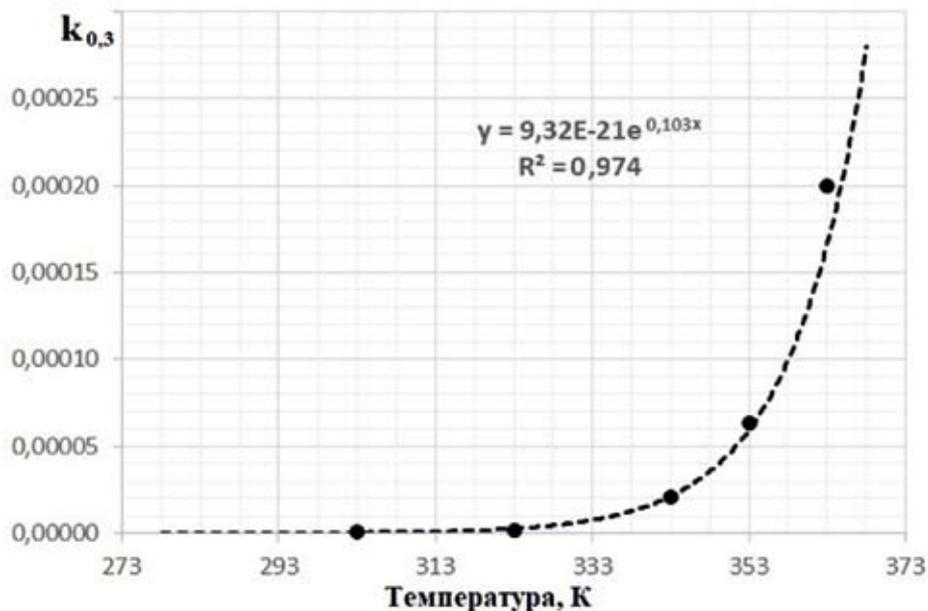
В табл. 1 приведены результаты расчетов  $K_{\text{гидр}}$  для некоторых значений кислотности и температуры водных растворов салицина.

**Таблица 1 — Расчетные значения константы скорости реакции гидролиза салицина для различных сочетаний кислотности и температуры его водных растворов**

$C_{H^+}$ , моль/л	рН	Т, К				
		363	333	313	293	278
$5 \times 10^{-1}$	0,3	$1,6 \times 10^{-4}$	$7,3 \times 10^{-6}$	$9,3 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-8}$

$C_{H^+}$ , моль/л	pH	Т, К				
		363	333	313	293	278
		$K_{гидр}$				
$1 \times 10^{-1}$	1,0	$3,2 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{-8}$	$5,1 \times 10^{-9}$
$1 \times 10^{-2}$	2,0	$3,2 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-9}$	$5,1 \times 10^{-10}$
$1 \times 10^{-3}$	3,0	$3,2 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^{-10}$	$5,1 \times 10^{-11}$
$1 \times 10^{-4}$	4,0	$3,2 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-9}$	$1,9 \times 10^{-10}$	$2,4 \times 10^{-11}$	$5,1 \times 10^{-12}$
$1 \times 10^{-5}$	5,0	$3,2 \times 10^{-9}$	$1,5 \times 10^{-10}$	$1,9 \times 10^{-11}$	$2,4 \times 10^{-12}$	$5,1 \times 10^{-13}$
$1 \times 10^{-6}$	6,0	$3,2 \times 10^{-10}$	$1,5 \times 10^{-11}$	$1,9 \times 10^{-12}$	$2,4 \times 10^{-13}$	$5,1 \times 10^{-14}$
$1 \times 10^{-7}$	7,0	$3,2 \times 10^{-11}$	$1,5 \times 10^{-12}$	$1,9 \times 10^{-13}$	$2,4 \times 10^{-14}$	$5,1 \times 10^{-15}$
$1 \times 10^{-8}$	8,0	$3,2 \times 10^{-12}$	$1,5 \times 10^{-13}$	$1,9 \times 10^{-14}$	$2,4 \times 10^{-15}$	$5,1 \times 10^{-16}$
$1 \times 10^{-9}$	9,0	$3,2 \times 10^{-13}$	$1,5 \times 10^{-14}$	$1,9 \times 10^{-15}$	$2,4 \times 10^{-16}$	$5,1 \times 10^{-17}$
$1 \times 10^{-10}$	10,0	$3,2 \times 10^{-14}$	$1,5 \times 10^{-15}$	$1,9 \times 10^{-16}$	$2,4 \times 10^{-17}$	$5,1 \times 10^{-18}$

Полученные данные показывают, что скорость гидролиза салицина в водных растворах в большей степени зависит от кислотности среды, чем от температуры, а также подтверждает устойчивость салицина и других гликозидов к щелочному гидролизу во всем диапазоне температур, указанном выше.



**Рисунок 5 — Зависимость константы гидролиза салицина в 0,5 М водном растворе соляной кислоты от температуры**

Для оценки влияния реакции гидролиза на стабильность салицина в водных растворах были рассчитаны периоды его полупревращения ( $t_{\frac{1}{2}}$ ) при помощи уравнения  $t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_{гидр}}$ . Результаты расчетов приведены в таблице 2. Как видно из приведенных данных, высокая скорость гидролиза салицина наблюдается в водных растворах при очень жестких условиях — температура 90 °С и pH = 1 и менее. Поэтому при количественном химическом анализе, в ходе пробоподготовки препаратов на водной основе, содержащих салицин, следует осуществлять их нагрев не выше 60 °С и поддерживать значение водородного показателя среды более pH = 2. Продолжительно храниться (более года) препараты салицина на водной основе могут как при комнатной температуре, так и в холодильнике при pH = 2 и более.

**Таблица 2 — Расчетные периоды гидролиза салицина на 50 % в водных растворах для различных сочетаний кислотности и температуры**

pH	T, °C				
	90	60	40	20	5
T <sub>1/2</sub>					
0,3	1,2 час	26 час	8,6 сут.	67 мес.	10,5 мес.
1	6 час	5,5 сут.	43 сут.	11 мес.	4,3 года
2	2,5 сут.	55 сут.	14 мес.	9,2 года	43 года
3	25 сут.	18 мес.	12 лет	92 года	> 100 лет
4	8,3 мес.	15 лет	> 100 лет	> 100 лет	> 100 лет
5	6,8 лет	> 100 лет	> 100 лет	> 100 лет	> 100 лет

**Заключение.** Изучена кинетика кислотного гидролиза салицина в водных растворах. Установлена зависимость константы гидролиза салицина от температуры и кислотности раствора. Выполнена оценка гидролитической стабильности препаратов салицина на водной основе.

### Список литературы

1. Сафин, Р.Г. Экстрагирование биологически активных веществ из коры осины / Р.Г. Сафин, Д.Ф. Зиатдинова, Г.Р. Арсланова // Лесной вестник. — 2017. — Т. 21, № 2. — С. 65–69.
2. Компанцева, Е.В. Возможность использования ивы вавилонской в фармации / Е.В. Компанцева, О.О. Фролова, Т.М. Дементьева // Фармация и фармакология. — 2013. — № 1 (1). — С. 4–7.
3. Лобанова, И.Ю. Выделение и изучение состава флавоноидов листьев осины обыкновенной / И.Ю. Лобанова, В.Ф. Турецкова // Химия растительного сырья. — 2011. — № 2. — С. 117–122.
4. Масленникова, К.А. Фенолгликозиды растений семейства Salicaceae / К.А. Масленникова, О.М. Конюхова, А.В. Канарский // Вестник Казанского технологического университета. — 2014. — Т. 17, № 14. — С. 383–386.
5. Hudson, C.S. The hydrolysis of salicin by the enzyme emulsin / C.S. Hudson, H.S. Paine // J. Am. Chem. Soc. — 1909. — 31 (11). — P. 1242–1249.

## ASSESSMENT OF THE HYDROLYTIC STABILITY OF WATER-BASED SALICIN EXTRACTS

*Nekhoroshev S.V.<sup>1</sup>, Nekhorosheva A.V.<sup>1</sup>, Sabutova A.B.<sup>1</sup>, Botirov E.Kh.<sup>2</sup>, Drenin A.A.<sup>2</sup>, Slepchenko G.B.<sup>3</sup>, Gornikov N.V.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk, Russia;*

<sup>2</sup>*Surgut State University, Surgut, Russia;*

<sup>3</sup>*Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia*

**Summary.** *The work is devoted to assessing the hydrolytic stability of water-based salicin extracts. As a result, it was found that the hydrolysis rate of salicin in aqueous solutions was more dependent on the acidity of the medium than on the temperature, and the dependence of the salicin hydrolysis constant on the temperature and acidity of the solution was also established. The maximum reactivity of salicin was observed in aqueous solutions at a temperature of 90 °C and a pH of less than 1. The salicin preparations can be stored for more than 1 year at a room temperature and a pH of more than 2.*

## СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАЗОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ ПРИ СОСУДИСТОМ СПАЗМЕ ПОСЛЕ АНЕВРИЗМАТИЧЕСКОГО СУБАРАХНОИДАЛЬНОГО КРОВОИЗЛИЯНИЯ

*Нечипуренко Н.И., Пашиковская И.Д., Прокопенко Т.А., Юдицкая В.М.*

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** При сосудистом спазме, развившемся у пациентов на 9-е сутки после разрыва церебральных аневризм и субарахноидального кровоизлияния, выявлены повышение концентрации вторичных продуктов перекисного окисления липидов, уменьшение содержания стабильных продуктов обмена монооксида азота при активации VEGF-A-опосредованного ангиогенеза в крови, что указывает на сложную патобиохимию вазоспазма, уточнение отдельных звеньев патогенетической структуры которого может способствовать коррекции данного осложнения.

**Введение.** Церебральный вазоспазм является наиболее тяжелым и частым осложнением аневризматического субарахноидального кровоизлияния (аСАК). Он формируется с 3–4-х суток от начала заболевания, связанного с разрывом артериальных аневризм (АА), с максимумом проявления к 7–14-м суткам.

При вазоспазме вследствие разрыва аневризмы развиваются нарушения, вызванные гипоксией тканей головного мозга и выявляются признаки нарушения процессов клеточного энергообмена с развитием митохондриальной дисфункции. Механизм развития сосудистого спазма (СС) сложен и недостаточно изучен. Он включает в себя многочисленные биохимические нарушения, связанные с внутриклеточным повышением  $Ca^{2+}$  в гладкомышечных клетках сосудистой стенки и нейронах, обусловленное внутричерепной гипертензией, выбросом биологически активных веществ, таких как эндотелин-1, монооксид азота (NO), ангиотензин-2, тромбин, одновременной активацией реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) и воспаления [2, 7]. Окислительный стресс индуцирует механизмы, способствующие развитию воспалительного процесса в местах повреждения сосудистой стенки. Активные соединения, образующиеся при ПОЛ, вырабатываемые активированными клетками глии, обладают повреждающим действием и способны оказывать нейротоксическое воздействие на сосудистую стенку и нервную ткань, замыкая порочный круг повреждения головного мозга [9].

Среди множества медиаторов, вырабатываемых эндотелиальным слоем сосудов, основное значение имеет оксид азота (NO), который обеспечивает вазодилататорный эффект [3]. Кроме того, NO является медиатором, ингибирующим агрегацию тромбоцитов и адгезию их к сосудистой стенке. Негативными последствиями дефицита синтеза NO в эндотелии являются вазоконстрикция, агрегация и адгезия тромбоцитов, пролиферация гладкомышечных клеток, что может способствовать развитию церебрального вазоспазма после разрыва АА [8].

Ключевым регулятором ангиогенеза для эндотелиоцитов и высоко специфическим митогеном является VEGF (vascular endothelial growth factor — фактор роста эндотелия сосудов). Он

блокирует апоптоз эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, индуцирует протеиназы, усиливает проницаемость сосудов. Экспрессия VEGF усиливается под влиянием множества проангиогенных факторов, включая гипоксию. Ингибирование активности VEGF запускает апоптоз эндотелиоцитов, что снижает образование новых сосудистых коллатералей, усугубляя церебральную ишемию [1].

**Цель** — исследовать содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов, ферментов антиоксидантной системы, а также стабильных метаболитов обмена монооксида азота (NOx) и индуктора ангиогенеза — VEGF-A в крови при развитии вазоспазма у пациентов с аСАК.

**Материалы и методы исследования.** Обследованы 39 пациентов в остром периоде аСАК (от 4-х до 21 суток после разрыва АА) до операции, находившиеся на лечении в нейрохирургических отделениях РНПЦ неврологии и нейрохирургии. По критериям наличия или отсутствия вазоспазма обследуемые были разделены на 2 группы.

В основную группу вошли 24 пациента в возрасте  $45,8 \pm 9,7$  лет с церебральным вазоспазмом, госпитализированных на 9-е (7-12) сутки после разрыва АА. По данным КТ-ангиографии максимальный размер аневризмы у этих пациентов составил  $6,0 \pm 1,9$  мм. У 10 пациентов (42%) на фоне ангиоспазма вследствие разрыва аневризмы развился инфаркт мозга.

Группу сравнения составили 15 пациентов в возрасте  $51,2 \pm 12,4$  лет без вазоспазма, госпитализированных на 9-е (6-13) сутки после разрыва АА. Максимальный размер аневризмы у этих пациентов составил  $6,5 \pm 2,6$  мм.

Оценку выраженности вазоспазма проводили с помощью ультразвукового дуплексного сканирования (УЗДС) на аппарате HD 11 XE (Philips). В 1-й день госпитализации в стационар у пациентов определяли пиковые систолические скорости кровотока — Vps (см/с) по средней мозговой артерии (СМА) и внутренней сонной артерии (ВСА). Для оценки степени выраженности церебрального ангиоспазма в СМА вычисляли индекс Линдегарда (ИЛ):

$$\text{ИЛ} = \frac{\text{Vps в СМА}}{\text{Vps в экстракраниальном отделе ВСА}}$$

Биохимические исследования включали определение показателей про-, антиоксидантной системы крови: концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-П), и активности ферментов антиоксидантной системы — супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в крови спектрофотометрическими методами. Концентрацию стабильных продуктов обмена монооксида азота (NOx) в плазме определяли с использованием реактива Грисса; содержание фактора роста эндотелия сосудов-А (ФРЭС-А) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA тест-наборами «Fine Test» производства «Wuhan Fine Biotech Co., Ltd» (Китай).

Нормальные значения изучаемых показателей получены у 22 практически здоровых лиц в возрасте  $44,5 \pm 12,3$  лет.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10.0. Данные представлены в виде медианы (Me) и интервала между 25 и 75 перцентилями (25% - 75%). Сравнительный анализ количественных признаков в двух группах выполняли с использованием критерия Манна-Уитни (U-критерий). ROC-анализ проводили с определением пороговых значений показателей диагностических тестов с использованием программы «Attestat» версия 13.1. Статистически значимыми считали результаты при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** По возрасту, размеру аневризмы и количеству дней, прошедших после разрыва АА, пациенты обеих групп не отличались между собой

( $p > 0,05$ ). По шкале Ханта-Хесса, оценивающей степень тяжести состояния пациентов после аСАК, на момент госпитализации в основной группе у большинства (62,5%) пациентов была 2-я степень тяжести; в группе сравнения больше, чем у половины (53,7%) пациентов была также 2-я степень тяжести состояния.

По данным УЗДС на 9-е (7-12) сутки после разрыва АА у пациентов основной группы установлено повышение систолической скорости кровотока по СМА, а также значений ИЛ как на стороне разрыва АА, так и на контрлатеральной стороне, что указывает на диффузный характер распространения СС. Выявлено достоверное повышение  $V_{ps}$  по СМА и ИЛ у пациентов основной группы по сравнению с группой сравнения (таблица 1).

**Таблица 1 — Систолическая скорость кровотока по СМА и значение ИЛ на стороне разрыва АА и на контрлатеральной стороне у пациентов обеих групп, Ме (квартили)**

Показатель	Основная группа, n=24	Группа сравнения, n=13	Статистическая значимость различий
$V_{ps}$ по СМА на стороне разрыва АА, см/с	162 (142-202)	100 (90-111)	$U=14, p=0,0000007$
$V_{ps}$ по СМА на контрлатеральной стороне, см/с	165 (140-246)	95,5 (78,5-113)	$U=29, p=0,0002$
ИЛ на стороне разрыва АА	2,1 (1,5-2,8)	1,3 (1,0-1,8)	$U=52, p=0,003$
ИЛ на контрлатеральной стороне	2,2 (1,4-2,9)	1,2 (1,1-1,7)	$U=55, p=0,011$

Примечание —  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $p$  — сравнение между двумя группами

При оценке биохимических показателей про-, антиоксидантного состояния крови и функционального состояния эндотелия у пациентов с СС после разрыва АА в момент поступления в стационар установлено возрастание концентрации ТБК-П ( $U=81, p1=0,00006$ ) и тенденция к увеличению активности каталазы ( $U=223, p1=0,068$ ) в крови относительно здоровых лиц (таблица 2).

**Таблица 2 — Биохимические показатели в крови у пациентов обеих групп и здоровых лиц, Ме (квартили)**

Показатель	Здоровые лица	Основная группа, n=24	Группа сравнения, n=15	Статистическая значимость различий
ТБК-П, мкмоль/л	1,7 (1,5-2,1) n=22	2,8 (2,4-3,7) $U=81, p1=0,00006$	2,0 (1,5-2,3)	$U=68, p=0,002$
СОД, Е/мл	105,3 (88,1-123) n=22	91,5 (62,5-129,3)	98,2 (63,0-137,5)	НЗ
Каталаза, усл. ед./с*мл	14,4 (10,4 -27,0) n=22	23,4 (13,8-48,9) $U=223, p1=0,068$	20,4 (12,6-27,6)	НЗ
НОх, мкмоль/л	25,0 (19,5-26,0) n=22	16,4 (13,5-24,0) $U=137, p1=0,009$	20,0 (18,1-27,0)	$U=91, p=0,05$
VEGF-A, пг/мл	53,7 (37,3-66,3) n=14	97(63,3-213,0) n=17 $U=50, p1=0,007$	243,1 (114-923,4) n=13 $U=23, p1=0,003$	$U=68, p=0,075$

Примечание —  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $p1$  — попарное сравнение с данными здоровых лиц;  $p$  — сравнение между основной группой и группой сравнения

Выявлено снижение концентрации стабильных продуктов обмена монооксида азота до 16,4 (13,5-24,0) мкмоль/л против 25 (19,5-26) у здоровых лиц ( $p=0,009$ ), что, указывает на недостаточность участия эндотелиального NO в регуляции нормального сосудистого тонуса во время развития СС. Показано повышение содержания VEGF-A в сыворотке в 1,8 раза у пациентов ( $U=50$ ,  $p=0,007$ ) относительно данных здоровых лиц, что, вероятно, свидетельствует об активации сигнального механизма образования новых кровеносных сосудов инициируемого VEGF-A с тем, чтобы оптимизировать кровоток в области возможной ишемизации нервной ткани головного мозга.

При исследовании биохимических показателей у пациентов группы сравнения установлено отсутствие нарушений про-, антиоксидантного баланса крови и снижения концентрации продуктов обмена монооксида азота в крови (таблица 2). В это же время выявлено достоверное повышение концентрации VEGF-A в сыворотке крови данных пациентов в 2,8 раза ( $U=23$ ,  $p=0,003$ ) относительно данных здоровых лиц. Известно, что VEGF активирует экспрессию оксида азота, простаглицина и других цитокинов, способствующих вазодилатации [4].

Проведен сравнительный анализ биохимических показателей у пациентов обеих групп на момент госпитализации (таблица 2).

У пациентов с вазоспазмом установлена выраженная активация процессов ПОЛ с повышением концентрации ТБК-П до 2,8 (2,4-3,7) мкмоль/л относительно группы пациентов без вазоспазма, где уровень данного метаболита составил 2,0 (1,5-2,3) мкмоль/л ( $p=0,002$ ). При этом не отмечено изменений активности ферментов антиоксидантной защиты в обеих группах. Анализ полученных результатов указывает, что вторичные продукты ПОЛ действуют как вазоконстрикторы и способствуют развитию продолженного СС и последующей ишемии головного мозга. Также обнаружена существенная разница в содержании нитратов и нитритов у пациентов с вазоспазмом и без такового. Так, на 9-е сутки после разрыва АА выявлена низкая концентрация NOx у пациентов с вазоспазмом, что, вероятно, в данные сроки наблюдения можно объяснить недостаточной экспрессией оксида азота, приводящей к вазоконстрикции сосудов головного мозга, преимущественно среднего и мелкого калибра. В группе сравнения показана тенденция к повышению концентрации VEGF-A ( $p=0,075$ ) относительно пациентов основной группы, что свидетельствует о более эффективной активации индуктора ангиогенеза и, соответственно, адекватной выработке эндотелиального NO в кровеносных сосудах, достаточной для предотвращения развития СС у пациентов группы сравнения.

В литературе имеются сведения об исследованиях, которые согласуются с вовлечением NO в развитие отсроченного церебрального вазоспазма после САК. Так, известно, что аСАК нарушает регуляцию мозгового кровотока. Оксигемоглобин, высвобождаясь из сгустков крови, окружающих проводящие артерии, поглощает NO и разрушает nNOS-содержащие нейроны. Это приводит к снижению уровня NO, вызывая вазоконстрикцию артерий, которая инициирует СС. Сужение артерий увеличивает напряжение сдвига и стимулирует синтез eNOS, что в нормальных условиях привело бы к увеличению выработки NO и расширению артерий. Однако этого не происходит из-за транзиторной дисфункции eNOS, вызванной повышенным уровнем эндогенного ингибитора NOS — асимметричного диметиларгинина (АДМА). Повышенный уровень АДМА является результатом снижения элиминации вследствие ингибирования АДМА-гидролизующего фермента метаболитами гемоглобина и билирубин-окисленными фрагментами в артериях при спазме. Дисфункция eNOS поддерживает вазоспазм до тех пор, пока уровень АДМА не снизится и не восстановится активность эндотелиальных клеток, генерирующих NO [5].

Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными в работе [6], где показано повышение концентраций фактора Виллебранда, металлопротеиназы-9 и VEGF у пациентов с наличием церебрального вазоспазма после САК. Авторы предполагают, что эти метаболиты могут играть определенную роль в патогенезе церебрального вазоспазма при аСАК.

Для проверки диагностической эффективности исследования концентраций ТБК-П и стабильных продуктов обмена монооксида азота в крови с целью определения предикторов развития церебрального вазоспазма у пациентов с аСАК проведен ROC-анализ. В таблице 3 показано, что определяемые метаболиты, являются достоверными классификаторами качества исследуемой диагностической модели (интервал AUC под ROC-кривой — 0,7-0,8 соответствует хорошему качеству модели).

**Таблица 3 — Характеристика диагностической эффективности исследования ТБК-П и NOx в крови у пациентов с аСАК обеих групп**

Показатель диагностической эффективности	Исследуемый предиктор	
	ТБК-П	NOx
Площадь под ROC-кривой (AUC)	0,80 p=0,0001	0,71 p=0,014
Стандартная ошибка (SE)	0,07	0,08
Чувствительность (Se, %)	85,7	78,6
Специфичность (Sp, %)	75,0	62,5
Пороговое значение признака	$\geq 2,38$ мкмоль/л	<18 мкмоль/л

Следовательно, при концентрациях ТБК-П в крови  $\geq 2,38$  мкмоль/л и NOx <18 мкмоль/л у пациентов на 9-й день после разрыва АА может развиваться церебральный вазоспазм, что позволит вовремя определить пути коррекции данного осложнения при аСАК.

**Заключение.** Таким образом, определено участие вторичных продуктов ПОЛ и некоторых маркеров дисфункции эндотелия сосудов в развитии вазоспазма при САК, обусловленного разрывом церебральных аневризм. Установлено повышение концентрации ТБК-П и увеличение активности каталазы у пациентов с аСАК и вазоспазмом на 9-е сутки после разрыва АА. При исследовании биохимических показателей функционального состояния эндотелия сосудов выявлено уменьшение содержания NOx в крови у пациентов основной группы, что свидетельствует о недостаточно эффективной экспрессии оксида азота, приводящей к вазоконстрикции в сосудистой системе головного мозга. Установлены 2 биохимических предиктора развития вазоспазма (ТБК-П и NOx) у пациентов с аСАК, что может способствовать своевременной коррекции данного осложнения и предотвратить развитие отсроченной церебральной ишемии.

### Список литературы

1. Фатеева, В.В. Маркеры эндотелиальной дисфункции при хронической ишемии мозга / В. В. Фатеева, О.В. Воробьева // Журнал неврологии и психиатрии. — 2017. — №4. — С. 107–111.
2. Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation / N. Chalouhi [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2012. — Vol. 32, №9. — P. 1659–1676.
3. Inflammatory Markers in Mild Cognitive Impairment: A Meta-Analysis. Arosio B., editor / M. Saleem [et al.] // JAD. — 2015. — Vol. 3 (47). — P. 669–679.
4. Ferrara, N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth / N. Ferrara // Eur. Cytokine Netw. — 2009. — Vol. 20, №4. — P. 158–163.
5. Pluta, R.M. Analysis of nitric oxide (NO) in cerebral vasospasm after aneurysmal bleeding / R.M. Pluta, E.H. Oldfield // Rev. Recent Clin. Trials. — 2007. — Vol. 2, №1. — P. 59–67.

6. Serum von Willebrand factor, matrix metalloproteinase-9, and vascular endothelial growth factor levels predict the onset of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage / M. J. McGirt [et al.] // *Neurosurgery*. — 2002. — Vol. 5, №5. — P. 1128-1134.

7. The role of oxidative stress in cerebral aneurysm formation and rupture / R.M. Starke [et al.] // *Curr. Neurovasc. Res.* — 2013. — Vol. 10. — P. 247–255.

8. Suarez, E.C. Depressogenic vulnerability and genderspecific patterns of neuro-immune dysregulation: What the ratio of cortisol to C-reactive protein can tell us about loss of normal regulatory control. *Brain, Behavior and Immunity* / E.C. Suarez, J.S. Sundry, A. Erkanli // Elsevier BV. — 2015. — Vol. 44. — P. 137–147.

9. Xi, G. Mechanisms of brain injury after intracerebral hemorrhage / G. Xi, R.F. Keep, J.T. Hoff // *Lancet Neurol.* — 2006. — Vol. 5. — P. 53–63.

## **THE STATE OF THE PROOXIDANT SYSTEM AND THE CONTENT OF CERTAIN VASOACTIVE SUBSTANCES IN THE BLOOD IN VASOSPASM AFTER ANEURYSMATIC SUBARACHNOIDAL HEMORRHAGE**

---

*Nechipurenko N.I., Pashkouskaya I.D., Prokopenko T.A., Yuditskaya V.M.*

*Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery,  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *An increase in the concentration of secondary products of lipid peroxidation, a decrease in the level of stable metabolic products of nitrogen monoxide upon activation of VEGF-A-mediated angiogenesis in the blood were revealed at patients with vasospasm that developed on the 9th day after the rupture of cerebral aneurysms and subarachnoid hemorrhage. This indicates a complex pathobiochemistry of vasospasm, when clarification of individual links of its pathogenetic structure can contribute to the correction of this complication.*

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭМОКСИПИНА НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АНТИМЕТАБОЛИТОВ РЯДА МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

*Нижегородова Д.Б.<sup>1,2</sup>, Зафранская М.М.<sup>1</sup>, Квасюк Е.И.<sup>1</sup>, Сыса А.Г.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Международный государственный экономический институт имени А.Д. Сахарова  
Белорусского государственного университета,*

*г. Минск, Республика Беларусь;*

<sup>2</sup>*Государственное учреждение образования*

*«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,*

*г. Минск, Республика Беларусь,*

**Резюме.** Исследовано влияние соединения с сильными антиоксидантными свойствами эмоксипина на цитотоксическую активность мононуклеаров периферической крови (МПК) совместно с антиметаболитами цитарабином и циклоцитидином по отношению опухолевой клеточной линии K562. Показано, что цитарабин в 2,1 раза ингибирует нестимулированную цитотоксичность МПК, а его комбинация с эмоксипином на 57,6 % ослабевает данный ингибиторный эффект. Циклоцитидин, как и его комбинация с эмоксипином, не влияет на цитотоксичность в условиях эксперимента.

**Введение.** Низкомолекулярные фрагменты нуклеиновых кислот, такие как пуриновые и пиримидиновые основания, нуклеозиды и нуклеотиды, при наличии в их структуре любых изменений в сравнении со структурой природного соединения, относятся к классу антиметаболитов. Наиболее часто встречающиеся изменения в структуре природных компонентов нуклеиновых кислот связаны с введением, заменой, удалением или созданием новых функциональных групп в гетероциклическом основании, углеводном фрагменте или фосфатном остатке, а также с заменой рибозы и дезоксирибозы на такие сахара, как арабиноза, ксилоза, дидезокси- и другие производные углеводов.

Обилие функциональных групп в составе метаболитов позволяет синтезировать большое число антиметаболитов с разнообразной биологической активностью. К сожалению, пока невозможно достоверно предсказать тип активности синтезированного антиметаболита, но работы в области изучения связи между активностью и структурой являются одним из интенсивно развивающихся направлений химии антиметаболитов. В то же время известно, что большинство антиметаболитов обладает противоопухолевой и антивирусной активностью. В клинической практике десятки лет применяются в качестве лекарственных препаратов такие соединения, как фторурацил, меркаптогуанин, цитозинарабинозид, азатимидин, ацикловир и др. Механизм действия антиметаболитов весьма разнообразен, но связан в основном с влиянием на ферменты, участвующие в синтезе и функционировании нуклеиновых кислот.

К антиметаболитам нового поколения, которые используются в качестве противоопухолевых препаратов, относятся кладрибин, клофарабин, кселода, флударабин фосфат, неларабин, гемцитабин и др. На разных стадиях клинических испытаний находятся сапацитабин, мерици-табин, софосбувир, 8-хлораденозин и 8-аминоаденозин.

Новым направлением в создании противоопухолевых соединений является поиск соединений — ингибиторов специфичного фермента теломеразы, присутствующего в опухолевых

клетках и предотвращающего их апоптоз. Одним из таких ингибиторов теломеразы является 2'-дезоксидезокси-6-тиогуанозин, синтез которого в достаточных для практического применения количествах в настоящее время представляет определенные трудности.

Важным аспектом, ограничивающим использование цитостатических препаратов, является то, что эти препараты обладают нежелательными побочными эффектами вследствие возможного воздействия на генетический аппарат клетки-хозяина. В связи с этим привлекательным является поиск веществ или их комбинаций (с антиоксидантами, в частности), применение которых будет приводить к снижению показателей интоксикации в организме опухоленосителей [1–3].

Так, большинство авторов указывают на способность антиоксидантов улучшать переносимость химиотерапии и отдаленные результаты лечения [4, 5], сторонники иной точки зрения считают, что антиоксиданты ингибируют противоопухолевый эффект химиопрепаратов [6]. Однако все эти исследования касаются применения нутрицевтиков с мягким антиоксидантным действием ( $\beta$ -каротин; витамины А, С, Е; селен; мелатонин, цистеин; витамины группы В; витамин D<sub>3</sub>; витамин К<sub>3</sub>; глутатион, коэнзим Q<sub>10</sub>).

Целью настоящей работы являлась оценка влияния модифицированных нуклеозидов 1-(O<sup>2</sup>,2'-ангидро-Я-D-арабинофуранозил) цитозина (циклоцитидин, циклоЦ 2) 1-(Я-D-арабинофуранозил) цитозина (цитарабин, араЦ 3) в комбинации с 6-метил-2-этилпиридином-3 (эмоксипином) (синтетическим производным 3-гидроксипиридина с сильным антиоксидантным действием) на цитотоксичность лимфоидных клеток в ко-культуре с опухолевой клеточной линией человека K562.

**Материалы и методы исследования.** *Получение циклоЦ 2 и араЦ 3.* Синтез 1-(O<sup>2</sup>,2'-ангидро-Я-D-арабинофуранозил) цитозина (2) (циклоЦ) осуществляли реакцией взаимодействия природного нуклеозида — цитидина 1 с хлорангидридом ацетилсалициловой кислоты в ацетонитриле с последующим действием соляной кислоты для снятия блокирующих групп в промежуточном продукте (рис. 1). Выделенный кристаллический продукт 2 в виде его гидрохлорида очищали перекристаллизацией из воды.

Обработка циклоЦ раствором гидроксида натрия при комнатной температуре с последующей нейтрализацией раствором соляной кислоты приводила к образованию 1-(Я-D-арабинофуранозил) цитозину (3) (араЦ), который выделялся в кристаллическом виде при охлаждении нейтрального раствора (рис. 1).

Продукт дополнительно очищали перекристаллизацией из воды. Соединения 2 и 3 по всем параметрам совпадали с заведомыми образцами.

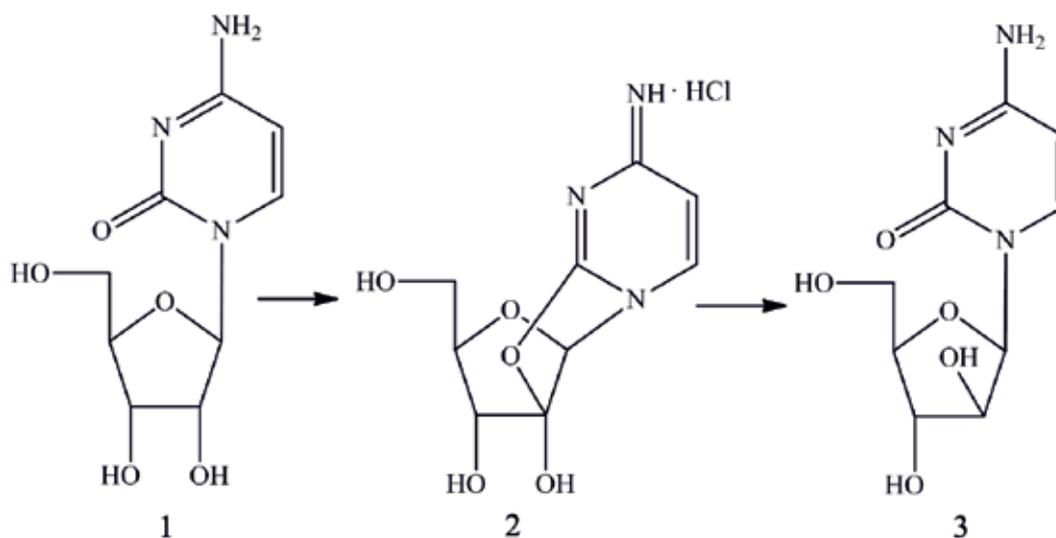


Рисунок 1 — Схема синтеза циклоЦ 2 и араЦ 3

Синтез эмоксипина осуществляли согласно методике, представленной в работе [7].

Материалом для исследования явилась периферическая венозная кровь здоровых доноров ( $n = 4$ ), средний возраст 42,5 ( $39,0 \times 47,5$ ) лет, из которых 2 мужчин и 2 женщины.

#### *Культуральный метод*

Предварительно выделенные на градиенте плотности (Histopaque-1077, «Sigma», Германия) мононуклеары периферической крови (МПК) культивировали в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/лунку в 96-луночном планшете в культуральной среде RPMI-1640 («Gibco», Германия), содержащей 10%-эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «Gibco», Германия), 1 % L-глутамина («Gibco», Германия), 1 % антибиотика-антимикотика («Gibco», Германия) в присутствии  $10^{-6}$ М араЦ 3,  $10^{-6}$ М циклоЦ 2 и/или  $10^{-6}$ М эмоксипина (Е) в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 37 °С и 5 %  $\text{CO}_2$  в течение трех суток. Для стимуляции цитотоксичности в ко-культуры добавляли интерлейкин-2 (IL-2, «Fluka», Германия) в конечной концентрации 100 U/мл.

#### *Метод оценки цитотоксичности*

Для оценки цитотоксичности к трехдневной культуре МПК добавляли клетки-мишени — опухолевую клеточную линию человека K562, окрашенную флуоресцентным красителем карбоксифлуоресцеином (CFSE, «Fluka», Германия), в соотношении 5:1 и культивировали 4 ч.

#### *Метод проточной цитофлуориметрии*

Для оценки процента клеточной гибели клеток-мишеней K562 в результате цитотоксичности МПК в ко-культуры добавляли катионный краситель пропидий иодид (PI, «Invitrogen», Германия), способный проникать внутрь клетки при нарушении целостности цитоплазматической мембраны и связываться с ДНК. Погибшие клетки опухолевой линии детектировали как CFSE<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>K562 с помощью проточного цитофлуориметра *Cytoflex* («BeckmanCoulter», США). Измерения проводили на 50000 событий. Коэффициент стимуляции цитотоксичности рассчитывали как отношение процента клеточной гибели K562 в ко-культуре с МПК стимулированными IL-2 к не стимулированным МПК.

#### *Статистический метод*

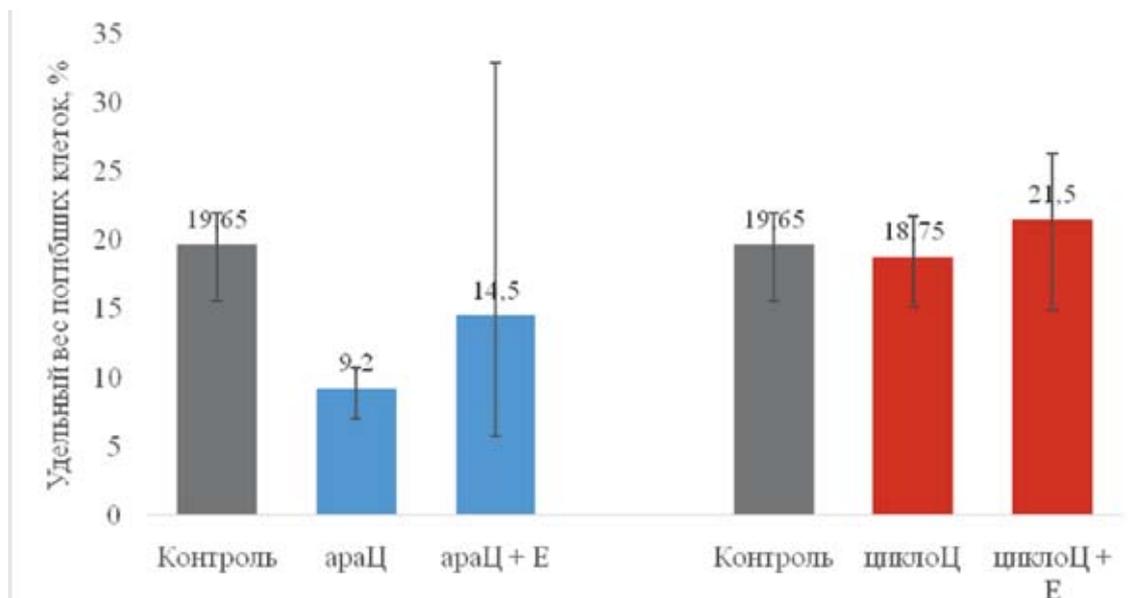
Статистический анализ данных выполняли при использовании пакета *Statistica* 8.0.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Как видно из данных, представленных на рис. 1, исследованные соединения циклоЦ 2 и араЦ 3 являются синтетическими аналогами цитидина. По химическому строению исследованные антимаболиты отличаются от известных нуклеотидов цитидина и дезоксицитидина тем, что углеводный фрагмент их молекулы представлен не рибозой или дезоксирибозой, а арабинозой, т. е. различия обусловлены изменением конфигурации гидроксильной групп при  $\text{C}_2$ -атоме в фуранозной части молекулы. Наличие  $\text{C}_2$ -гидроксила в молекуле арабинозилцитозина в цис-положении по отношению к цитозину обуславливает устойчивость арабинозилцитозина к фосфорилазам. В организме под действием дезоксицитидинкиназ и дезоксицитидилаткиназ происходит превращение арабинозилцитозина в трифосфат (ара-ЦТФ).

Эмоксипин является аналогом витамина  $\text{B}_6$  — производным 3-гидроксипиридина с сильными антиоксидантными свойствами. В медицине эмоксипин используется как лекарственный препарат из группы антиагрегантов и антиоксидантов и является корректором микроциркуляции. Активный компонент препарата — 2-метил-6-этилпиридинол-3 после проникновения в кровяной поток укрепляет сосуды, предотвращает их ломкость, разжижает кровь, тем самым предотвращает развитие разрушительных процессов в просвете сосудов.

Антиоксидантное действие препарата «Эмоксипин» позволяет стимулировать естественные процессы, обеспечивает нейтрализацию свободных радикалов и тем самым не допускает повреждение жизненно важных биологических молекул.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, араЦ в 2,1 раза ингибирует нестимулированную цитотоксичность МПК ( $p < 0,05$ ), а его комбинация с эмоксипином на 57,6 % ослабляет данный ингибиторный эффект. ЦиклоЦ, как и его комбинация с эмоксипином, не влияет на цитотоксичность в условиях эксперимента.



**Рисунок 2 — Оценка влияния циклоЦ 2 и араЦ 3 отдельно и совместно с эмоксипином (E) на нестимулированную цитотоксичность МПК по отношению к клеткам-мишеням K562 (Me [25%;75%])**

Оценка влияния исследуемых соединений и их комбинаций с эмоксипином на IL-2 стимулированную цитотоксичность МПК указывает на ту же тенденцию (табл.).

**Таблица — Индексы стимуляции цитотоксичности МПК (y.e.)**

№	Параметр	Медиана (Me)	25%	75%
1	Контроль + IL-2 / Контроль	2.2	1.8	3.2
2	араЦ + IL-2 / араЦ	4.4	3.9	7.4
3	циклоЦ + IL-2 / циклоЦ	2.1	1.9	2.8
4	E + IL-2 / E	2.1	1.9	2.8
5	араЦ + E + IL-2 / АраЦ + E	3.3	1.7	7.1
6	циклоЦ + E + IL-2 / циклоЦ+ E	1.9	1.6	3.0
	p	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{2-6} < 0,05$		

Как видно из данных, представленных в таблице, IL-2 стимулированная цитотоксичность МПК увеличивается в присутствии араЦ (в 2,0 раза по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ), но не в присутствии циклоЦ. При добавлении эмоксипина в эквимолярных концентрациях индекс стимуляции цитотоксичности МПК в случае комбинации с араЦ также увеличен по сравнению с контролем (в 1,5 раза), но ниже, чем в эксперименте без добавления эмоксипина. Культивирование клеток в присутствии комбинации циклоЦ с эмоксипином не оказывало эффекта на IL-2 стимулированную цитотоксичность МПК.

Обнаруженные нами эффекты могут быть связаны с тем, что антиметаболит араЦ оказывает свои токсические эффекты как на опухолевую культуру, так и на МПК. В норме все клеточные механизмы регуляции настроены таким образом, что увеличение содержания активных форм кислорода приводит к увеличению активности антиоксидантных систем, что возвращает уровень свободных радикалов в норму. При патологических состояниях эти механизмы регуляции нарушаются. Так, образующиеся при воздействии антиметаболитов свободные радикалы и инактивация ферментов антиоксидантной защиты усиливают интоксикацию, вызывают токсическое повреждение клеток всех типов.

Используемое нами соединение араЦ ингибировало нестимулированную цитотоксичность МПК по отношению к опухолевой клеточной линии именно в связи с неспецифичностью своих мишеней: МПК наряду с опухолевыми клетками подвергались токсическому влиянию антиметаболита, что приводило к их гибели и снижению противоопухолевой эффективности. Отметим, что присутствие в смеси эмоксипина (вещества, обладающего антиоксидантными свойствами) практически полностью нивелировало обнаруженный эффект.

**Заключение.** Нами показано, что вещества, регулирующие протекание окислительно-восстановительных реакций, способны снижать токсические эффекты антиметаболитов по отношению к нормальным клеткам.

Полученные результаты не только усиливают позиции сторонников совместного применения антиметаболитов с антиоксидантами в химиотерапии опухолевых заболеваний, но и способствуют лучшему пониманию молекулярных механизмов влияния антиметаболитов нуклеиновой природы на биохимические процессы, что может служить основой для целенаправленного поиска и создания новых противоопухолевых препаратов.

### Список литературы

1. Nucleobase and Nucleoside Analogues: Resistance and Re-Sensitisation at the Level of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Metabolism / N. Tsesmetzis [et al.] // *Cancers*. — 2018. — Vol. 10. — P. 240–248.
2. Flow-cytometric analysis of reactive oxygen species in cancer cells under treatment with brassinosteroids / P. Kisselev [et al.] // *Steroids*. — 2017. — Vol. 117. — P. 11–15.
3. Influence of arabinofuranosylcytosine-5'-monophosphate and its emoxipin salt on viability and functional status of peripheral blood lymphocytes subpopulations / A. Sysa [et al.] // *Progress in Chemical and Biochemical Research*. — 2019. — Vol. 2(4). — P. 178–184.
4. Impact of Antioxidant Supplementation on Chemotherapeutic Efficacy: A Systematic Review of the Evidence From Randomized Controlled Trials / K.I. Block [et al.] // *Int. J. Cancer*. — 2008. — Vol. 15. — P. 1227–1239.
5. Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death / H. Pan [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2008. — Vol. 12. — P. 24–28.
6. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? / B.D. Lawenda [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2008. — Vol. 100 (11). — P. 773–783.
7. Квасюк, Е.И. Синтез эфиров эмоксипина / Е.И. Квасюк, М.В. Лисовская // *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. — 2018. — № 4. — С. 119–127.

# THE EFFECT OF EMOXYPINE ON THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF MODIFIED NUCLEOSIDES ESTIMATION

---

*Nizheharodava D.B.<sup>1,2</sup>, Zafranskaya M.M.<sup>1</sup>, Kvasyuk E.I.<sup>1</sup>, Sysa A.G.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>ISEI BSU,*

*Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>State Educational Establishment*

*«Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education»,*

*Minsk, Republic of Belarus*

***Summary.*** *The effect of the strong antioxidant emoxypine on the cytotoxic activity of peripheral blood mononuclears (MPC) together with the antimetabolites cytarabin and cyclocytidine on the tumor cell line K562 was studied. It was shown that cytarabine 2.1 times inhibited the unstimulated cytotoxicity of MPC, and its combination with emoxypine reduced this inhibitory effect by 57.6 %. Cyclocytidine, as well as its combination with emoxypine, did not affect cytotoxicity under the experimental conditions.*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ПРЕПОДАВАНИЯ КУРСА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ В ГОМЕЛЬСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ МЕДИЦИНСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

---

*Никитина И.А.<sup>1</sup>, Логвинович О.С.<sup>1</sup>, Громько М.В.<sup>1</sup>,  
Коваль А.Н.<sup>1</sup>, Мазаник М.Е.<sup>1</sup>, Грицук А.И.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Республика Беларусь;*

<sup>2</sup>*Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,  
г. Одесса, Украина*

**Резюме.** В статье описаны элементы дистанционного обучения (ДО), используемые на кафедре общей, биоорганической и биологической химии в Гомельском государственном медицинском университете. Дан анализ их эффективности и перспективы использования.

Информационные технологии (ИТ) прочно вошли в образовательный процесс и, внося определенные коррективы в методы обучения, стали его неотъемлемой частью. Выделяют следующие виды информационных технологий: компьютеры, аудио-, и видеотехника, системы и средства телекоммуникаций [3]. Информационные (в первую очередь компьютерные) технологии позволяют интенсифицировать учебный процесс: обеспечить доступ студентов к информационным базам данных, дать возможность использовать в обучении компьютерную визуализацию, упростить и расширить обратную связь между студентом и преподавателем.

Дистанционное обучение (ДО) представляет собой новую перспективную технологию, обеспечивающую самостоятельное обучение студентов. Такая система использует электронные технологии для связи между учениками и учителями, разделенными в пространстве (месте), времени или обоими способами [4]. Онлайн-обучение, цифровое обучение, электронное обучение и виртуальное обучение, по-видимому, являются синонимами и взаимозаменяемыми и в целом различаются способами подачи информации. Однако они никогда не являются единственным механизмом предоставления услуг ни для университетского образования, ни для дистанционного обучения, поэтому используется довольно расплывчатый термин «смешанное обучение» для обозначения того, что цифровое обучение сочетается в некоторых пропорциях с одним или несколькими другими методами [5].

Традиционное обучение студентов на кафедре общей, биоорганической и биологической химии включает такие формы проведения занятий, как: лекции и лабораторно-практические занятия, на которых преподаватели используют методы устного или письменного опросов; проверку рефератов, заслушивание докладов, сообщений, подготовленных студентами; индивидуальные контрольные работы и ответы у доски. Высокие требования к будущим врачам обусловило отсутствие иных форм обучения в медицинском вузе, кроме стационарной.

Однако жизнь вносит свои коррективы: в условиях неблагоприятной эпидемиологической обстановки возникла необходимость сохранения эффективности учебного процесса на фоне режима самоизоляции, рекомендованного для иностранных студентов. Это потребовало от

преподавателей кафедры внедрения элементов ДО как инновационного компонента и интеграции их с традиционными технологиями обучения.

Работа по внедрению и использованию ИТ велась по нескольким направлениям и сопровождалась реорганизацией учебно-методической работы:

1. Обучающие приемы, направленные на получение знаний, формирование умений, навыков и компетенций будущего врача.

2. Приемы, направленные на проверку знаний, умений, навыков и компетенций.

3. Методы эффективной обратной связи между преподавателем и студентом.

В сформированный комплекс обучающих приемов были максимально включены ранее использованные на кафедре разработки. В первую очередь те, которые после внесения некоторых дополнений можно адаптировать для ДО:

1. Использование заданий, требующих самостоятельной доработки с целью изучения теоретического материала студентами, а также для проверки уровня знаний учащихся преподавателем [2]. Такая форма работы позволяет избежать механического заучивания материала со стороны студентов, стимулирует их к анализу и пониманию полученной информации.

2. Теоретическая проработка работ лабораторного практикума. Рабочие тетради лабораторного практикума были дополнены заданиями теоретической части: в частности, студентам предлагается рассчитать величину различных биохимических показателей гипотетических пациентов на основе показателей оптической плотности, коэффициента преломления и других показателей приборов [1]. Это позволяет студентам лучше понять клинико-диагностическое значение получаемых результатов.

3. Использование творческих заданий. Студентам предоставлялась возможность самостоятельного поиска материала в интернете, для подготовки рефератов и докладов.

В то же время ДО предполагает использование и принципиально новых приемов. Так, для проведения занятий использовались средства дистанционной коммуникации: *Zoom*, *Navek Meet*, *Peregovorka.by*, *Discord* и др. Данные средства связи позволяют общаться со студентом в режиме видеозвонка или с группой студентов в режиме видеоконференции.

Контроль со стороны преподавателя за усвоением учебного материала и контроль уровня знаний студента осуществлялись также на базе системы управления обучением *Moodle* в виде тестовых заданий.

В ходе проведенной работы был выявлен ряд особенностей ДО в приложении к биологической химии. К положительным сторонам можно отнести:

1. ДО позволяет оптимизировать учебный процесс: экономится время и уменьшаются материальные затраты, связанные с дорогой к месту учебы/работы, уменьшаются накладные расходы в вузе.

2. Отсутствие личного контакта, что становится актуальным в условиях обострения сезонных ОРВИ или в период карантина.

3. Более гибкая система обратной связи между студентом и преподавателем.

4. Возможность выбора студентами времени для самостоятельного изучения учебного материала.

Можно назвать следующие проблемы, с которыми столкнулась кафедра общей, биоорганической и биологической химии в процессе внедрения элементов ДО:

1. Разные уровни владения ИТ-технологиями как у преподавателей, так и у студентов.

2. Наличие большого количества технологических решений затрудняет оптимальный выбор.

3. Требуется время для подготовки к ДО (лекционный материал и лабораторно-практические занятия необходимо излагать более подробно).

4. Практическое выполнение лабораторных работ становится абсолютно невозможным.

5. Необходим достаточно высокий уровень самодисциплины студента и готовность к восприятию готового материала онлайн, что требует повышения мотивации учащихся к получению теоретических знаний и практических навыков.

6. Проблемы с самодисциплиной студентов при контроле конечного уровня знаний (опрос на расстоянии дает возможность пользоваться подсказками, конспектами, учебниками и т. д.). Решение данной проблемы также требует повышения мотивации студентов.

Для преодоления большинства из этих проблем на кафедре общей, биоорганической и биологической химии в качестве способа контроля полученных студентом знаний было проведено тестирование в дистанционной системе в режиме online (<http://dl.gsmu.by>), реализованной на платформе Moodle.

Необходимо отметить изначальную сложность и напряженность освоения преподавателями кафедры организации учебного процесса в новых условиях. Необходимость конвертирования тестовых заданий в формат, совместимый с Moodle (*GIFT, Aiken, Moodle XML*), процедура импорта файла, формирование банка вопросов требовала углубленных знаний, поэтому эту часть работы брали на себя сотрудники отдела информационных технологий нашего университета: благодаря их подробным инструкциям процесс наполнения сайта тестовым материалом проходил без особых проблем. Затем преподаватели кафедры обучались производить запись групп студентов на тестирование с учетом даты и времени проведения занятий. По сравнению с предыдущими годами, процесс тестирования осуществлялся в более комфортных условиях как для преподавателя, так и для студентов. После прохождения теста преподаватели могли сразу видеть полученные результаты с подробным анализом (рис. 1). Наглядное распределение результатов тестирования (рис. 2).

Для преподавателей, составляющих тесты, очень важно оценить их результативность на основе анализа ответов. Возможность ознакомиться со статистикой также предоставляется в системе управления обучением Moodle (рис. 3). Анализ структуры теста дает возможность преподавателю в последующем внести изменения в тестовые вопросы с целью улучшения качества тестирования.

Имя / Фамилия	Состояние	тест начат	завершено	затраченное время	Оценка/10,0	в. 1 /0,5	в. 2 /0
МАРИЯ НОВИКОВА	Завершённые	27 Май 2020 13:05	27 Май 2020 13:16	10 мин. 27 сек.	9,5	✗ 0,0	✓
ДИАНА ВОРОН	Завершённые	27 Май 2020 13:06	27 Май 2020 13:16	10 мин. 3 сек.	9,5	✓ 0,5	✗
ИРИНА АЛЕКСАНДРОВА	Завершённые	27 Май 2020 13:06	27 Май 2020 13:19	12 мин. 56 сек.	9,0	✓ 0,5	✓
ЕЛЕНА ЕФИМЕНКО	Завершённые	27 Май 2020 13:07	27 Май 2020 13:16	11 мин.	10,0	✓ 0,5	✓
ВАЛЕРИЯ ЗЫБЛИЧЕНКО	Завершённые	27 Май 2020 13:07	27 Май 2020 13:19	12 мин. 4 сек.	8,0	✓ 0,5	✓
ВАЛЕРИЯ КОРОТКАЯ	Завершённые	27 Май 2020 13:07	27 Май 2020 13:20	13 мин. 21 сек.	9,0	✓ 0,5	✗
ЕЛИЗАВЕТА		27					

Рисунок 1 — Таблица с результатами тестирования студентов

## Количество студентов в группе «Глобальная группа Д-208», достигших диапазона оценок

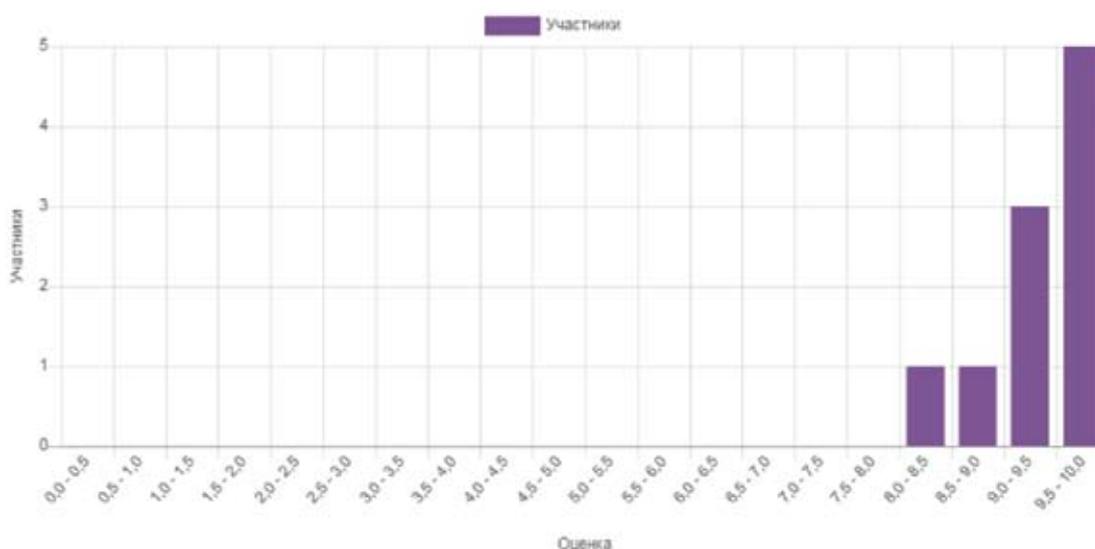


Рисунок 2 — Графическое представление успеваемости студентов в группе

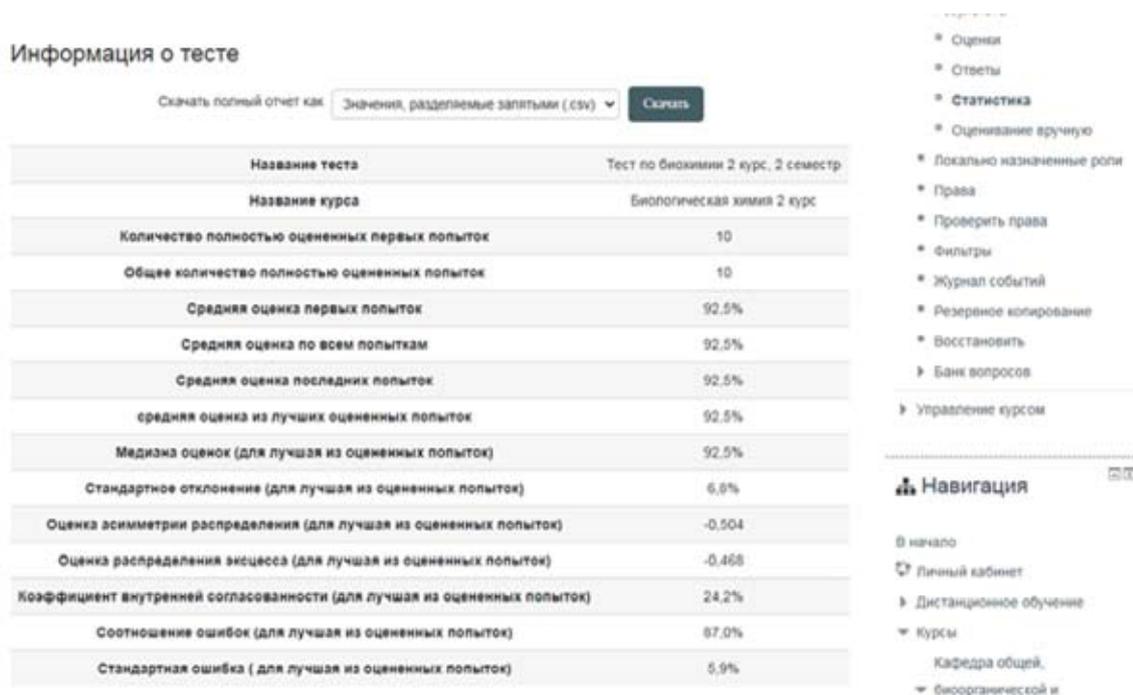


Рисунок 3 — Статистический анализ результатов тестирования в учебной группе

Основная цель системы образования — интеллектуальное и нравственное развитие личности, формирование критического и творческого мышления, умения работать с информацией, чему активно способствует ДО. Однако введение в учебный процесс дистанционной формы обучения требует от преподавателя повышения его квалификации в области ИТ и приводит к изменению роли самого преподавателя в процессе обучения.

**Заключение.** Использование ИТ обеспечивает обратную связь между преподавателем и студентом благодаря сохранению традиционного индивидуального (асинхронного) взаимодействия со студентами с использованием электронной почты, различных мессенджеров т. д.

Использование технологий ДО в преподавании предполагает наличие некоторых изменений в применяемых методиках: более активное приобщение студентов к использованию ЭУМК, самостоятельный разбор материала лекций, теоретическая детализация лабораторных работ.

Анализируя полученный опыт, необходимо отметить, что отдельные элементы ДО оказали положительное влияние на эффективность обучения студентов. В тоже время с учетом специфики преподавания в медицинском вузе использовать эти формы обучения можно только в сочетании с аудиторными занятиями.

### Список литературы

1. Биологическая химия: рабочая тетрадь для студентов 2-го курса всех факультетов учреждения высшего медицинского образования: в 2 ч. / А.И. Грицук [и др.]. — Гомель: ГомГМУ, 2019. — Ч. 1. — 80 с.

2. Громько, М.В. Первый уровень биохимии (для самостоятельной работы) : учеб.-метод. пособие; в 2 ч. / М.В. Громько, И.А. Никитина, О.С. Логвинович, А.И. Грицук. — Гомель: ГомГМУ, 2018. — Ч. 1. — 88 с.

3. Кравченя, Э.М. Информационные и компьютерные технологии в образовании : учеб.-метод. пособие для студентов специальности 1–080101 «Профессиональное обучение» / Э.М. Кравченя. — Минск, 2017. — 172 с.

4. Creating an optimal environment for distance learning in higher education: discovering leadership issues. Palgrave Communications, 6, 66 (2020) / E. Beketova [et al.]. — Mode of access: <https://doi.org/10.1057/s41599-020-0456-x>. — Date of access: 09.06.2020.

5. Traxler, J. Distance Learning — Predictions and Possibilities / Education Sciences. — 2018; 8(1):35. — Mode of ccess: <http://dx.doi.org/10.3390/educsci8010035>. — Date of access: 09.06.2020.

## USING OF THE DISTANCE LEARNING ELEMENTS FOR TEACHING THE COURSE OF BIOLOGICAL CHEMISTRY AT THE GOMEL STATE MEDICAL UNIVERSITY

---

*Nikitina I.A.<sup>1</sup>, Logvinovich O.S.<sup>1</sup>, Gromyko M.V.<sup>1</sup>, Koval A.N.<sup>1</sup>,  
Mazanik M.E.<sup>1</sup>, Gritsuk A.I.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Gomel State Medical University,  
Gomel, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Odessa National University,  
Odessa, Ukraine*

**Summary.** *The elements of distance learning (DO) used at the Department of General, Bioorganic and Biological Chemistry at Gomel State Medical University are described. The analysis of their effectiveness and prospects of use is given.*

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА В ОТНОШЕНИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

*Павлов К.И., Арабей С.В., Хватова Л.А., Кундельская Л.М., Курклинская Г.А.,  
Наборовская А.М., Метелица Т.Г., Чегодаева Е.В., Гиндюк А.В.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
Научно-исследовательская часть, Лаборатория экспериментальной медицины,  
фармакологии и токсикологии, г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** В статье представлены результаты исследования токсического эффекта этанола на культуры клеток человека и животных. Показаны особенности воздействия токсикантов на цитоплазматическую мембрану, хроматин, цитоскелет и митохондрии. Анализируются особенности этанола, как токсиканта в сравнении с различными химическими веществами и лекарственными средствами.

**Введение.** Применение методов и подходов *in vitro*-токсикологии для исследования разнообразных токсических эффектов химических веществ и лекарственных средств является актуальной задачей. Исследование эффектов этанола в отношении культур клеток — это новое направление в изучении данного токсиканта. В результате экспериментов по сокультивации этанола с различными линиями клеток должны быть описаны разнообразные особенности токсического воздействия. При сопоставлении этих данных с эффектами других веществ можно идентифицировать характерные признаки цитотоксичности этанола. На данный момент изучены некоторые мишени воздействия ряда референсных токсикантов — веществ с относительно предсказуемой активностью в отношении клеток. Так, можно выделить описание культивации клеток с солями тяжёлых металлов [1] и одноатомных спиртов [2]. Из методической литературы по гистохимии и проточной цитометрии известны эффекты сапонина, формальдегида, параформальдегида [3, 4, 5, 6]. Токсичность лекарственных средств и продукции медицинского назначения в экспериментах *in vitro* отличается высокой вариативностью и ещё недостаточно изучена. Сравнение эффекта этанола с различными группами токсикантов позволяет определить интенсивность и характерные признаки цитотоксичности данного вещества.

**Материалы и методы исследования.** В ходе выполнения данной работы была предложена методика оценки токсического действия лекарственных средств и химических веществ с использованием культур клеток. Для оценки токсического эффекта использовалась флуоресцентная микроскопия. Для обнаружения и характеристики проявлений цитотоксичности применялись различные флуоресцентные красители и моноклональные антитела (таблица 1). С использованием культур клеток были выполнены серии экспериментов по оценке токсических эффектов 15 лекарственных средств и 11 химических веществ — референсных токсикантов (таблица 2). В ходе исследования использовались группы лекарственных средств и отдельные препараты, относящиеся к антибактериальным, противовирусным, противоопухолевым, противовоспалительным, анальгетикам, иммунобиологическим препаратам, сердечным гликозидам.

При исследовании использовались следующие культуры клеток:

- мононуклеарные лейкоциты мыши и крысы,
- фибробласты человека,
- мезенхимальные стволовые клетки мыши,
- иммортализованные кератиноциты человека HaCaT.

Мононуклеарные лейкоциты были получены из селезёнок крыс и мышей с использованием центрифугирования в градиенте урографин-фикол 1077 г/мл и 1083 г/мл, соответственно. Мезенхимальные стволовые клетки получены из костного мозга мыши. Морфология и фенотип клеток, соответствовали требованиям, предъявляемым к МСК (CD90<sup>+</sup>CD45<sup>lo/-</sup>). Перед исследованием фибробласты и МСК культивировались в течение 3-х суток в среде DMEM с добавлением L-глутамина и сыворотки эмбрионов телят до достижения количества в 600 тысяч клеток на 1 лунку 24-х луночного планшета. Мононуклеарные лейкоциты из селезёнки крысы использовались в токсикологических исследованиях сразу после приготовления суспензии. Клетки линии HaCaT культивировали в среде F12/DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 4,5 мг/мл глутамина, при 37 °С в 5 % атмосфере [7]. Токсикант с культурами клеток селезёнки крысы и мыши инкубировался 1 час, с культурами клеток кератиноцитов HaCaT, МСК и фибробластов - 24 часа. Краткосрочность инкубации с культурами клеток селезёнки крысы и мыши вызвана высокой летальностью клеток селезёнки в первые сутки после выделения. Для отрицательного контроля использовалось добавление физиологического раствора в объёме, равном объёму добавленного токсиканта. После инкубации добавлялся флуоресцентный краситель и проводилось исследование при помощи микроскопа ZEISS Axio Vert.A1 (Германия). При исследовании токсического эффекта на культуры клеток оценивались следующие параметры (таблица 1).

**Таблица 1 — Оцениваемые параметры токсического воздействия на культуры клеток**

Морфологическая характеристика	Сокращение в тексте	Используемые красители
Нет эффекта: отсутствие патологических изменений, морфология соответствует нормальному состоянию клеточной культуры	НЭ	Акридиновый жёлтый, трипофлавин, родамин 6Ж, пропидий йодид, DAPI, пиронин Б, пиронин С, hoechst 33258, антитела к панцитокератинам, цитокератинам 7, 17
Нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны	Н/П	Пропидий йодид, DAPI, бромистый этидий, трипофлавин
Нарушение целостности цитоплазматической мембраны	Н/Ц	Акридиновый жёлтый, трипофлавин, родамин 6Ж, пропидий йодид, DAPI, пиронин Б, пиронин С, hoechst 33258
Фрагментация хроматина	Ф/Х	Пропидий йодид, DAPI
Нарушение морфологии клетки — округление	О	Акридиновый жёлтый, трипофлавин, родамин 6Ж, hoechst 33258
Повреждение актиновых структур цитоскелета	А	Aktin red
Снижение электрохимического заряда на мембране митохондрий	МП↓	JC-Mito
Краситель не эффективен	н	Пропидий йодид, JC-Mito, Aktin red

**Результаты исследования и их обсуждение.** Кератиноциты HaCaT, фибробласты и МСК в ходе эксперимента продемонстрировали высокую чувствительность как к действию референсных токсикантов, так и к используемым лекарственным средствам, что проявлялось в изменении проницаемости и целостности цитоплазматической мембраны. Повреждения

цитоплазмы характеризовались нарушением целостности и плотности, зернистостью. Воздействие этанола, цефазолина и колистина (в концентрации 5-50 мг/мл), ацикловира (в концентрации 25-50 мг/мл) и мелоксикама (в концентрации 50-200 мг/мл) приводили к изменению формы клеток (округлению) (рисунки 1, 2). В сравнении с другими референсными токсикантами этанол характеризовался умеренным воздействием на проницаемость и целостность цитоплазматической мембраны и внутриклеточных структур эндоплазматической сети. Наибольшие повреждающие эффекты выявлялись у бутанола и серноокислого кадмия. Средние и низкие концентраций этанола не влияли на уровень экспрессии цитокератина кератиноцитами (рисунок 3).

**Таблица 2 — Признаки повреждения цитоплазматической мембраны культур клеток фибробластов, кератиноцитов HaCaT и MCK**

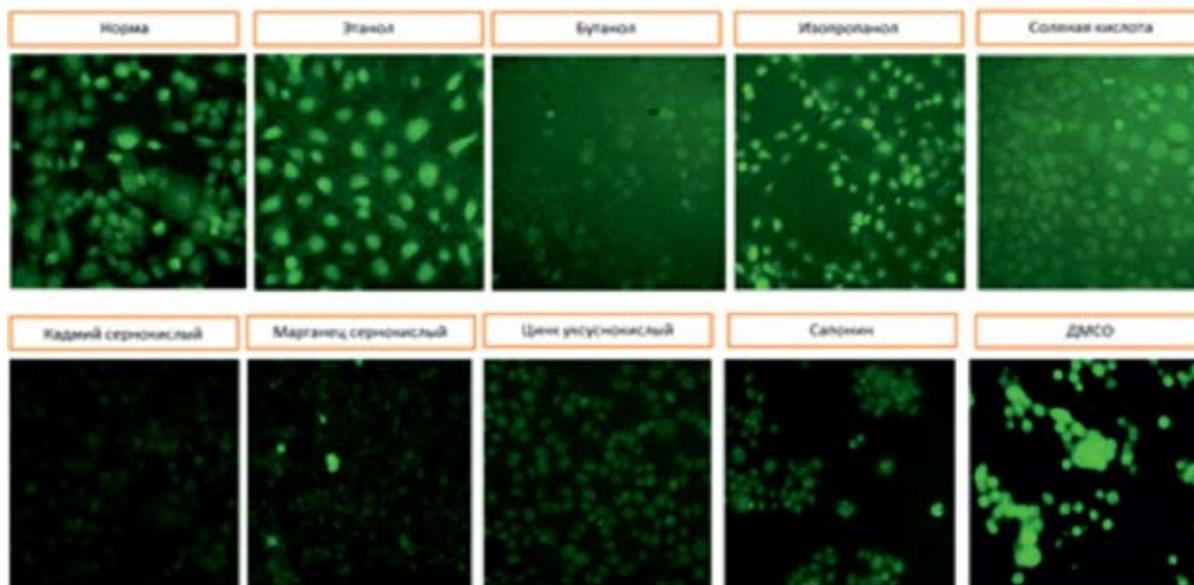
Токсическое воздействие	Концентрация токсиканта	Флуоресцентные красители			
		АЖ	Родамин Ж	DAPI	Пропидий йодид
Отсутствие воздействия	-	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
Этанол	20-50 мг/мл	О	О	Н/П	Н/П
DMCO	10-30 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц
Изопропанол	5-10 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц
Метанол	5-10 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц
Бутанол	5-10 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц
Сапонин	1-2 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц
Формальдегид	10-20 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Параформальдегид	10-20 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Кадмий серноокислый	1-2 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц
Марганец серноокислый	1-2 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц
Цинк уксуснокислый	1-2 мг/мл	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц	Н/Ц
Ванкомицин	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Колистин	5-50 мг/мл	О	О	Н/Ц	Н/Ц
Тейкоплагин	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Меропенем	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Цефазолин	5-50 мг/мл	О	О	Н/П	Н/П
Цефтриаксон	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Амоксициллин	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Линезолид	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Меркаптопурин	5-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Ацикловир	25-50 мг/мл	О	О	Н/П	Н/П
Фторурацил	25-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Цитарабин	25-50 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Аллопуринол	25-50 мг/кг	НЭ	НЭ	Н/П	Н/П
Мелоксикам	50-200 мг/мл	О	О	Н/П	Н/П
Доксирубицин	1-2 мг/мл	НЭ	НЭ	Н/П	н*

\*Примечание — краситель был не эффективен при визуализации клеточных структур.

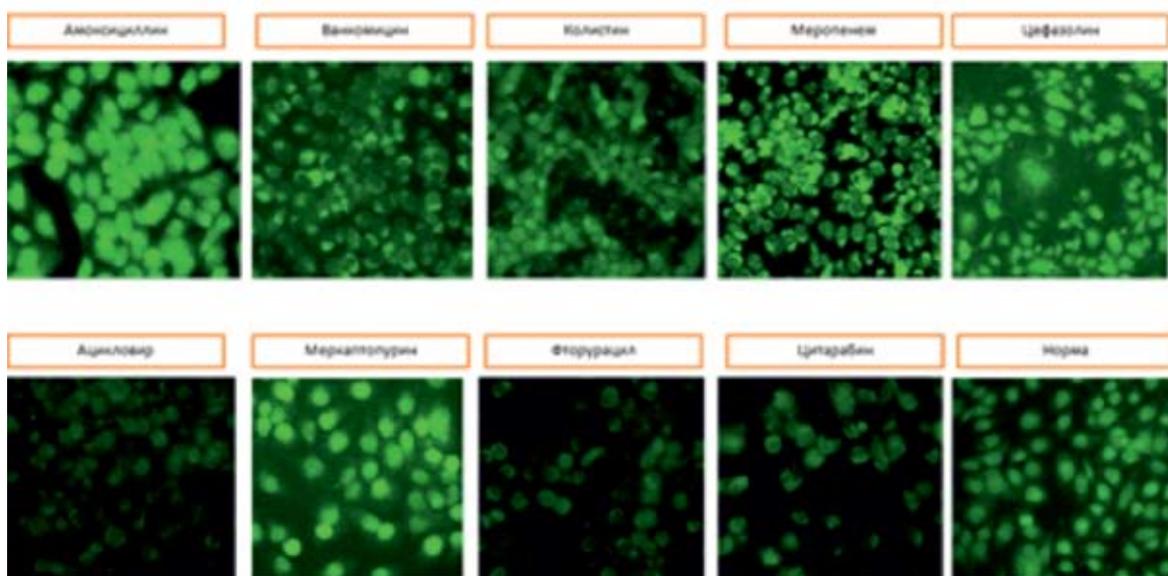
Цитотоксические эффекты лекарственных средств в отношении кератиноцитов HaCaT наблюдались через 24 часа инкубации и выражались в летальности свыше 50%, конденсации хроматина (Ф/Х) (рисунок 4), уменьшении количества актиновых волокон (А) (рисунок 5). При окрашивании культур клеток фибробластов, кератиноцитов и MCK флуоресцентным красителем, предназначенным для обнаружения внутриклеточного актина (Aktin red 555), было выявлено воздействие большинства токсикантов на плотность актиновых волокон и стабильность

структуры клеток. Напротив, исследования цитоскелета клеток селезёнки мыши и крысы были менее информативными. Актиновые волокна сохраняли стандартную структуру (рисунок 6).

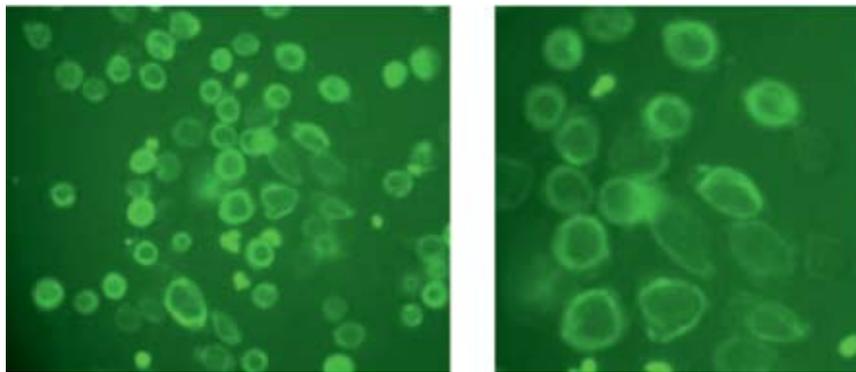
При использовании флуоресцентного красителя, предназначенного для оценки потенциала на мембране митохондрий (JC-mito), наблюдались изменения в культурах кератиноцитов, МСК и фибробластов после инкубации с с ДМСО, этанолом, изопропанолом, метанолом, бутанолом, сапонином, формальдегидом, параформальдегидом, кадмием сернокислым, марганцем сернокислым, цинком сернокислым. Среди перечня исследованных лекарственных средств (таблица 2) способностью воздействовать на мембранный потенциал митохондрий (МП↓) отличались антибактериальные лекарственные средства (ванкомицин, колистин, тейкопланин, меропенем).



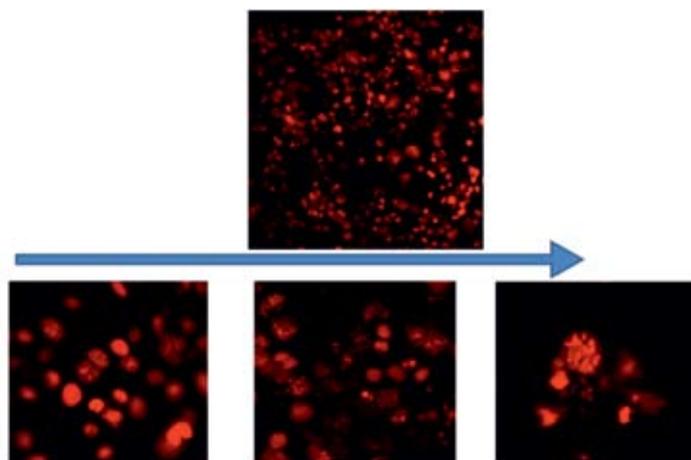
**Рисунок 1 — Изменение морфологии кератиноцитов HaCaT под воздействием референсных токсикантов**



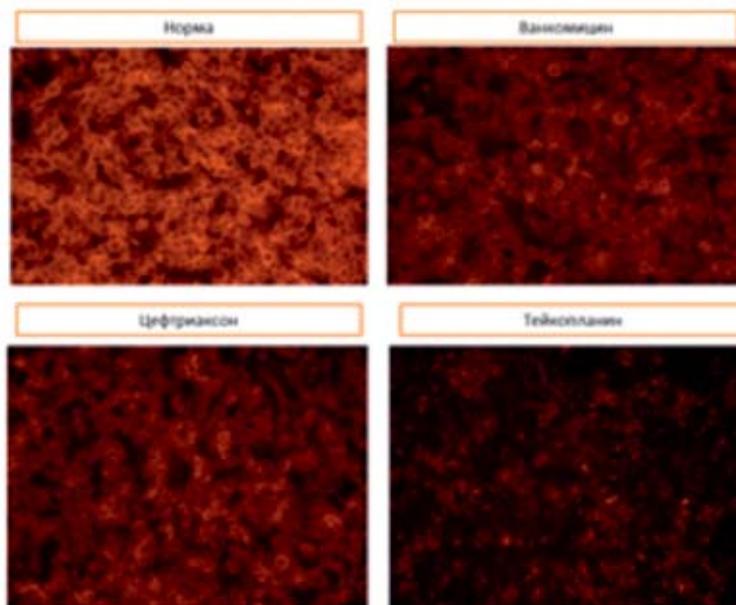
**Рисунок 2 — Изменение морфологии кератиноцитов HaCaT под воздействием лекарственных средств**



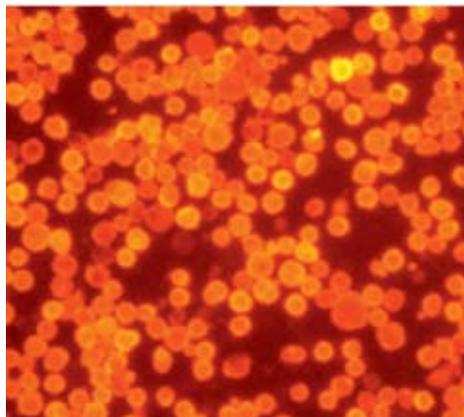
**Рисунок 3 — Экспрессия кератиноцитами HaCaT цитокератинов (окраска антителами к панцитокератинам)**



**Рисунок 4 — Изменение морфологии кератиноцитов HaCaT под воздействием этанола: при увеличении изображения (показано стрелкой) наблюдается интенсивная фрагментация хроматина (Ф/Х, окраска пропидием йодидом)**



**Рисунок 5 — Изменение цитоскелета кератиноцитов под действием лекарственных средств**



**Рисунок 6 — Мононуклеарные лейкоциты крысы (окраска цитоскелета)**

### **Заключение.**

Экспериментальные исследования по оценке токсических эффектов этанола, лекарственных средств и химических веществ — референсных токсикантов на культуры клеток мононуклеарных лейкоцитов, фибробластов, МСК, кератиноцитов NaCaT позволили определить наиболее информативные токсические эффекты:

- этанол характеризуется умеренным эффектом на проницаемость цитоплазматической мембраны в сравнении с химическими веществами и лекарственными средствами. Инкубация кератиноцитов NaCaT с этанолом, изопропанолом, метанолом, бутанолом, солями тяжёлых металлов, ванкомицином, колистином, тейкопланином, меропенемом, цефазолином, меркаптопурином сопровождалась изменением морфологии клеток (округлением).

- этанол вызывает интенсивную фрагментацию хроматина различных культур клеток человека и животных;

- наиболее частыми изменениями в строении цитоскелета кератиноцитов, фибробластов и МСК под воздействием этанола было снижение количества актиновых волокон. В то же время, для мононуклеарных лейкоцитов характерно сохранение плотности цитоскелета, относительно редкая замена актиновых пучков точками;

- инкубация культур клеток с этанолом способствует выраженному снижению электрохимического мембранного потенциала митохондрий.

### **Список литературы**

1. Дмитруха, Н.Н. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях / Н.Н. Дмитруха // *Фундаментальні дослідження*. — 2013. — Т. 33, № 3. — С. 50-55.

2. Дроздова, Е.В. Оценка интегральной токсичности факторов и объектов среды обитания с использованием альтернативных биологических тест-моделей: методология и технологии /

Е. В. Дроздова [и др.]; М-во здравоохранения Республики Беларусь, Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены». — Минск: Транстехника, 2017. — 212 с.

3. Assessment of different permeabilization methods of minimizing damage to the adherent cells for detection of intracellular RNA by flow cytometry / Zahra Amidzadeh [et al.] // *Avicenna J Med Biotech*. — 2014. — № 6. — P. 38-46

4. Васильева, И. С. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскареи, их метаболизм и биологическая активность / И.С. Васильева, В.А. Пасешниченко // Успехи биологической химии. — 2000. — Т. 4. — С. 153-204.

5. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. / Estrada A. [et al.] // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. — 2000. — № 23. — P. 27-43

6. Сапонины растений *Polemonium coeruleum* L. и *Beta vulgaris* L. Особенности получения, сравнительная оценка гипогликемической активности / С.А. Боева [et al.] // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. — 2007. — № 1. — С. 139-141.

7. Черношей, Д. А. Методы выделения клеток кожи человека (кератиноциты и фибробласты): инструкция по применению: утверждена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет, 2015 / Д. А. Черношей, Л.А. Хватова, О.Ю. Сыманович; УО БГМУ. — Минск, 2015.

## COMPARISON OF ETHANOL TOXIC EFFECTS ON HUMAN AND ANIMAL CELL CULTURES

---

*Pavlov K.I., Arabei S.V., Khvatova L.A., Kundelskaya L.M., Kurklinskaya G.A., Naborovskaya A.M., Metelitsa T.G., Chegodaeva E.V., Gindyuk A.V.*

*Educational Institution “Belarusian State Medical University”, Research Unit, Laboratory of Experimental Medicine, Pharmacology and Toxicology, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *The article presents the results of ethanol toxic effect on human and animal cell cultures. The effect of toxicants on the cytoplasmic membrane, chromatin, cytoskeleton and mitochondria are shown. The features of ethanol as a toxicant analyzed in comparison with various chemicals and drugs.*

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ НЕУПОТРЕБЛЕНИЯ И УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ СРЕДИ СТУДЕНТОВ-МЕДИКОВ РАЗНОГО ПОЛА МЛАДШИХ КУРСОВ: ВЗАИМОСВЯЗЬ С ИХ УСПЕВАЕМОСТЬЮ

*Переверзев В.А.<sup>1</sup>, Блажко А.С.<sup>1</sup>, Евсеев А.В.<sup>2</sup>, Вэлком М.О.<sup>3</sup>, Разводовский Ю.Е.<sup>4</sup>,  
Александров Д.А.<sup>1</sup>, Никитина О.С.<sup>1</sup>, Переверзева Е.В.<sup>1</sup>, Пожарицкий А.М.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Смоленский государственный медицинский университет»,  
г. Смоленск, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Нильский университет Нигерии,  
г. Абуджа, Республика Нигерия;

<sup>4</sup>Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие  
«Институт биохимии биологически активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

**Резюме.** Среди белорусских студентов распространенность трезвого образа жизни в несколько раз меньше по сравнению с иностранными учащимися, что указывает на необходимость модификации поведенческих традиций молодых белорусов. Наши наблюдения и расчеты указывают на широкую распространенность употребления алкоголя молодежью Беларуси и обусловленный этим рост алкогольных проблем, особенно, у молодых женщин, что проявляется достоверным снижением их академической успеваемости по сравнению как со студентами трезвенниками, так и с юношами, употребляющими алкогольные напитки.

**Введение.** Алкоголизм — глобальная проблема, в том числе и в Беларуси [1, 5, 6, 13]. Ежегодно от непосредственного употребления алкоголя, последствий его негативного воздействия на организм, актов насилия, ДТП, спровоцированных лицами, находящимися в состоянии алкогольного опьянения, умирает больше людей, чем от СПИДа и туберкулеза вместе взятых [5, 13]. По данным ВОЗ, 5,9 % всех смертельных исходов ассоциированы с алкоголем [5, 13].

В Беларуси [10] за год около 20 тысяч человек умирает от заболеваний, связанных с вредным употреблением алкоголя, из них: более 11 тысяч — это смерти от сердечно-сосудистых заболеваний (инфарктов, инсультов, сердечной недостаточности); около 6 тысяч смертей — от внешних причин (суицидов, травм, пожаров, утопления и ДТП) в состоянии алкогольного опьянения; свыше одной тысячи смертей — от алкогольного цирроза печени, и примерно столько же от рака, который также связан с пьянством. В 2018 г. 1476 жителей Беларуси умерли от отравления алкоголем [10]. Это 1186 мужчин и 290 женщин. Лишь 10 % из этих смертей связаны с некачественным алкоголем или употреблением метилового спирта. Почти все смерти в этой категории — от передозировки спиртного. Достаточно существенный вклад в этот негативный процесс вносит женский алкоголизм (почти 20 % смертности при отравлении алкоголем).

С начала нового тысячелетия во многих странах мира отмечается рост уровня потребления этанола среди женщин и снижение межполовой разницы уровня алкогольных проблем [3, 11, 12, 14]. Рост уровня алкогольных проблем среди женщин, особенно молодых, связывают с увеличением их социальной роли в современном обществе и с их большей вовлеченностью в традиционно мужские сферы деятельности, что ассоциируется с финансовой независимостью и вы-

соким уровнем стресса [16]. Эти процессы происходят на фоне изменения норм социального поведения, в том числе в виде увеличения социальной приемлемости женского пьянства и снижения его негативного восприятия общественным сознанием [15].

В свете изложенного выше актуальной задачей остается мониторинг уровня связанных с алкоголем проблем в среде молодежи (студентов), в том числе межполового градиента.

**Цель работы.** Провести скрининг распространенности употребления алкоголя и режимов его потребления среди студентов-медиков (белорусов и иностранцев) младших курсов разного пола (с расчетом межполового градиента) с учетом их вероисповедания и национальных традиций.

**Материалы и методы исследования.** Исследования выполнены с участием студентов 1–2 курсов всех факультетов БГМУ при их добровольном согласии. Отказались от участия в исследовании 42 студента: 10 белорусов и 32 иностранца. В исследовании приняли участие 1049 человек, среди них: 832 белорусских студентов и 217 иностранных. Все студенты, согласившиеся участвовать в исследовании, заполняли три анкеты: «Общая» (со встроенным тестом «Искренность», содержащим 10 вопросов шкалы «Лжи» из методики «Уровень невротизации-психопатизации» [9]) и анкеты психометрических тестов «AUDIT» и «CAGE» (для выявления алкогольных проблем у респондентов [1, 13]).

Вопросы анкеты «Общая», утвержденной Комитетом по биомедицинской этике БГМУ (10.02.2019), позволяли оценить искренность (правдивость) ответов студентов и получить общие сведения о них, включая их отношение к алкоголю (трезвенник или лицо, употребляющее алкогольные напитки). Ответы на вопросы шкалы «Лжи» позволяли оценить искренность студентов, что необходимо для суждения о степени доверия ответам испытуемых и по другим тестам. Это соответствует современным требованиям проведения психометрической диагностики [2]. Результаты психометрических тестов учитывались только в том случае, если число правдивых ответов шкалы «Лжи» составляло не менее 6 из 10 вопросов (т. е. 60–100 %). Все анкеты респондентов, набравших в тесте «Искренность» 5 и менее баллов ( $\leq 50\%$ ) согласно рекомендаций [2, 9] не интерпретировались. По тесту «Искренность» набрали 50 и менее процентов 84 иностранных и 142 белорусских студента: их анкеты были исключены из анализа. Для анализа использовались анкеты 823 молодых людей: 690 (163 юношей и 527 девушек) белорусских студентов и 133 (90 молодых мужчин и 43 молодых женщин) иностранных учащихся.

Для выявления распространенности употребления алкогольных напитков и связанных с этим (алкогольных) проблем среди студентов были использованы психометрические тесты «AUDIT» и «CAGE». Следует отметить, что эти тесты предложены ВОЗ [1, 13] для выявления начальных признаков алкогольных проблем и рекомендованы для использования в наркологической и общемедицинской практике Республики Беларусь (Инструкция по применению «Алгоритм клинической диагностики алкогольной болезни печени». Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 05.12.2013). Это позволило оценить у испытуемых наличие проблем, обусловленных алкоголем, а также рассчитать частоту и объем (разовый, месячный и годовой в пересчете на абсолютный этанол) его потребления. Вопросы анкеты «Общая» позволяли рассчитать стаж (общую длительность и объем потребленного этанола) и возраст начала потребления алкоголя, а также длительность периодов трезвости, узнать возраст самого испытуемого, его пол, место (страну) рождения (белорус или иностранец), вероисповедание, отношение к здоровому образу жизни.

У всех 690 белорусских студентов рассчитывали средний балл успеваемости (СБУ) по изучаемой дисциплине на момент исследования.

Межполовой градиент у респондентов рассчитывался как соотношение распространенности трезвого образа жизни и употребления алкогольных напитков (в том числе, в опасном и вредном

режиме) среди молодых людей (девушек и юношей) разного пола, а также в сравнении СБУ у них (белорусских студенток и студентов) в зависимости от балла шкалы теста «AUDIT».

Статистическая обработка проведена с использованием параметрических и непараметрических методов [4, 7].

**Результаты исследования и их обсуждение.** Анализ данных из анкет 823 студентов (253 юношей и 570 девушек) 1 и 2-го курсов БГМУ, заслуживающих доверия согласно результатов скрытого теста «Искренность» (набрали 60 % и более), показал, что среди молодежи было 145 трезвенников и 678 молодых людей, употребляющих алкогольные напитки (табл. 1).

**Таблица 1 — Распространенность (удельный вес) неупотребления и употребления алкоголя среди белорусских и иностранных студентов разного пола**

№ п/п	Группа молодых людей	Удельный (уд.) вес студентов с разным отношением к алкоголю				
		Общее число	Трезвенников (ТР)		Употребляющих алкоголь (УА)	
			п <sub>ТР</sub>	уд. вес, % (M ± m)	п <sub>УА</sub>	уд. вес, % (M ± m)
1	Студенты 1 и 2-го курсов	823	145	17,6 ± 1,3 *▲	678	82,4 ± 1,3 *▲
2	Белорусские студенты 1 и 2-го курсов	690	74	10,7 ± 1,2 *▲■(3)	616	89,3 ± 1,2 *▲■(3)
3	Иностранные студенты 1 и 2-го курсов	133	71	53,4 ± 4,3 *■(2)	62	46,6 ± 4,3 *■(2)
4	Студентки (девушки) 1 и 2-го курсов	570	74	13,0 ± 1,4 *▲♂(7;9)	496	87,0 ± 1,4 *▲♂(7;9)
5	Белорусские студентки 1 и 2-го курсов	527	50	9,5 ± 1,3 *▲■(6) ♂(7;9)	477	90,5 ± 1,3 *▲■(6) ♂(7;9)
6	Иностранные студентки 1 и 2-го курсов	43	24	55,8 ± 7,6 *■(5) ♂(7;8)	19	44,2 ± 7,6 *■(5) ♂(7;8)
7	Студенты (юноши) 1 и 2-го курсов	253	71	28,1 ± 2,8 *▲♀(4;5;6)	182	71,9 ± 2,8 *▲♀(4;5;6)
8	Белорусы 1 и 2-го курсов	163	24	14,7 ± 2,8 *▲■(9) ♀(6)	139	85,3 ± 2,8 *▲■(9) ♀(6)
9	Иностранцы 1 и 2-го курсов	90	47	52,2 ± 5,3 *■(8) ♀(4;5)	43	47,8 ± 5,3 *■(8) ♀(4;5)

*Примечания:* п — число молодых людей в группе или подгруппе; \* — достоверность различий ( $p < 0,001$ ) доли трезвенников или молодых людей, употребляющих алкоголь, к нулевой гипотезе в каждой группе (с 1 по 9 включительно); ▲ — достоверность различий ( $p < 0,05$ ) между долями трезвенников и молодых людей, употребляющих алкоголь, внутри своей группы (1, 2, 4, 5, 7 и 8); ■ — достоверность различий ( $p < 0,001$ ) между долями трезвенников среди белорусских и иностранных студентов (подгруппы 2–3), в том числе девушек (5–6) и юношей (8–9), а также между долями белорусских и иностранных учащихся, употребляющих алкоголь (подгруппы: 2–3; 5–6; 8–9 соответственно); ♂♀ — достоверность различий ( $p < 0,001$ ) между долями трезвенников среди студентов разного пола (девушек по отношению к юношам (подгрупп 7, 8 или 9) и наоборот юношей к девушкам /подгрупп 4, 5 или 6/), а также среди учащихся, употребляющих алкоголь, соответственно.

Таким образом, доля студентов, приверженных трезвому образу жизни, составила  $17,6 \pm 1,3$  %, в том числе: среди белорусских младшекурсников — 10,7 % (74 человек); среди иностранных учащихся — 53,4 % (71 человек). Следовательно, распространенность трезвого образа жизни среди иностранных учащихся была в 4,99 раза ( $\chi^2 = 139,8$ ;  $p < 0,000$ ) больше, чем среди белорусских студентов.

Среди молодых мужчин был 71 трезвенник (их доля составила 28,1 %), а среди молодых женщин — 74 трезвенницы с долей 13,0 %, которая была в 2,16 раза ( $\chi^2 = 27,457$ ;  $p < 0,001$ ) меньше, чем у юношей (межполовой градиент 1:2,16). Доля как мужчин-трезвенников, так и женщин-трезвенниц была достоверно шире среди иностранных учащихся по сравнению с белорусскими студентами (см. табл. 1). Она составляла соответственно 52,2 % и 14,7 % для юношей (т. е. в 3,55 раза больше / $p < 0,001$ / у студентов-иностранцев) и 55,8 % и 9,5 % для девушек (т. е. в 5,87 раза больше / $p < 0,001$ / у студенток-иностранок). Межполовой градиент (девушки : юноши) составил для белорусских студентов 1:1,55, а для иностранных учащихся — 1:0,94, что указывает на большую вовлеченность белорусских девушек в употребление алкогольных напитков.

Столь выраженные различия в употреблении алкоголя между белорусскими и иностранными студентами вероятно обусловлены этнокультурными и религиозными различиями между ними, учитывая, что большинство зарубежных учащихся прибыло с Ближнего Востока (Иран,

Ливан), среднеазиатских республик (Туркменистан) и Юго-Восточной Азии (Индия). В связи с этим была проанализирована религиозная принадлежность отечественных и иностранных учащихся и распространенность употребления ими алкоголя (табл. 2).

**Таблица 2 — Удельный вес трезвенников среди студентов разного пола и различной конфессиональной принадлежности**

№ п/п	Вероисповедание (конфессиональная принадлежность) молодых людей	Группы и подгруппы молодых людей (МЛ) различного вероисповедания и удельный (уд.) вес среди них трезвенников (Тр) с учетом места их рождения				
		Общее число МЛ (N)	Белорусские студенты (БС) Тр		Иностранные учащиеся (ИУ) Тр	
			$N = N_{БС} + N_{ИУ}$	$n_{БС-Тр}$	уд. вес, % (M ± m)	$n_{ИУ-Тр}$
1	Вся выборка МЛ	823 = 690 + 133	74	10,7 ± 1,2 * ▲ <sup>(5)</sup> ■	71	53,4 ± 4,3 * ▲ <sup>(3,4,7)</sup> ■
2	Православие	465 = 463 + 2	47	10,2 ± 1,4 * ▲ <sup>(5)</sup>	1	25,0 ± 21,7
3	Католицизм	76 = 65 + 11	8	12,3 ± 4,1 * ▲ <sup>(5)</sup>	2	18,2 ± 11,6
4	Христианство	543 = 528 + 15	55	10,4 ± 1,3 * ▲ <sup>(5)</sup>	3	20,0 ± 10,3
5	Ислам	77 = 5 + 72	3	60,0 ± 21,9 * ▲ <sup>(1-4,8)</sup>	45	62,5 ± 5,7 * ▲ <sup>(3,4,7)</sup>
6	Буддизм	22 = 0 + 22	—	—	10	45,5 ± 10,6 * ▲ <sup>(7)</sup>
7	Иудаизм	2 = 0 + 2	—	—	0	0 ▲ <sup>(1,5,6,8)</sup>
8	Атеизм +	179 = 157 + 22	16	10,2 ± 2,4 * ▲ <sup>(5)</sup> ■	13	59,1 ± 10,5 * ▲ <sup>(3,4,7)</sup> ■
Девушки						
1	Девушки (все из МЛ)	570 = 527 + 43	50	9,5 ± 1,3 * ▲ <sup>(5)</sup> ■	24	55,8 ± 7,6 * ▲ <sup>(2)</sup> ■
2	Православие	367 = 365 + 2	30	8,2 ± 1,4 * ▲ <sup>(5)</sup> ■ ♂	0	0 ▲ <sup>(1,5)</sup> ■
3	Католицизм	52 = 48 + 4	6	12,5 ± 4,8 * ▲ <sup>(5)</sup>	1	25,0 ± 21,7
4	Христианство	419 = 413 + 6	36	8,7 ± 1,4 * ▲ <sup>(5)</sup> ♂	1	16,7 ± 15,2
5	Ислам	28 = 4 + 24	3	75,0 ± 19,4 * ▲ <sup>(1-4,8)</sup>	18	75,5 ± 8,8 * ▲ <sup>(2)</sup>
6	Буддизм	9 = 0 + 9	—	—	3	33,3 ± 15,7
7	Иудаизм	0 = 0 + 0	—	—	-	—
8	Атеизм +	114 = 110 + 4	11	10,0 ± 2,9 * ▲ <sup>(5)</sup> ■	2	50,0 ± 25,0 ■
Юноши						
1	Юноши (все из МЛ)	253 = 163 + 90	24	14,7 ± 2,8 * ■	47	52,2 ± 5,3 * ■
2	Православие	100 = 98 + 2	17	17,3 ± 3,8 * ♀	1	50,0 ± 25,0
3	Католицизм	24 = 17 + 7	2	11,8 ± 7,8	1	14,3 ± 13,2 ▲ <sup>(5,8)</sup>
4	Христианство	124 = 115 + 9	19	16,5 ± 3,5 * ♀	2	22,2 ± 13,9
5	Ислам	49 = 1 + 48	0	0	27	56,3 ± 7,2 * ▲ <sup>(3)</sup>
6	Буддизм	13 = 0 + 13	—	—	7	53,8 ± 13,8*
7	Иудаизм	2 = 0 + 2	—	—	0	0
8	Атеизм +	65 = 47 + 18	5	10,6 ± 4,5 * ■	11	61,1 ± 11,5 * ▲ <sup>(3)</sup> ■

*Примечания:* N — число молодых людей в группе или подгруппе; n — число трезвенников в группе или подгруппе; \* — достоверность различий ( $p < 0,001$ ) доли трезвенников к нулевой гипотезе в каждой подгруппе; ▲ — достоверность различий ( $p < 0,05$ ) между долями трезвенников в подгруппах белорусских студентов различной конфессиональной принадлежности, а также в подгруппах иностранных учащихся различной конфессиональной принадлежности; ■ — достоверность различий ( $p < 0,001$ ) между долями трезвенников среди белорусских и иностранных студентов одной группы; ♂ — достоверность различий ( $p < 0,001$ ) между долями трезвенников среди белорусских студентов разного пола одной конфессии.

Среди белорусских студентов преобладали христиане (76,5 %): православные (67,1 %) и католики (9,4 %); а также были атеисты и неопределившиеся со своими взглядами молодые люди (22,8 %); мусульмане (0,7 %). Среди иностранных студентов были мусульма-

не (54,2 %); буддисты (16,5 %); атеисты и неопределившиеся со своими взглядами молодые люди (16,5 %); христиане (11,3 %): православные (3,0 %) и католики (8,3 %); иудаисты (1,5 %). Распространенность трезвого образа жизни (табл. 2) и употребления алкоголя среди молодых людей составила соответственно среди христиан 10,7 % и 89,3 % (православных — 10,3 % и 89,7 %; католиков — 13,2 % и 86,8 %); буддистов — 45,5 % и 54,5 % и мусульман — 62,3 % и 37,7 %. Среди атеистов и неопределившиеся со своими взглядами молодых людей доля трезвенников (табл. 2) и лиц, употребляющих алкоголь, составила соответственно 16,2 % и 83,8 %, а именно, среди белорусов — 10,2 % и 89,8 %; среди иностранных учащихся — 59,1 % и 40,9 %. Таким образом, религиозные и этнокультурные особенности воспитания молодых людей вносят существенный вклад в их отношение к употреблению алкогольных напитков.

Расчет межполового градиента трезвого образа жизни составил по мере возрастания для молодежи разных конфессий: 1:0,73 — у исповедующих ислам; 1:1,62 — буддистов; 1:1,88 — христиан; 1:2,16 — атеистов и неопределившихся. Следовательно, отсутствие или неопределенность религиозных убеждений снижают распространенность трезвого образа жизни среди молодых женщин по сравнению с молодыми мужчинами более чем в 2 раза.

Расчет распространенности опасного и вредного режимов употребления алкоголя белорусскими студентами младших курсов показал, что он составил у девушек  $10,8 \pm 1,4$  % случаев, а у юношей  $18,4 \pm 3,0$  % ( $\chi^2 = 7,801$ ;  $p < 0,01$ ) при межполовом градиенте равном 1:1,70. Столь низкий межполовой градиент указывает на рост алкогольных проблем у молодых женщин Беларуси.

Известно, что основным показателем трудовой деятельности учащихся является их успеваемость. Успеваемость была оценена в исследованиях как средний балл всех оценок, полученных индивидуально каждым белорусским студентом по дисциплине «Нормальная физиология» или «Анатомия и физиология человека» за период обучения предшествующий проведению исследования. Она анализировалась в соответствии с отношением студентов к потреблению алкогольных напитков (балл теста «AUDIT») и их полом (см. табл. 3).

Из представленных в таблице 3 данных видно, что потребление алкогольных напитков приводит к снижению академической успеваемости студентов как среди юношей, так и среди девушек. Причем по мере увеличения алкогольных проблем, о чем свидетельствовало повышение балла теста «AUDIT» успеваемость студентов прогрессивно снижалась и, прежде всего, среди девушек (табл. 3). Об этом свидетельствовало постоянное достоверное снижение СБУ у студентов УАН по отношению к трезвенникам на 0,46–0,93 балла (табл. 3), в том числе: среди девушек — на 0,48–1,19 балла; среди юношей — на 0,42–0,52 балла. Межполовой градиент академической успеваемости отсутствовал у трезвенников, а у студентов УАН выявлялся при повышении балла теста «AUDIT» более 3 (табл. 3). Так, успеваемость девушек УАН и набравших по тесту «AUDIT» четыре (4–17) и выше (5–17, 6–17 и более) баллов по отношению к юношам была достоверно ниже и прогрессивно нарастала от 4,9 % (при «AUDIT» 4–17 баллов) до 13,3 % (при «AUDIT» 8–17 баллов). Полученные факты указывают на большую токсичность действия этанола на женщин по сравнению с мужчинами.

Проведенное в 2017 г. социологическое исследование [8] показало, что более трети взрослых белорусских респондентов (34,9 %) трезвенники, пиво употребляют 16,1 % опрошенных, слабоалкогольные напитки — 23,4 %, а крепкий алкоголь — 21,7 %. Установленные нами факты (см. табл. 1) показывают более широкое распространение употребления алкоголя среди молодежи (89,3 %) по сравнению с взрослым населением Республики Беларусь (65,1 % [8]) и достоверно меньшую долю лиц, ведущих трезвый образ жизни, среди белорусских студентов по отношению иностранных учащихся (см. табл. 1), исповедующих ислам и буддизм (см. табл. 2). Это указывают

на существенную роль этнокультурных и религиозных особенностей воспитания молодежи на их отношение к употреблению алкогольных напитков.

**Таблица 3 — Успеваемость белорусских студентов разного пола, неупотребляющих (трезвенников /Тр) и употребляющих алкогольные напитки (УАН)**

№ п/п	Балл по AUDIT	Средний балл успеваемости (СБУ) и его отличия у студентов УАН ( $\Delta$ и %) к трезвенникам						
		У обоих полов		Среди девушек (Д)		Среди юношей (Ю)		Разность между Ю и Д $\Delta$ СБУ ( $M_{Ю} - M_{Д}$ ) / % ( $\Delta$ СБУ•100: $M_{Д}$ )
		N	СБУ( $M \pm m$ ) / $\Delta$ ( $M_{УАН} - M_{Тр}$ ) и %	N	СБУ( $M \pm m$ ) / $\Delta$ ( $M_{УАН} - M_{Тр}$ ) и %	N	СБУ( $M \pm m$ ) / $\Delta$ ( $M_{УАН} - M_{Тр}$ ) и %	
1	0 (Тр)	74	6,52 $\pm$ 0,12 б / 0 б и 100 %	50	6,52 $\pm$ 0,16 б / 0 б и 100 %	24	6,53 $\pm$ 0,17 б / 0 б и 100 %	+0,01 б / +0,2 %
2	1	145	6,49 $\pm$ 0,07 б <sup>■</sup> <sub>(3-10)</sub> / -0,03 б и 99,5 %	121	6,48 $\pm$ 0,08 б <sup>■</sup> <sub>(3-10)</sub> / -0,04 б и 99,4 %	24	6,52 $\pm$ 0,17 б <sup>■</sup> <sub>(3-10)</sub> / -0,01 б и 99,8 %	+0,04 б / +0,6 %
3	1-17	616	6,06 $\pm$ 0,04 б <sup>■</sup> <sub>(2,4-10)</sub> / -0,46 б и 92,9 %	477	6,04 $\pm$ 0,05 б <sup>■</sup> <sub>(2,5-10)</sub> / -0,48 б и 92,6 %	139	6,11 $\pm$ 0,09 б <sup>■</sup> <sub>(2)</sub> / -0,42 б* и 93,6 %*	+0,07 б / +1,2 %
4	2-17	471	5,93 $\pm$ 0,05 б <sup>■</sup> <sub>(2,3,9,10)</sub> / -0,56 б* и 91,4 %*	356	5,90 $\pm$ 0,06 б <sup>■</sup> <sub>(2,7-10)</sub> / -0,52 б* и 92,0 %*	115	6,04 $\pm$ 0,10 б <sup>■</sup> <sub>(2)</sub> / -0,49 б* и 92,5 %*	+0,14 б / +2,4 %
5	3-17	361	5,92 $\pm$ 0,06 б <sup>■</sup> <sub>(2,3,9,10)</sub> / -0,60 б* и 90,8 %*	260	5,86 $\pm$ 0,07 б <sup>■</sup> <sub>(2,3,8-10)</sub> / -0,66 б* и 89,9 %*	101	6,09 $\pm$ 0,11 б <sup>■</sup> <sub>(2)</sub> / -0,44 б* и 93,3 %*	+0,23 б / +3,9%
6	4-17	299	5,84 $\pm$ 0,06 б <sup>■</sup> <sub>(2,3,10)</sub> / -0,68 б* и 89,6 %*	208	5,75 $\pm$ 0,08 б <sup>■</sup> <sub>(2,3,9,10)</sub> / -0,77 б* и 88,2 %*	91	6,03 $\pm$ 0,11 б <sup>■</sup> <sub>(2)</sub> / -0,50 б* и 92,3 %*	+0,28 б <sup>♂♀</sup> / +4,9 % <sup>♂♀</sup>
7	5-17	232	5,78 $\pm$ 0,07 б <sup>■</sup> <sub>(2,3)</sub> / -0,74 б* и 88,7 %*	151	5,64 $\pm$ 0,09 б <sup>■</sup> <sub>(2-4)</sub> / -0,88 б* и 86,5 %*	81	6,01 $\pm$ 0,12 б <sup>■</sup> <sub>(2)</sub> / -0,52 б* и 92,0 %*	+0,37 б <sup>♂♀</sup> / +6,6 % <sup>♂♀</sup>
8	6-17	177	5,76 $\pm$ 0,08 б <sup>■</sup> <sub>(2,3)</sub> / -0,76 б* и 88,3 %*	111	5,61 $\pm$ 0,10 б <sup>■</sup> <sub>(2-5)</sub> / -0,91 б* и 86,0 %*	66	5,97 $\pm$ 0,12 б <sup>■</sup> <sub>(2)</sub> / -0,56 б* и 91,4 %*	+0,36 б <sup>♂♀</sup> / +6,4 % <sup>♂♀</sup>
9	7-17	130	5,64 $\pm$ 0,09 б <sup>■</sup> <sub>(2-5)</sub> / -0,88 б* и 86,5 %*	84	5,41 $\pm$ 0,11 б <sup>■</sup> <sub>(2-6)</sub> / -1,11 б* и 83,0 %*	46	6,02 $\pm$ 0,13 б <sup>■</sup> <sub>(2)</sub> / -0,51* б и 92,2 %	+0,61 б <sup>♂♀</sup> / +11,3 % <sup>♂♀</sup>
10	8-17	87	5,59 $\pm$ 0,11 б <sup>■</sup> <sub>(2-6)</sub> / -0,93 б* и 85,7 %*	57	5,33 $\pm$ 0,13 б <sup>■</sup> <sub>(2-6)</sub> / -1,19 б* и 81,7 %*	30	6,04 $\pm$ 0,16 б <sup>■</sup> <sub>(2)</sub> / -0,49* б и 92,5 %	+0,71 б <sup>♂♀</sup> / +13,3 % <sup>♂♀</sup>

*Примечания:* № п/п — номер группы обследуемых (трезвенников /1/ и УАН /2–10/) по порядку; n — число молодых людей в группах от 1-й до 10-й (девушки + юноши /Д+Ю/), и подгруппах (только Д или только Ю); \* — достоверность различий ( $p < 0,05$ ) СБУ трезвенников (Д+Ю, Д или Ю) от студентов УАН (соответственно: Д+Ю, Д или Ю), имеющих по шкале теста «AUDIT» 1 и более баллов; <sup>♂♀</sup> — достоверность различий ( $p < 0,05$ ) между СБУ девушек и юношей УАН своей группы 2, 3, 4 и далее № п/п (по результатам шкалы теста «AUDIT»). ■ — достоверность различий ( $p < 0,05$ ) СБУ между студентами разных групп УАН с различным баллом шкалы теста «AUDIT» в соответствующих подгруппах между Д+Ю, только Д или только Ю.

Полученные результаты (см. табл. 1 и 2) подтверждают актуальность утвержденных мероприятий «Государственной программы национальных действий по предупреждению и преодолению пьянства и алкоголизма на 2016–2020 годы» [6] по разработке безалкогольных сценариев-обрядов проведения основных наиболее распространенных торжеств (свадьба, день рождения, поминки и пр.), праздников (Новый год, Рождество, Пасха, Дажынки, День города и др.) с последующим введением данного направления в план подготовки и повышения квалификации специалистов учреждений культуры, а также с пожеланием к служителям христианских церквей изменить часть процедур с использованием алкогольных напитков в исторически сложившихся ритуалах.

УАН у большинства студентов приводит к снижению их академической успеваемости (табл. 3). Особенно выражено это негативное влияние этанола на молодых женщин, СБУ которых прогрессивно и достоверно понижался по мере нарастания алкогольных проблем и повышении балла теста «AUDIT» более 1. У студенток, набравших по тесту «AUDIT»

4 и более баллов СБУ, становился достоверно ниже аналогичного показателя в группах студентов УАН, что подтверждает существующие представления о меньшей устойчивости женщин по отношению к токсическим эффектам алкоголя по сравнению с мужчинами [14]. Известен так называемый телескопический эффект, который заключается в более высоком уровне алкогольных проблем у женщин при более низком уровне потребления алкоголя [15], который в нашем случае проявлялся большим снижением СБУ студенток УАН по сравнению со студентами.

Гендерный (межполовой) градиент, например, «употребление алкоголя с вредными последствиями» хорошо описан в отечественной и зарубежной медицинской литературе и составляет у взрослых людей в трудоспособном возрасте около 1:4 (женщин : мужчин), а у несовершеннолетних 1:2,2 [11, 12]. В нашем исследовании данный показатель составил 1:1,70. Таким образом, у студентов имеет место наиболее низкий межполовой градиент среди потребителей алкоголя с вредными последствиями, что может косвенно указывать на растущую вовлеченность в алкоголизацию девушек.

**Выводы.** Распространенность трезвого образа жизни среди белорусских студентов была в 4,99 раза ( $\chi^2 = 139,8$ ;  $p < 0,000$ ) реже по сравнению с иностранными учащимися, что обусловлено отличиями вероисповедания и национальных традиций. Наибольшая распространенность употребления алкоголя имеется среди молодых христиан, что указывает на необходимость модификации сценариев-обрядов проведения основных наиболее распространенных торжеств путем снижения процедур с использованием алкогольных напитков в исторически сложившихся ритуалах Беларуси.

1. Установлено резкое снижение межполового градиента распространенности опасного и вредного режимов употребления алкоголя белорусскими студентками и студентами младших курсов до 1:1,70, что указывает на существенный рост алкогольных проблем у молодых женщин Беларуси.

2. Выявлено более выраженное негативное влияние этанола на девушек, СБУ которых прогрессивно и достоверно понижался по мере нарастания алкогольных проблем и повышении балла теста «AUDIT» у них по сравнению с юношами.

3. Растущая вовлеченность в алкоголизацию девушек требует адресных мер профилактики, включающих предоставление информации о повышенном риске развития связанных с алкоголем проблем у них и пропаганду здорового образа жизни среди молодежи.

### Список литературы

1. Алкоголизм: руководство для врачей / под ред. Н.Н. Иванца, М.А. Винниковой. — М.: МИА, 2011. — 856 с
2. Власенко, В.И. Психофизиология: методологические принципы профессионального психологического отбора: монография / В.И. Власенко; под ред. В.А. Переверзева. — Минск, 2005. — С. 53–57, 75–79, 110–112.
3. Гендерные различия потребления алкоголя студентами-медиками / М.О. Вэлком [и др.] // *Здравоохранение*. — 2013. — № 7. — С. 26–34.
4. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Медицина, 1999. — 460 с.
5. Глобальная стратегия сокращения вредного употребления алкоголя / ВОЗ. — Женева, Швейцария, 2010. — 40 с.
6. Государственная программа национальных действий по предупреждению и преодолению пьянства и алкоголизма на 2016–2020 годы // 2017 — Режим доступа : <http://minzdrav.gov.by/ru/ministerstvo/gosudarstvennye-programmy/index.php/>. — Дата доступа: 22.07.2020.
7. Зайцев, В.М. Прикладная медицинская статистика : учеб. пособие. — 2-е изд. / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И. Маринкин. — СПб.: Фолиант, 2006. — 432 с.

8. Институт социологии Национальной академии наук Беларуси. 2017 — Режим доступа: <http://socio.bas-net.by/informatsiya/>; <https://www.belta.by/society/view/bole-treti-belorusov-vedut-absolutno-trezvyj-obraz-zhizni-issledovanie-251521-2017/>. — Дата доступа: 07.05.2020.
9. Кабанов, М.М. Методы психологической диагностики и коррекции в клинике / М.М. Кабанов, А.Е. Личко, В.М. Смирнов. — Л.: Медицина, 1983. — 310 с.
10. Национальный статистический комитет Республики Беларусь. — 2018. — Режим доступа: <https://www.belstat.gov.by/ofitsialnaya-statistika/bazy-dannyh/>. — Дата доступа: 22.07.2020.
11. Разводовский, Ю.Е. Алкоголизация женщин как атрибут современного общества / Ю.Е. Разводовский // Собириология. — 2018. — № 2. — С. 67–70.
12. Гендерный градиент эпидемиологических параметров алкогольной зависимости / Ю.Е. Разводовский [и др.] (в печати).
13. AUDIT : the Alcohol Use Disorders Identification Test : guidelines for use in primary health care(second edition) 18 November 2019 — Mode of access : [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67205/WHO\\_MSD\\_MSB\\_01.6a.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67205/WHO_MSD_MSB_01.6a.pdf?sequence=1&isAllowed=y). — Date of access: 13.05.2020.
14. Nolen-Hoeksema, S. Gender differences in risk factors and consequences for alcohol use and problems. / S. Nolen-Hoeksema // Clin Psychol Rev. — 2004. — Vol. 24. — P. 981–1010.
15. Gender differences in alcohol consumption and adverse drinking consequences: Cross-cultural patterns. / R.W. Wilsnack [et al.] // Addiction. — 2000. — Vol. 95. — P. 251–265.
16. Gender specific trends in alcohol use: cross-cultural comparisons from 1998 to 2006 in 24 countries and regions. / B.G. Simons-Morton [et al.] // Int J Public Health. — 2009. — Vol. 54, № 2. — P. 199–208.

## **PREVALENCE OF ALCOHOL DISUSE AND USE AMONG MEDICAL STUDENTS OF DIFFERENT GENDERS OF JUNIOR COURSES: RELATIONSHIP WITH THEIR ACADEMIC PERFORMANCE**

---

*Pereverzev V.A.<sup>1</sup>, Blazhko A.S.<sup>1</sup>, Evseev A.V.<sup>2</sup>, Velkom M.O.<sup>3</sup>, Razvodovsky Yu.E.<sup>4</sup>, Alexandrov D.A.<sup>1</sup>, Nikitina O.S.<sup>1</sup>, Pereverzeva E.V.<sup>1</sup>, Pazharytski A.M.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Belarusian State Medical University,  
Minsk, Republic of Belarus;*

<sup>2</sup>*Smolensk State Medical University,  
Smolensk, Russia;*

<sup>3</sup>*Nile University of Nigeria,  
Abuja, Nigeria;*

<sup>4</sup>*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the NAS of Belarus,  
Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *Among Belarusian students, the prevalence of a sober lifestyle is several times lower compared to foreign students, which indicates the need to modify the behavioral traditions of young Belarusians. Our observations and calculations point to the widespread use of alcohol by young people in Belarus and the resulting increase in alcohol problems, especially in young women, which is shown by a significant decrease in their academic performance in comparison with both teetotal students and young men who use alcoholic beverages.*

## РОЛЬ КАТАБОЛИТОВ ВИТАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕАБОЛИЗМА

*Петров С.А., Андриевский А.М., Федорко Н.Л., Чернадчук С.С.,  
Сорокин А.В., Будняк А.К., Ягунова Ю.В., Таранец Л.Д.*

*Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,  
г. Одесса, Украина*

**Резюме.** Изучали действие витаминов и некоторых их метаболитов на активность отдельных ферментов *invivo* и *invitro*. Показано наличие некоферментных функций в отношении кофермент-независимых ферментов у витаминов и их производных, таких как В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и В<sub>6</sub>. Наиболее показательны некоферментные функции проявляются у катаболитов тиамин.

**Введение.** Современная витаминология существенно расширила горизонты знаний о функциях витаминов и роли их катаболитов в регуляции различных процессов в организме [4, 6, 7]. Благодаря многочисленным исследованиям стало известно, что так называемые коферментные витамины обладают не единственной функцией, определяемой их превращением в коферменты. Они способны в неизменном виде регулировать целый ряд биохимических процессов. Кроме того, метаболиты многих из них, считавшиеся ранее биохимически неактивными, способны проявлять регуляторные свойства [8, 9, 12].

В этой работе мы попытались привести результаты лишь небольшой части данных, полученных в нашей лаборатории, относительно некоферментного действия витаминов и некоторых их метаболитов на активность отдельных ферментов.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты проведены на белых беспородных крысах массой 180–220 г и на очищенных ферментах. В работе использовали следующие методы: активность каталазы определяли по способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм [3]; активность алкогольдегидрогеназы определяли по ее способности катализировать две последовательные реакции: НАД-зависимое окисление бутанола и восстановление п-нитрозодиметиланилина с участием НАД·Н<sub>2</sub>, образовавшимся в ходе первой реакции. При этом п-нитрозодиметиланилин, имеющий в растворе интенсивно желтую окраску, обесцвечивается. Об активности алкогольдегидрогеназы судили по уменьшению светопоглощения красителя, которое регистрировали на спектрофотометре при 440 нм [10]; активность пепсина определяли по методу Ансона и Мирского [5] с использованием 1 % гемоглобина с дальнейшим определением пептидных продуктов реакции методом Лоури; активность трипсина определяли по методике, изложенной в работе [1] с использованием специфического хромогенного субстрата бензоиларгинин-п-нитроанилида (БАПНА). Относительную активность фермента выражали в миллиединицах (мЕ), отнесенных к 1 мл раствора трипсина.

Концентрация витаминов и их производных в инкубационной среде, используемой для определения активности трипсина составляла: 1) биотин — 0,14 мкМ (разведение в 1000 раз), 1,4 мкМ (разведение в 100 раз), 14 мкМ (разведение в 10 раз), 140 мкМ (ис-

ходный раствор); 2) пиридоксаль — 0,16 мкМ (разведение в 1000 раз), 1,6 мкМ (разведение в 100 раз), 16 мкМ (разведение в 10 раз), 160 мкМ (исходный раствор); 3) пиридоксаль-5-фосфат (ПАЛФ) — 0,125 мкМ (разведение в 1000 раз), 1,25 мкМ (разведение в 100 раз), 12,5 мкМ (разведение в 10 раз), 125 мкМ (исходный раствор). Время инкубации составляло 60 мин.

Концентрация витаминов и их производных в инкубационной среде, используемой для определения активности пепсина, а именно: тиамин, 4-метил-5-β-оксиэтилтиазола, тиаминпирофосфата (ТПФ) и тиохрома были такими (мкМ): 1,0, 2,0, 3,0, 6,0, 9,0.

Для определения активности алкогольдегидрогеназы концентрации витаминов и их производных в инкубационной среде составляли для тиамин, 4-метил-5-β-оксиэтилтиазола, тиаминмонофосфата (ТМФ), тиаминпирофосфата (ТПФ) и тиохрома 1 мкМ (конечные концентрации).

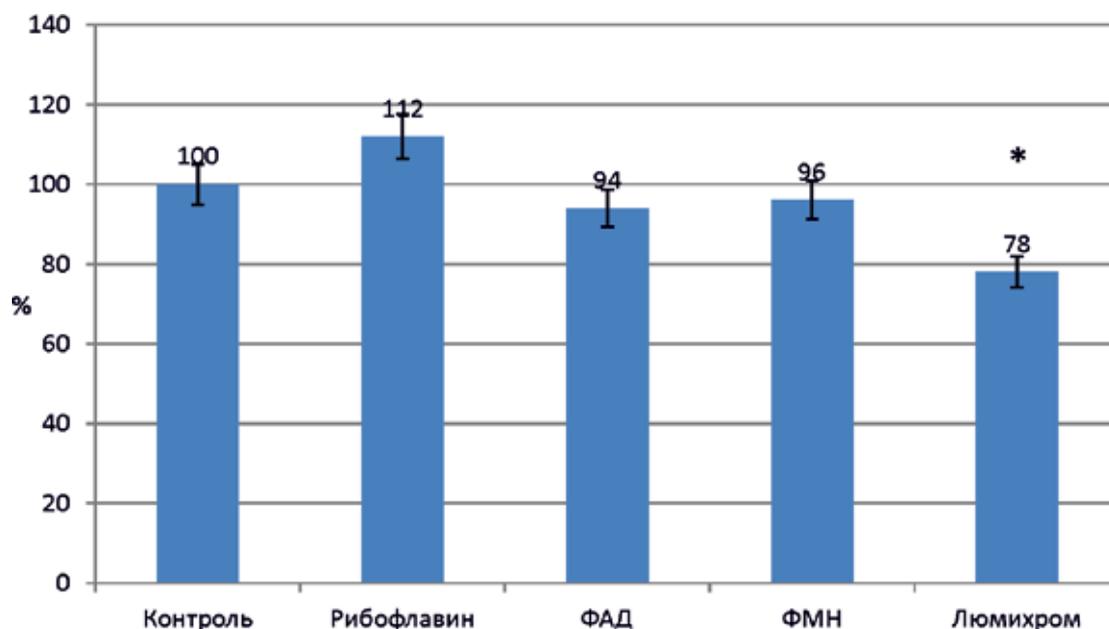
При определении активности каталазы рибофлавин и его метаболиты: ФАД, ФМН, ЛХ вводили в терапевтической дозе исходя из соотношения их в мозге. Препараты вводили крысам внутримышечно в объеме 0,2 мл на 200 г веса в следующих концентрациях: рибофлавин — 0,22 мг, ФАД — 1,2 мг, ФМН — 0,2 мг, ЛХ — 0,02 мг.

Все процедуры с животными выполнены в строгом соответствии с Европейской конвенции «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» [11].

Данные обработаны статистически по [2].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Полученные данные приведены на рисунках и таблицах.

На рис. 1 представлена активность каталазы в коре головного мозга после введения рибофлавина и его метаболитов.



**Рисунок 1 — Влияние рибофлавина, ФАД, ФМН и люмихрома на активность каталазы в коре головного мозга, % от контроля, принятого за 100 % (n = 5):**

\* тут и далее достоверно по отношению к контролю ( $p \leq 0,05$ )

Как видно из данных, приведенных на рис. 1, ни рибофлавин, ни его коферменты не оказывали влияние на активность каталазы в коре головного мозга. В то же время катаболит рибофлавина — люмихром — снижал этот показатель на 22%.

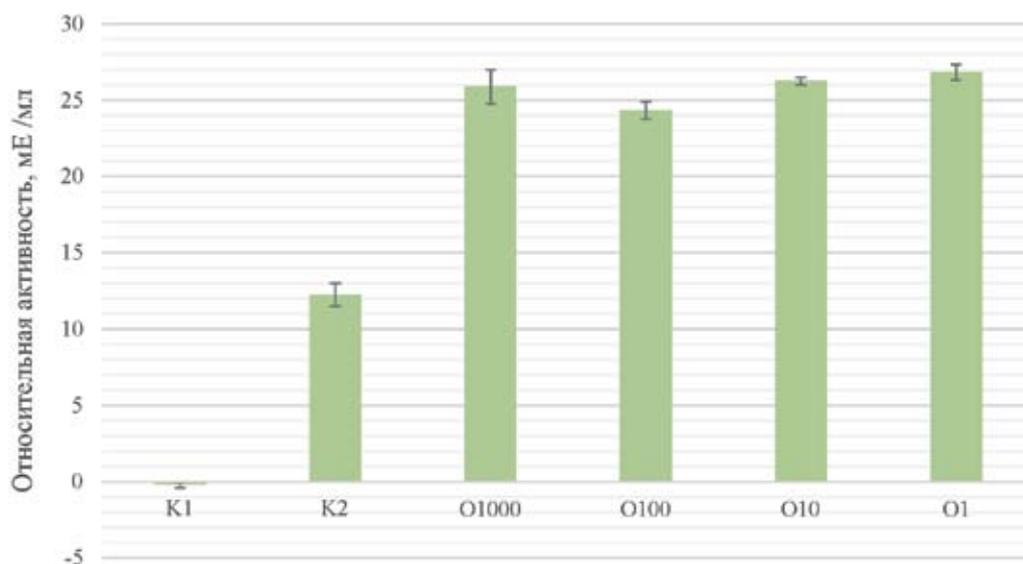
При исследовании влияния тиамин и его метаболитов на активность пепсина (табл.) установлено, что ни тиамин, ни продукт его тиаминазного расщепления 4-метил-5-β-оксиэтилтиазол не влияли на активность пепсина. В то же время ТПФ в высоких концентрациях, превышающих физиологические, снижал активность исследуемого фермента, а тиохром даже в низких концентрациях повышал его активность.

**Таблица — Влияние тиамин и его метаболитов на активность очищенного препарата пепсина (мг образовавшихся пептидов/г белка), (n = 5)**

Концентрация метаболитов (мкМ)	Контроль	Тиамин	4-метил-5-β-оксиэтилтиазол	Тиаминпирофосфат	Тиохром
1,0	2,05	2,11	2,00	2,11	2,40*
2,0	2,05	2,10	2,06	2,10	2,92*
3,0	2,05	2,10	2,20	1,75*	2,98*
6,0	2,05	2,00	2,28	1,50*	3,04*
9,0	2,05	2,00	2,58	1,42*	—

\* достоверно по отношению к контролю ( $p \leq 0,05$ ).

В следующих экспериментах мы изучили воздействие биотина, пиридоксаль и пиридоксальфосфата на активность очищенного препарата трипсина. Как видно из рис. 2, биотин во всех исследованных концентрациях более чем в два раза повышал активность трипсина.

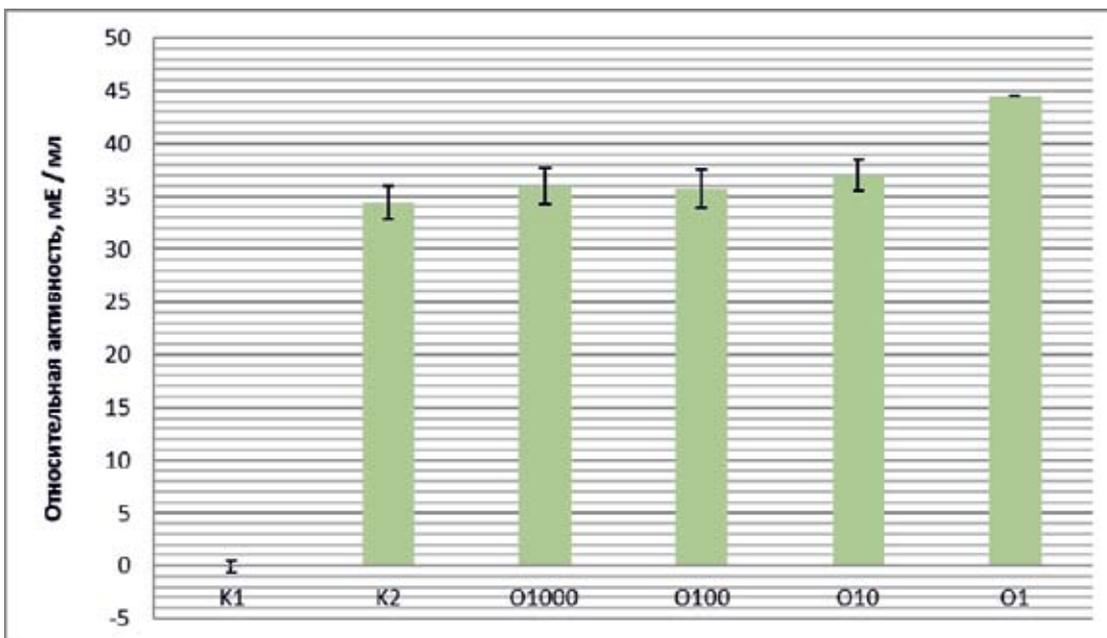


**Рисунок 2 — Влияние биотина на проявление активности очищенного препарата трипсина:**

K<sub>1</sub> — контрольная проба с биотином в исходной концентрации; K<sub>2</sub> — контрольная проба с трипсином; O<sub>1000</sub> — опытная проба с биотином в разведении в 1000 раз; O<sub>100</sub> — опытная проба с биотином в разведении в 100 раз; O<sub>10</sub> — опытная проба с биотином в разведении в 10 раз; O<sub>1</sub> — опытная проба с биотином в исходной концентрации

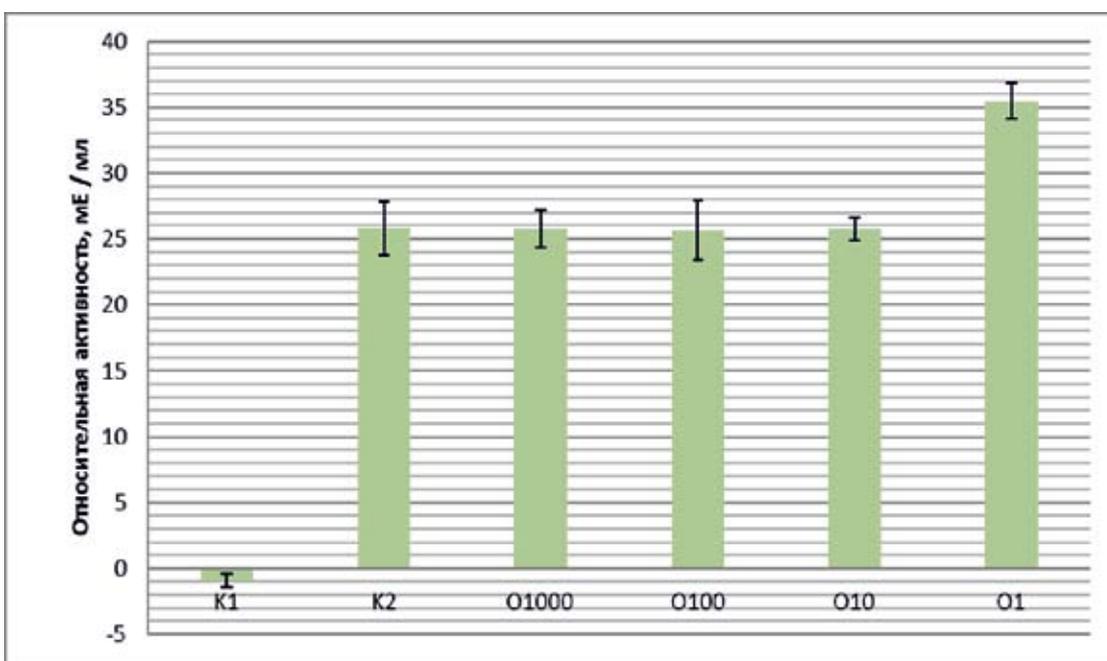
Пиридоксаль, как и пиридоксальфосфат (рис. 3–4), также повышал активность трипсина. Однако данный эффект был значительно слабее, чем в случае применения биотина.

В эксперименте по изучению влияния тиамин и его метаболитов (рис. 5) на активность очищенной алкогольдегидрогеназы было установлено, что тиамин, 4-метил-5-β-оксиэтилтиазол, ТМФ и ТПФ существенно активируют алкогольдегидрогеназу, а тиохром снижает ее активность почти вдвое.



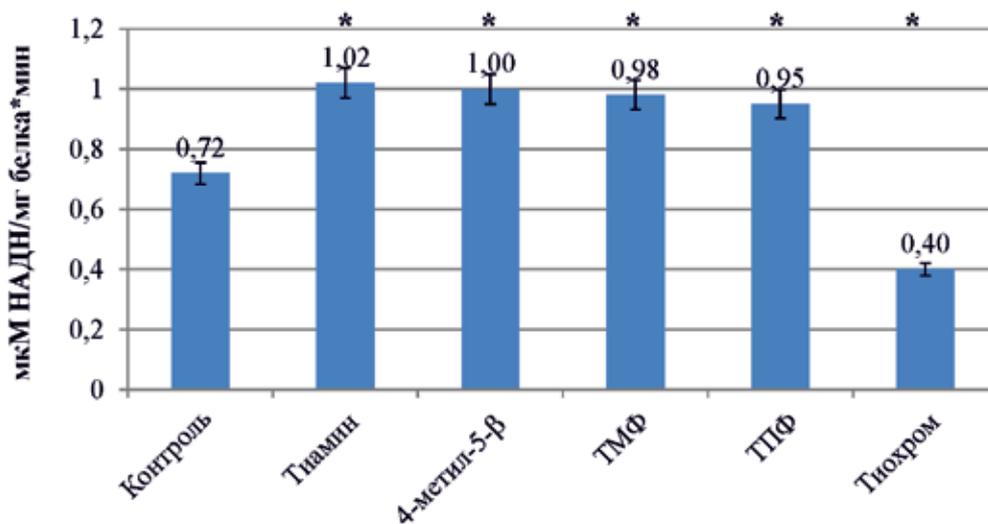
**Рисунок 3 — Влияние пиридоксала на проявление активности очищенного препарата трипсина:**

$K_1$  — контрольная проба с пиридоксалем в исходной концентрации;  $K_2$  — контрольная проба с трипсином;  $O_{1000}$  — опытная проба с пиридоксалем в разведении в 1000 раз;  $O_{100}$  — опытная проба с пиридоксалем в разведении в 100 раз;  $O_{10}$  — опытная проба с пиридоксалем в разведении в 10 раз;  $O_1$  — опытная проба с пиридоксалем в исходной концентрации



**Рисунок 4 — Влияние пиридоксаль-5-фосфата на проявление активности очищенного препарата трипсина:**

$K_1$  — контрольная проба с пиридоксаль-5-фосфатом в исходной концентрации;  $K_2$  — контрольная проба с трипсином;  $O_{1000}$  — опытная проба с пиридоксаль-5-фосфатом в разведении в 1000 раз;  $O_{100}$  — опытная проба с пиридоксаль-5-фосфатом в разведении в 100 раз;  $O_{10}$  — опытная проба с пиридоксаль-5-фосфатом в разведении в 10 раз;  $O_1$  — опытная проба с пиридоксаль-5-фосфатом в исходной концентрации



**Рисунок 5 — Влияние тиамина и его метаболитов на активность очищенной алкоголь-дегидрогеназы, мкМ НАДН/мг белка\*мин (n = 5)**

**Заключение.** Таким образом, все приведенные исследования свидетельствуют, что некоферментные функции присущи как витаминам, так и коферментам — (ПАЛФ) и катаболитам витаминов.

Среди всех исследованных нами витаминов наиболее рельефно проявляются некоферментные функции у катаболитов тиамина.

В большинстве случаев некоферментные функции проявляются у витаминов и их метаболитов, имеющих в своей структуре сопряженные два или три азотсодержащих гетероцикла. Такие соединения обычно связываются с различными белками либо за счет гидрофобных взаимодействий, либо через гетероатом азота.

Возможно, такое связывание является одной из причин некоферментного действия таких витаминов или их метаболитов на активность ферментов.

### Список литературы

1. Влияние пантотеновой кислоты и её метаболитов на проявление активности трипсина / А.М. Андриевский [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии: сб. науч. тр. — Вып. 3. — Минск: ИВЦ Минфина, 2019. — С. 121–125.
2. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
3. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
4. Вітамінологія: підручник / С.А. Петров [и др.]: під. наук. ред. докт. біол. наук, проф. С.А. Петрова. — Одеса: ВМВ, 2013. — 228 с.
5. Anson, M. L. The estimation of pepsin with hemoglobin / M.L. Anson, A.E. Mirsky // J. Gen. Physiol. — 1932. — Vol. 16, № 1. — P. 59–67.
6. Gerald, F. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health, Fifth Edition / F. Gerald. — Academic Press, — 2017. — 628 p.
7. Parkhomenko, I.M. Oxidized derivatives of thiamine: formation, properties, biological role / I.M. Parkhomenko // Ukrain's'kyi biokhimichnyi zhurnal. — 84. — P. 5–24.
8. Petrov, S.A., Vitabolonica. New Direction In The Vitaminology / S.A. Petrov [et al.] // J. Integrated OMICS. — Vol. 9, № 1 (2019). — P. 17–22.

9. Administration of Thiamine and Thiochrome Enhanced Reproduction of *Chlorella*, *Drosophila melanogaster*, and *Danio* / S.A. Petrov [et al.] // *J. Nutr. Sci. Vitaminol* (Tokyo). — 2016. — Vol. 62, № 1. — P. 6–11.

10. Sensitive photometric assay for alcohol dehydrogenase activity in blood / L. Skursky [et al.] // *Serum analyt. biochem.* — 1979. — Vol. 99. — P. 65–71.

11. The European Parliament and of the Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. Official Journal of the European Union. — L. 276:33–79.

12. Yakimenko, V.E. Thiochrome Activates DNA-Polymerase / V.E. Yakimenko [et al.] // *J. Integrated OMICS.* — 2019. — Vol 9, № 1. — P. 39–43.

## ROLE OF VITAMIN CATABOLITES IN REGULATION OF CELLULAR METABOLISM

---

*Petrov S.A., Andriyevsky A.M., Fedorko N.L., Chernadchuk S.S.,  
Sorokin A.V., Budnyak A.K., Yagupova Yu.V., Taranets L.D.*

*I.I. Mechnikov Odessa National University,  
Odessa, Ukraine*

**Summary.** *We studied the effect of vitamins and some of their metabolites on the activity of individual enzymes in vivo and in vitro. Non-coenzyme functions for coenzyme-independent enzymes in vitamins and their derivatives, such as B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub>, have been shown. The most revealing non-coenzyme functions are manifested in thiamine catabolites.*

## МЕТОДИКА ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИПИДСОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И ЗНАЧИМОСТЬ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ЭЯКУЛЯТА МУЖЧИН С НАРУШЕНИЕМ ФЕРТИЛЬНОСТИ

*Пехтерева Н.В.*

*Государственное учреждение образования  
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** В статье приводится информация о новой, оригинальной методике оценки защитных, антиоксидантных свойств липидсодержащих структур биологических жидкостей на фоне воздействия на них фактора инициации оксидативного стресса — коротковолнового монохроматического светового излучения — по степени изменения активности фосфолипазы А<sub>2</sub>, а также о значимости использования разработанной методики для углубленной диагностики нарушений фертильной функции у мужчин репродуктивного возраста.

**Введение.** По мнению ряда исследователей [5, 6], широко используемые в настоящее время методы оценки про-/антиоксидантного статуса биологических жидкостей и тканей не отражают в должной мере потенциальные возможности системы к осуществлению ею защитного, антиоксидантного эффекта. Выраженность этой защитной, антиоксидантной реакции целесообразно оценивать с использованием тестов, показатели которых отражают характерный «отклик» поврежденных структур (липидов мембран, компонентов биологических жидкостей) в ответ на влияние факторов, создающих оксидативный стресс.

Принцип такого методологического подхода базируется на представлении о том, что эффект воздействия факторов, способных инициировать в биологических жидкостях и клеточных элементах тканей свободно-радикальное окисление (СРО) липидов, во многом зависит от исходной антиокислительной активности способности биологических объектов, определяемой комплексом факторов — как биохимических, так и биофизических (физико-химических), связанных с особенностями состава и структурно-функциональными свойствами липидов мембран и других липидно-белковых комплексов.

В случае ослабления антиоксидантной защиты биологических структур создаются благоприятные условия для окисления входящих в состав фосфолипидов полиненасыщенных жирных кислот с образованием ацилгидроперекисей, обладающих достаточно выраженной гидрофильностью. В результате этого происходит «разрыхление» мембран и в ее участках появляются очаги повышенной проницаемости для содержимого клеток, что приводит к синдрому цитолиза.

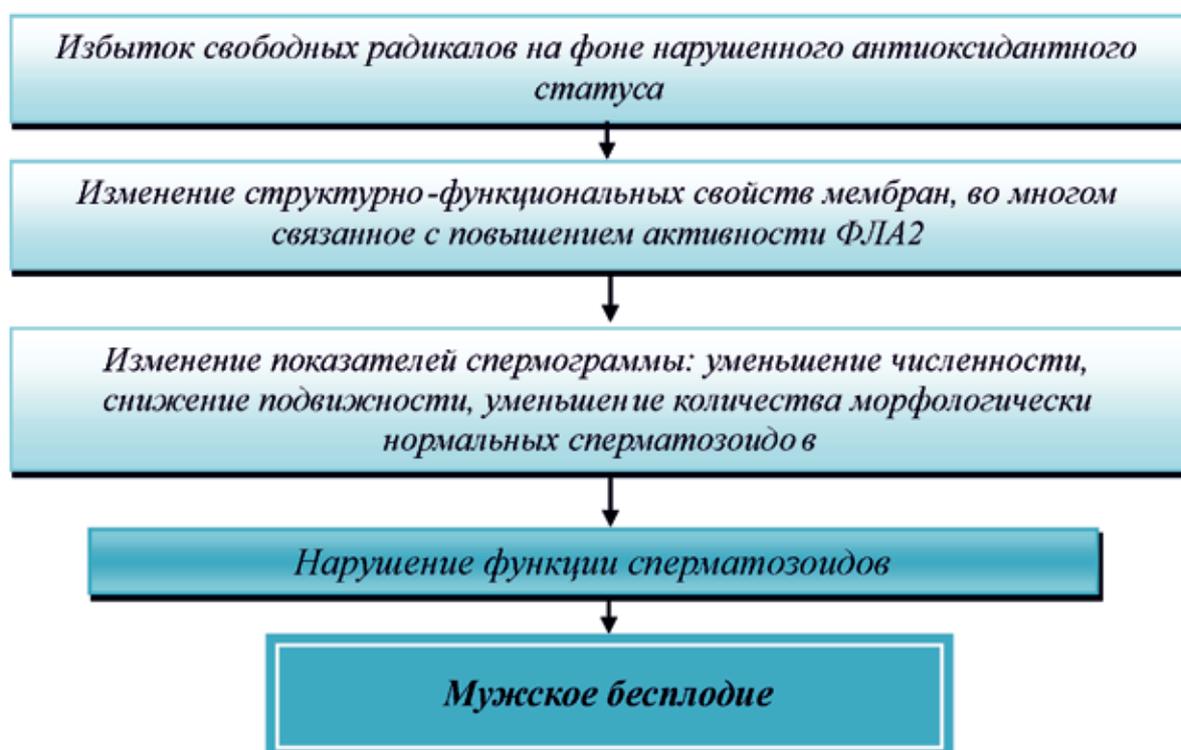
Поскольку окисленные фосфолипиды являются наилучшим субстратом для фосфолипазы А<sub>2</sub>, активность ее значительно повышается, что приводит как к удалению окисленных фосфолипидов из мембран, так и к образованию большого количества биологически активных соединений — лизофосфатидилхолинов (лизоФХ) и окисленных полиненасыщенных жирных кислот. ЛизоФХ (провоспалительные липиды), будучи детергентами, еще более нарушают структурно-функциональные свойства мембраны, стимулируя образование активных форм кислорода, вызывающих окисление остатков жирных кислот фосфолипидов. При этом из мембраны исчезают

легкоокисляемые фосфолипиды (кефалины и др.), обуславливающие текучесть, малую вязкость клетки, в результате чего мембрана обогащается насыщенными, малоподвижными фосфолипидами и существенно меняет свои биофизические свойства. К тому же изменяется липидное окружение рецепторов (аденилатциклазы), воспринимающих сигналы со стороны гормонов белковой природы.

Другой продукт ферментативного гидролиза молекулы фосфолипида — свободная полиненасыщенная (обычно арахидоновая) кислота превращается под влиянием циклооксигеназы в тромбоксан и простагландины, а с участием липооксигеназы — в лейкотриены и липоксины — продукты, оказывающие существенное влияние на процессы метаболизма в клетке.

Все это не может не сказаться негативно на структуре и функции мембран сперматозоидов и находящихся в них органелл (прежде всего митохондрий) [7, 10].

С учетом характера влияния оксидативного стресса на состояние мембран, патогенез развития мужского бесплодия может быть представлен следующей схемой (рис. 1).



**Рисунок 1 — Механизм влияния факторов оксидативного стресса на фертильные свойства эякулята**

По данным ВОЗ, в настоящий период времени 10–20 % супружеских пар страдают от бесплодия и приблизительно в половине случаев причиной являются нарушения фертильности мужчин [1, 2].

Одним из многочисленных факторов, обуславливающих это нарушение, может быть влияние на репродуктивные органы состояния оксидативного стресса, сопровождаемого нарушением «равновесия» между про- и антиоксидантной активностью биологических жидкостей и тканей — чаще всего вследствие ослабления антиоксидантной защиты организма, что обращает внимание исследователей на целесообразность углубленного изучения патохимических изменений, происходящих в организме пациентов с нарушением фертильности [9, 11, 13].

В связи с этим были проведены исследования, направленные на создание новой методики оценки потенциальных возможностей липидной фазы биологических структур к проявлению ею антиоксидантной защиты по отношению к факторам инициации оксидативного стресса.

**Цель исследования** — разработать методику определения состояния защитной антиоксидантной способности липидсодержащих структур биологических жидкостей и апробировать ее на контингенте мужчин с нарушением репродуктивной функции.

**Материал и методы исследования.** Исследования проводились на базе Научно-исследовательской лаборатории и кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО в период 2018–2019 гг.

Биологическим материалом для исследования служили пробы эякулята 50 мужчин детородного возраста (средний возраст  $30,7 \pm 4,8$  года): 20 практически здоровых (пациенты-добровольцы, составившие контрольную группу) и 30 мужчин с нарушением репродуктивной функции, подтвержденной исследованием спермограммы.

Эякулят исследовали после полового воздержания продолжительностью от 2 до 7 суток. Получали путем мастурбации в специальном помещении в медицинском учреждении, располагающим необходимыми условиями для лабораторного (морфологического и биохимического) анализа. Эякулят собирали в специальный чистый контейнер с широким горлом из пластика или стекла. Контейнер с образцом доставляли в лабораторию в течение часа после сбора при температуре хранения  $+27\text{ }^{\circ}\text{C}$  —  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . При этом избегались резкие температурные перепады.

Лабораторные исследования эякулята проводили сразу же после доставки биологического материала в лабораторию. В случае необходимости выполнения отсроченных исследований пробы эякулята вносили в ряд пробирок (типа Эппендорфа), замораживали и хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , избегая повторного замораживания.

Определение активности фосфолипазы А<sub>2</sub> (ФЛА<sub>2</sub>) осуществлено с использованием гемопротеинового метода, реализуемого с применением выпускаемого на базе УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» набора реагентов «ФЛА<sub>2</sub>-ФОА». При этом из процедуры исследования был исключен первый, предварительный этап — инкубации в течение 45 мин при  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (который требуется лишь для определения активности термостабильной панкреатической ФЛА<sub>2</sub> в сыворотке крови, что достигается путем инактивирования прогреванием проб термолабильных представителей семейства фосфолипазы А<sub>2</sub>).

Определение общей антиоксидантной активности (ОАА) в сыворотке крови проводили с помощью набора реагентов «ОксиСтат» производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Для оценки состояния ОАА учитывались показатели оптической плотности стандартной и опытных проб.

О состоянии процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по содержанию продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов ДК<sub>233</sub> (методом ультрафиолетовой фотометрии) и малонового диальдегида (МДА) (методом, основанным на реакции образования окрашенных комплексов с тиобарбитуровой кислотой, при этом интенсивность окраски образованного комплекса измеряли при длине волны 540 нм на спектрофотометре «СОЛАР») [3, 4].

В дополнение к этим методам использовалась методика оценки антиоксидантного потенциала липидсодержащих структур биологических жидкостей, разработанная в ходе выполнения НИР «Клинико-лабораторное обоснование методологии исследования и оценки состояния защитных свойств биологических жидкостей при мембранной патологии» по заданию «Сопрежение превращения фосфолипидов с системами биохимической защиты при патологических состояниях организма» подпрограммы «Биологически активные вещества» программы ГПНИ «Химические технологии и материалы» (Государственный заказчик Национальная академия

наук Беларуси и Министерство образования Республики Беларусь, № госрегистрации 20164575, срок выполнения: 2 кв. 2016 г. — 4 кв. 2020 г.; организации-исполнители: ИБОХ НАН Беларуси; БГУ; БелМАПО; научные руководители: от ИБОХ НАН Беларуси — д-р хим. наук Литвинко Н.М., от БелМАПО — д-р мед. наук, профессор Камышников В.С.).

Принцип проводимого исследования заключается в параллельно осуществляемом определении активности ФЛА2 в двух пробах биологической жидкости (в данном исследовании — спермоплазмы), в одной из которых (опытной) устанавливается активность ФЛА2 после 15-минутного облучения (с целью инициации оксидативного стресса) монохроматическим световым потоком с длиной волны 423 нм. Такая же длина волны используется и для определения активности ФЛА2. Последнее обстоятельство, вместе с соблюдением условий проведения фотометрического исследования с использованием отечественного автоматизированного спектрофотометра РВ 2201 («СОЛАР», Беларусь), обладающего достаточно мощной импульсной ксеноновой лампой и позволяющего в стандартизованном режиме производить облучение монохроматическим световым потоком биологических объектов, кювет одного и того же типа и с соблюдением всегда постоянного расстояния между источником монохроматического светового излучения и расположением кюветы, что во многом обеспечивает высокую надежность получения результатов лабораторного исследования, упрощая его процедуру за счет исключения необходимости смены длины волны. На основании установления (с учетом данных контрольной пробы, не подвергнутой фотооблучению) «сдвига» в показателях активности фермента после фотооблучения реакционной смеси оценивается проявление защиты реакции липидной фазы анализируемого биологического объекта в ответ на воздействие фактора, инициирующего оксидативный стресс.

Морфологическое исследование спермоплазмы осуществлялось с применением традиционно используемых для этого методов анализа [4, 8, 12].

Для статистической обработки результатов исследования использовали пакеты приложений *Microsoft Office XP* и программы *Statistica* (версия 6.0).

**Результаты исследования и их обсуждение.** При анализе спермограмм мужчин с нарушением фертильности выявлены отклонения от нормы в составе и свойствах эякулята пациентов с нарушением фертильности: объем эякулята достоверно отличался от такового у представителей контрольной группы ( $p < 0,05$ ); консистенция спермы оказалась повышенной у половины (47,5 %) мужчин исследуемой группы, сниженной — у 5 %; слизь в эякуляте была обнаружена у 15 % мужчин; выявлено значительное уменьшение концентрации и общего количества сперматозоидов в эякуляте. В эякуляте мужчин исследуемой группы процент живых сперматозоидов был в 2 раза ниже, чем в контрольной группе, а также увеличено количество неподвижных и патологических форм сперматозоидов.

Результаты проведенных биохимических исследований спермоплазмы мужчин с нарушением фертильности и контрольной группы представлены в табл. 1.

**Таблица 1 — Результаты биохимических исследований в спермоплазме,  $X \pm Sx$**

Показатель	Контрольная группа, n = 20		Исследуемая группа, n = 30	
	до облучения	после облучения	до облучения	после облучения
ФЛА2, МЕ/л	13,74 ± 6,39	21,05 ± 9,35*	21,81 ± 7,27	28,4 ± 12,1
ОАА, ммоль/л	1,87 ± 0,27	2,80 ± 0,52	1,18 ± 0,46	1,31 ± 0,18
ДК <sub>233</sub> , усл.ед	1,85 ± 0,42	1,16 ± 0,29*	3,43 ± 0,98	1,96 ± 0,50*
МДА, кмоль/л	6,02 ± 1,94	5,50 ± 0,63	7,99 ± 2,14	6,80 ± 1,10

Примечание. \* —  $p < 0,05$ .

Полученные в ходе исследования результаты указывают на снижение антиоксидантной защиты в семенной плазме мужчин с нарушением фертильности, проявляющееся снижением общей антиоксидантной активности спермоплазмы и увеличением содержания в спермоплазме продуктов перекисного окисления липидов (ДК<sub>233</sub>, МДА). Окислительный стресс, вызванный световым облучением, приводит к изменению активности ФЛА2 в спермоплазме и к сдвигам в про-/антиоксидантном балансе. По степени изменения активности фосфолипазы А2 в ответ на оксидативный стресс оказывается возможным оценить подверженность спермоплазмы свободно-радикальному окислению, что влечет за собой уменьшение количества проводимых тестов по определению первичных, вторичных и конечных продуктов свободнорадикального окисления липидов, а также отдельных антиоксидантов.

В связи с чем есть необходимость продолжить исследования с использованием разработанной методики по выявлению степени проявления защитной реакции липидной фазы анализируемого биологического материала и его антиоксидантной «мощности» в зависимости от вида патоспермии у мужчин с нарушением фертильности.

**Заключение.** На основании изложенного выше можно сделать следующие выводы:

1) обоснована возможность использования набора реагентов «ФЛА2-ФОА» по новому назначению — для определения общей активности фосфолипазы А2 в биологических жидкостях, в частности в спермоплазме;

2) показано, что при нарушениях мужской фертильности имеют место параллельно происходящие сдвиги как в ответной реакции фосфолипазы А2 на фотооблучение, так и в характерном изменении уровня содержания продуктов перекисного окисления липидов и общей антиокислительной активности;

3) разработка дополнительных методов лабораторной диагностики нарушений мужского здоровья позволит не только приблизиться к пониманию патохимических аспектов бесплодия, но также поможет врачу-специалисту эффективнее контролировать и корректировать проводимое лечение.

### Список литературы

1. Божедомов, В.А. Мужской фактор бездетного брака — пути решения проблемы / В.А. Божедомов // Урология. — 2016. — № 1., S1. — С. 28–34.
2. Жебентяев, А.А. Современные методы диагностики и лечения мужского бесплодия / А.А. Жебентяев // Репродуктив. здоровье. Вост. Европа. — 2017. — Т. 7, № 3. — Материалы II Полес. урол. форума, Гомель, 7–8 июня 2018 г. — С. 444–447.
3. Камышников, В.С. Возможности применения и опыт использования отечественного автоматизированного биохимического фотометра нового поколения — РВ 2201 в практике выполнения рутинных и научных клинических лабораторных исследований / В.С. Камышников, Т.М. Юрага // Лабораторная диагностика. Восточная Европа : международ. науч.-практ. журнал. — 2017. — Т. 6, № 4 — С.590–595.
4. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований) / В.С. Камышников [и др.]; под общ. ред. В.С. Камышникова. — М.: МЕВ пресс-информ., 2015. — 720 с.
5. Литвинко, Н.М. Антиоксидантная способность биологической жидкости / Н.М. Литвинко, Д.О. Герловский, Л.А. Скоростецкая // Изобретатель. — 2016. — № 3. — С. 10–11.

6. Литвинко, Н.М. Фосфолипаза А2 ІВ — новый индикатор оценки про-антиоксидантного статуса организма / Н.М. Литвинко, Л.А. Скоростецкая, Д.О. Герловский // Доклады Национальной академии наук Беларуси. — 2017. — Т. 61, № 4. — С. 60–68.
7. Литвинко, Н.М. Эндогенные фосфолипазы А2. Структура и функция / Н.М. Литвинко, М.А. Кисель; под ред. Н.М. Литвинко. — Минск: Навука і тэхніка, 1991. — 270 с.
8. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека: пятое издание / пер. с англ. Н.П. Макарова. — М.: Капитал принт, 2012. — 291 с.
9. Смерницкий, А.М. Патогенетические аспекты эффективности антиоксидантной терапии при лечении пациентов с патоспермией / А.М. Смерницкий // Мужское и репродуктивное здоровье : сб. тезисов XV конгр. «Мужское здоровье», 25–27 апр. 2019 г. / гл. ред. А.А. Камалов. — 2019. — С. 120–121.
10. Способ определения общей антиоксидантной способности биологической жидкости с использованием липидной фазы : пат. ВУ 19670 / Н.М. Литвинко, Д.О. Герловский, Л.А. Скоростецкая. — опубл. 30.08.2012.
11. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa / R.J. Aitken [et al.] // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2016. — Vol. 28, № 1/2. — P. 1–10.
12. Guidelines on Male Infertility / A. Jungwirth [et al.] // EAU. — 2016. — 65 p.
13. Majzoub, A. Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate / F. Majzoub, A. Agarwal // *Arab. J. Urology*. — 2018. — № 16 (1). — P. 113–124.

---

---

**METHOD FOR EVALUATING THE ANTIOXIDANT POTENTIAL  
OF LIPID-CONTAINING STRUCTURES OF BIOLOGICAL FLUIDS  
AND THE SIGNIFICANCE OF ITS USE IN THE STUDY OF EJACULATE  
OF MEN WITH FERTILITY DISORDERS**

---

---

***Pekhtserava N.V.***

*State Educational Establishment  
«Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education»,  
Minsk, Republic of Belarus*

***Summary.** The article provides information about a new original method for evaluating the protective and antioxidant properties of lipid-containing structures of biological fluids on the exposure to the oxidative stress initiation factor — short-wave monochromatic light radiation- by the degree of change in the activity of phospholipase A2, as well as the significance of using the developed method for in-depth diagnostics of fertility disorders in men of reproductive age.*

## СТАБИЛЬНОСТЬ ДРЕВНИХ БЕЛКОВ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В ИХ УПОРЯДОЧЕННОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ

*Побойнев В.В.<sup>1</sup>, Хрусталёв В.В.<sup>1</sup>, Хрусталёва Т.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Институт физиологии НАН Беларуси»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** Самым стабильным классом белков является класс А/В. Суммарная доля гидрофобных аминокислотных остатков в варибельных, нестабильных и в абсолютно нестабильных областях белков класса А/В меньше, чем в тех же областях белков других классов. В нестабильных областях класса А/В выше частота встречаемости лейцина и глутаминовой кислоты и ниже доля гистидина по сравнению с теми же областями белков класса А+В. Нестабильность класса А+В можно объяснить его доменной организацией.

**Введение.** Проблема стабильности белков имеет огромное теоретическое значение с точки зрения установления механизма фолдинга и последующего функционирования белка. На сегодняшний день известны пять классов (альфа-спиральные, бета-структурные белки, белки классов А+В, А/В, небольшие белки) и четыре типа белков: глобулярные, фибриллярные, мембранные и внутренне неупорядоченные белки. К последним относятся как белки, которые не сворачиваются от N- до C-конца (IDPs), так и частично неупорядоченные белки (IDPRs), которые содержат, по меньшей мере, одну неструктурированную область. Неструктурированные белки (IDPs/IDPRs) широко распространены в природе. Об этом может свидетельствовать тот факт, что около 70 % 3D-структур из PDB имеют неструктурированные области [1]. На самом деле этот процент может быть еще выше, так как многие 3D-структуры представляют собой белковые комплексы с различными лигандами, связывание с которыми может способствовать приобретению определенной структуры неструктурированными областями [2]. Процесс кристаллизации также способствует приобретению неструктурированными областями белков какой-то конкретной 3D структуры.

Согласно одной из гипотез белок может находиться в одном из четырех состояний: структурированном (*ordered*), частично-структурированном (*molten globule-like*), неструктурированном (*extended-disordered*) [3] и в промежуточном состоянии, *premolten globules*, которое занимает положение между частично структурированным и неструктурированным состоянием белка [4]. Считается, что класс белков А/В является наиболее древним классом [5]. Поэтому, знание особенностей распределения аминокислотных остатков в нестабильных и изменчивых областях данного структурного класса и сравнение с классом А+В, схожего с классом А/В по содержанию различных элементов вторичной структуры, представляет большой фундаментальный интерес.

Кроме теоретической значимости, проблема нестабильности белков имеет и прикладные медицинские аспекты. Внутренне неупорядоченные белки широко ассоциированы с заболеваниями человека [6]. Заболевания, сопровождающиеся изменением вторичной и третичной структур белковых молекул и их последующей агрегацией, называются конформационными [7]. К последним относятся прионные заболевания человека, болезни Альцгеймера, Хантинг-

тона, Паркинсона [8], сахарный диабет второго типа [9], спиноцеребеллярная атаксия [10], деменция с тельцами Леви, мультисистемная атрофия [11]. С каждым годом увеличивается количество давно известных заболеваний, в патогенез которых вовлечены неструктурированные белки или белки, которые могут совершать структурные переходы.

**Цель работы** заключалась в определении аминокислотного состава нестабильных областей наиболее термодинамически стабильного класса белков — класса А/В [12].

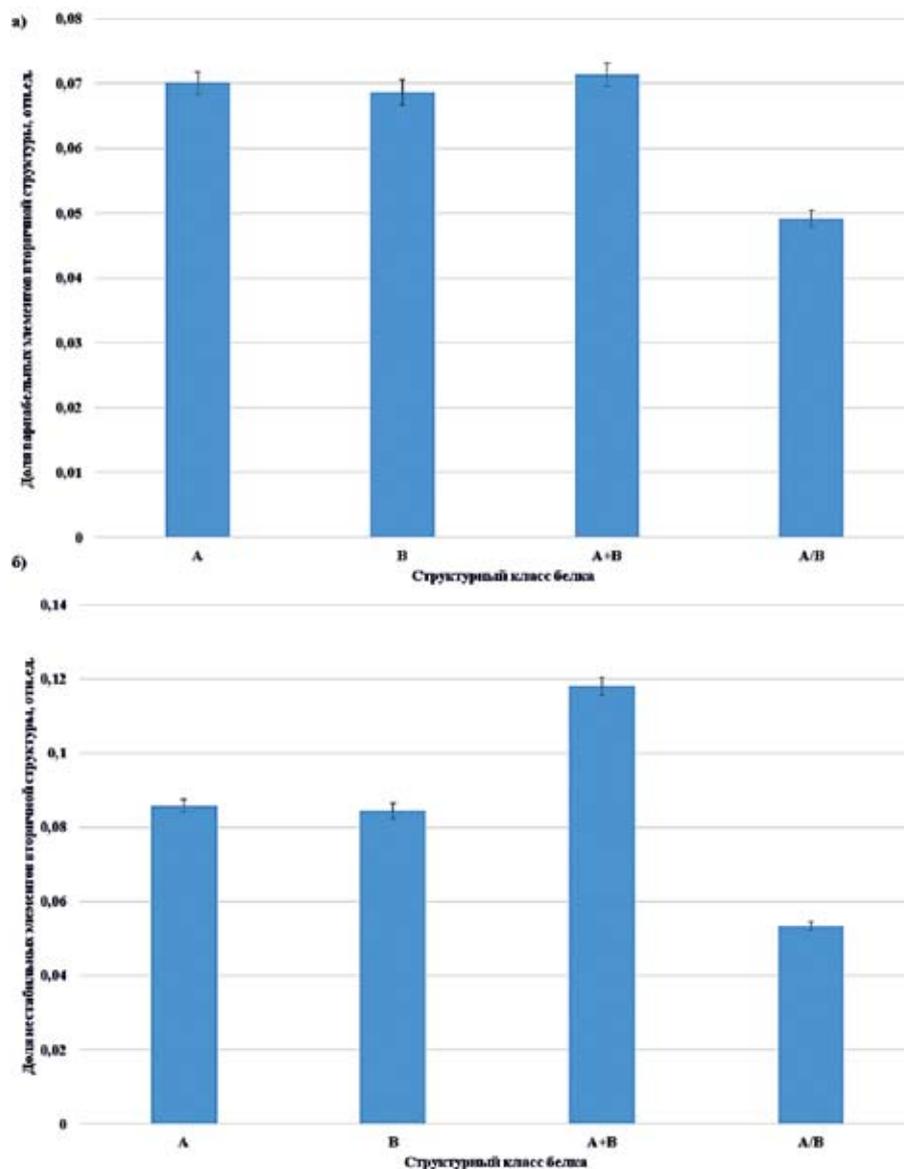
**Материалы и методы исследования.** Материалом для данной работы послужили выборки негомологичных белков четырех структурных классов: альфа-спиральные белки, бета-структурные белки, белки класса А+В и А/В. В каждую группу вошло 100 негомологичных белков, т. е. максимальный процент сходства между аминокислотными последовательностями внутри каждой группы составил 25 %. Гомологичность белков определяли с помощью алгоритма *Decrease Redundancy*.

Границы регулярных элементов вторичной структуры белков определяли с помощью алгоритма *DSSP (Dictionary of Secondary Structure of Proteins* — словарь вторичной структуры белка). Данный алгоритм на основании установленных критериев именно определяет, а не предсказывает по вероятностным шкалам границы того или иного элемента вторичной структуры. Для оценки границ структурной изменчивости и нестабильности мы применили следующий подход: сравнили вторичную структуру 2–5-аминокислотных последовательностей одного и того же белка. Таким образом, мы определили границы элементов вторичной структуры и внутренней неструктурированности белка. Если на всех 3D-структурах аминокислотный остаток принадлежит альфа-спиралям — мы обозначали его символом Н, если аминокислотный остаток на всех структурах входит в состав бета-тяжей — мы обозначали его символом Е, если аминокислотный остаток принадлежит петле — мы обозначали его символом С, если на одной структуре аминокислотный остаток входит в состав альфа-спирали, а на другой входит в состав петли, мы обозначали его как НС, если на одной структуре аминокислотный остаток входит в состав альфа-спирали, а на другой — в состав неструктурированного участка — мы обозначали его как Н0, если на одной структуре аминокислотный остаток входит в состав петли, а на другой — в состав неструктурированного участка — мы обозначали его как С0, если аминокислотный остаток на одной структуре входит в состав альфа-спирали, на другой — в состав петли, а на третьей — в состав неструктурированного участка, то мы обозначали его как НС0. Точно так же мы распределили аминокислотные остатки в группы: ЕС, Е0, НЕ, НЕС, ЕС0, НЕС0. Если же на всех 3D-структурах аминокислотный остаток входит в состав нестабильной области — мы обозначали его как «0». Под структурной изменчивостью мы понимаем ситуации типа НС, ЕС, НЕ, НЕС, а под структурной неустойчивостью (нестабильностью) — ситуации типа 0, Н0, Е0, С0, НС0, ЕС0, НЕ0, НЕС0.

Статистическую обработку проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Стабильность белков различных структурных классов можно объяснить не только с термодинамической точки зрения [12], но и изучив распределение аминокислотных остатков в соответствующих элементах вторичной структуры белков всех структурных классов. Доля изменчивых элементов вторичной структуры (НС, ЕС, НЕ, НЕС) и нестабильных элементов вторичной структуры (0, Н0, С0, Е0, НС0, ЕС0, НЕ0, НЕС0) в классе А/В намного ниже по сравнению с другими структурными классами белков (рис. 1).

Согласно шкале гидрофобности по Kyte и Doolittle к гидрофобным аминокислотным остаткам относятся: аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин и валин [13]. Доля данных аминокислотных остатков в стабильных областях (альфа-спиралях, бета-тяжах, петлях) белков класса А/В статистически больше, чем в бета-структурном классе и классе А+В.

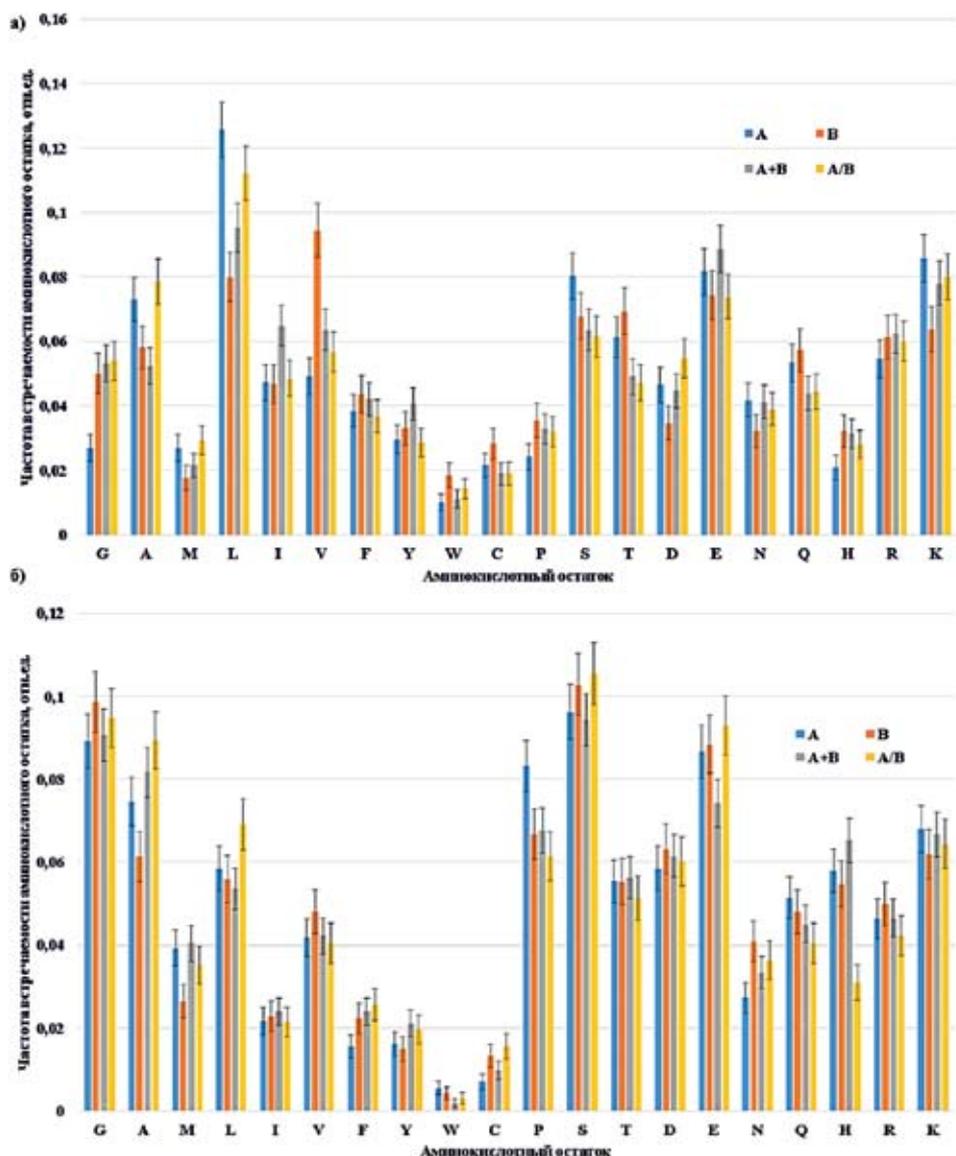


**Рисунок 1 — Изменчивость (а) и нестабильность (б) белков четырех структурных классов**

Суммарная доля гидрофобных аминокислотных остатков по Kyte и Doolittle в переменных элементах вторичной структуры следующая:  $2,677 \pm 0,111$  %;  $2,533 \pm 0,117$  %;  $2,560 \pm 0,108$  %;  $1,875 \pm 0,079$  % для альфа-спирального, бета-структурного класса, класса A+B и A/V соответственно, т. е. в переменных областях белков класса A/V меньше гидрофобных аминокислотных остатков, чем в других классах белков. Однако аланина больше по сравнению с бета-структурным классом и классом A+B, лейцина и метионина больше в сравнении с бета-структурным классом (рис. 2а).

Доля гидрофобных аминокислотных остатков по Kyte и Doolittle в нестабильных областях белков от всего количества аминокислотных остатков составила  $2,218 \pm 0,097$  %;  $2,111 \pm 0,102$  %;  $2,498 \pm 0,102$  %;  $1,584 \pm 0,070$  % для альфа-спирального, бета-структурного класса, класса A+B и A/V соответственно. Получается, что хотя класс белков A+B является самым нестабильным, однако в областях, которые являются структурно неупорядоченными, больше доля гидрофобных аминокислотных остатков, чем в соответствующих областях других белков, и наоборот, в самом стабильном классе белков, классе A/V, доля гидрофобных аминокислотных остатков в нестабильных областях меньше, чем в соответствующих классах других белков, т. е. особенность нестабильных фрагментов белков класса A/V обусловлена недораспределенностью гид-

рофобных аминокислотных, что подтверждается и расчетом частот встречаемости гидрофобных аминокислотных остатков в абсолютно нестабильных областях белков четырех структурных классов (в «0»):  $1,245 \pm 0,073$  %;  $1,198 \pm 0,078$  %;  $1,315 \pm 0,074$  %;  $0,805 \pm 0,050$  % для альфа-спирального, бета-структурного класса, класса A+B и A/B соответственно. Однако доля аланина в нестабильных областях класса A/B статистически выше, чем в таких же областях бета-структурного класса, лейцина выше в сравнении с классом A+B, а фенилаланина выше в сравнении с альфа-спиральным классом белков (рис. 2б). Частота встречаемости других гидрофобных аминокислотных остатков в нестабильных областях вторичной структуры статистически не отличается.



**Рисунок 2 — Распределение аминокислотных остатков в изменчивых (а) и нестабильных (б) элементах вторичной структуры белков различных структурных классов**

Интересно также отметить, что в нестабильных областях класса A/B частота встречаемости глутаминовой кислоты выше, чем в соответствующих областях класса A+B. Встречаемость глутаминовой кислоты статистически больше именно в центральной части белка, а не на N- и C-концах. Частота встречаемости гистидина в нестабильных областях статистически ниже в сравнении с другими классами белков (рис. 2б). Известно, что в неструктурированных областях белков понижена доля остатков гистидина [14].

В стабильных областях белков класса А/В больше гидрофобных аминокислотных остатков, по сравнению с альфа-спиральным классом и классом А+В. В результате такого распределения аминокислотных остатков белки класса А/В имеют более высокую склонность к приобретению глобулярной формы. В таком виде гидрофобное ядро белка имеет определенную вторичную и третичную структуры. В переменных (НС, ЕС, НЕ, НЕС), нестабильных (0, Н0, С0, Е0, НС0, ЕС0, НЕ0, НЕС0) и в абсолютно нестабильных (в «0») областях белков класса А/В статистически меньше гидрофобных аминокислотных остатков в сравнении с другими классами белков. В нестабильных и в абсолютно нестабильных областях белков класса А+В больше гидрофобных аминокислотных остатков, чем в классе А/В. В нестабильных областях белков класса А+В больше гидрофобных аминокислотных остатков, чем и в альфа-спиральном и бета-структурном классах.

**Заключение.** Наиболее нестабильным классом белков является класс А+В, а самым стабильным — класс А/В. Суммарная доля гидрофобных аминокислотных остатков в переменных, нестабильных и в абсолютно нестабильных областях белков класса А/В меньше, чем в тех же областях белков других классов. В нестабильных областях белков класса А/В выше частота встречаемости лейцина, глутаминовой кислоты и ниже доля гистидина по сравнению с теми же областями белков класса А+В. Нестабильность класса А+В можно объяснить не распределением аминокислотных остатков, так как в нестабильных и в абсолютно нестабильных областях белков класса А+В больше гидрофобных аминокислотных остатков, чем в классе А/В, а доменной организацией, при которой пассивные элементы вторичной структуры внутри каждого домена обретают конформацию благодаря взаимодействию с активными элементами. Белки класса А/В отличаются наиболее «контрастным» распределением гидрофобных остатков: в стабильных фрагментах частота их использования повышена, а в структурно изменчивых и нестабильных — снижена. Это свойство, напрямую связанное со способностью белков связывать лиганды и взаимодействовать с другими макромолекулами, унаследовано ими от древних полипептидов.

### Список литературы

1. Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence / Z. Obradovic [et al.] // *Proteins*. — 2003. — Vol. 53, № 6. — P. 566–72.
2. Dyson, H.J. Intrinsically unstructured proteins and their functions / H.J. Dyson, P.E. Wright // *J. Nat Rev Mol Cell Biol*. — 2005. — Vol. 6. — P. 197–208.
3. Dunker, A.K. The proteointrinity — linking function and disorder / A.K. Dunker, Z. Obradovic // *J. Nat. Biotechnol*. — 2001. — Vol. 19. — P. 805–806.
4. Uversky, V.N. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics / V.N. Uversky // *Protein Sci*. — 2002. — Vol. 11(4). — P. 739–56.
5. Garcia, A.K. How to resurrect ancestral proteins as proxies for ancient biogeochemistry / A.K. Garcia, B. Kacar // *J. Free Radical Biology and Medicine*. — 2019. — Vol. 140. — P. 260–269.
6. Uversky, V. N. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept / V.N. Uversky, C.J. Oldfield, A.K. Dunker // *Annu Rev Biophys*. — 2008. — Vol. 37. — P. 215–246.
7. Kopito, R.R. Conformational disease / R.R. Kopito, D. Ron // *J. Nat. Cell. Biol*. — 2000. — Vol. 2(11). — P. 207–9.
8. SCooperative structural transitions in amyloid-like aggregation / T. Steckmann [et al.] // *J. Chem. Phys*. — 2017. — Vol. 146, № 13.
9. Prion and prion-like diseases in animals / P. Aguilar-Calvo [et al.] // *Virus Res*. — 2015. — Vol. 207. — P. 82–93.

10. Paulson, H.L. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis) fold / H.L. Paulson // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 64, № 2. — P. 339–345.
11. McCann, H. A Synucleinopathy phenotypes / H. McCann // *Parkinsonism & Related Disorders.* — 2014. — Vol. 20, № 1. — P. 62–67.
12. Термодинамическая характеристика стабильности структуры белков четырёх классов / В.В. Побойнев [и др.] // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: тез. докл.* — 2018. — С. 34.
13. Kyte, J. A Simple Method for Displaying the Hydropathic character of protein / J. Kyte, R.F. Doolittle // *J. Mol. Biol.* — 1982. — Vol. 157. — P. 105–132.
14. Identifying disordered regions in proteins from amino acid sequences / P. Romero [et al.] // *IEEE International Conference on Neural Networks Houston, Texas, USA: IEEE Service Center.* — 1997. — P. 90–95.

## THE REASON FOR ANCIENT PROTEINS STABILITY IS IN THEIR ORDERED INSTABILITY

---

*Poboinev V.V.<sup>1</sup>, Khrustalev V.V.<sup>1</sup>, Khrustaleva T.A.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State Medical University,  
Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *The most stable class of proteins is A/B class. The total percentage of hydrophobic amino acid residues in variable, unstable and absolutely unstable regions of A/B proteins class is less than in the same regions of other classes of proteins. In unstable regions of A/B class compared to A+B class of proteins the frequency of leucine and glutamic acid usage is higher and the frequency of histidine usage is lower. The instability of class A+B can be explained by its domain organization.*

## ОЦЕНКА СВОЙСТВ НАСЫЩАЕМОСТИ И ЁМКОСТИ СОРБЕНТОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ IGG НА ОСНОВЕ ТРИПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ

Пустюльга Е.С.<sup>1</sup>, Грибовская О.В.<sup>1</sup>, Ермола Е.М.<sup>1</sup>, Голубович В.П.<sup>1</sup>, Мойсеёнок А.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии  
биологически активных соединений НАН Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

**Резюме.** Проведена оценка свойств насыщаемости и ёмкости специфических сорбентов на основе трипептидных лигандов содержащих ароматические аминокислоты. Определена предельная насыщаемость образцов достоверно определена предельная насыщаемость сорбентов. Выявлены наиболее перспективные сорбенты на основе Phe-Trp-DТур и Phe-Gln-Тур-ОМе.

**Введение.** Как известно, именно иммуноглобулины класса G (IgG) и их подклассы могут быть патогенными при ряде аутоиммунных заболеваний, таких как дилатационная кардиомиопатия, системная красная волчанка, пиело- и гломерулонефрит [1,2]. Для лечения многих аутоиммунных заболеваний применяются сорбенты, связывающие IgG человека.

Подобный подход эффективен в лечении острых стадий заболеваний, связанных с избыточной концентрацией или накоплением IgG в биологических жидкостях организма [3].

В последние годы были разработаны различные виды высокоэффективных сорбентов медицинского назначения способные связывать IgG [4,5]. Однако, они имеют ряд недостатков, таких как высокая стоимость и сложность в изготовлении.

На данный момент большой интерес представляют короткие лиганды на основе ди- или трипептидов, которые просты в синтезе и более дешевы в производстве [6].

Ранее в этом направлении нами был проведен теоретический поиск лигандов на основе аминокислот и пептидов, проявляющих высокую энергию связывания с Fc-фрагментами IgG различных подклассов [7]. Было выявлено, что сорбенты на основе коротких пептидов, в структуре которых присутствуют остатки ароматических аминокислот фенилаланина и триптофана, показывают высокие результаты связывания общего IgG из плазмы. Также были проведены исследования полученных сорбентов на селективность к подклассам IgG [8]. Представленные сорбенты показали высокую избирательность к подклассам IgG1 и IgG3 и высокую насыщаемость. Целью данной работы является оценка ёмкости экспериментальных образцов сорбентов относительно иммуноглобулинов класса G, так как это свойство одно из наиболее важных показателей взаимодействия.

**Материалы и методы исследования.** Оценку связывания иммуноглобулинов полученными ранее образцами сорбентов проводили посредством иммуноферментного анализа. Для установления сорбционных качеств к общему IgG экспериментальных образцов сорбентов был проведен анализ с использованием наборов «IgG общий — ИФА–БЕСТ» фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия).

Эксперименты проводили с плазмой с присутствием в качестве антикоагулянта цитрата натрия. Перед экспериментом плазму предварительно центрифугировали при 1000g в течение 15 мин.

Сорбционную ёмкость устанавливали путём динамических стендовых экспериментов. Заранее подготовленный объем плазмы циркулировал посредством перистальтического насоса через микроколонку, содержащую исследуемые образцы сорбентов. Условия динамического стендового эксперимента включали в себя параметры: объем циркулирующей плазмы — 35 мл; скорость перфузии — 2,9 мл/мин; режим перфузии — рециркуляция; общее время сорбции — 60 мин; объем сорбента в микроколонках — 7 мл, масса сорбента — 4 г. Отбор проб осуществляли на 12, 24, 36 и 60 минутах. Контрольные отборы делали до начала эксперимента.

Концентрация антител определялась фотометрически с помощью иммуноферментного анализатора iMark фирмы BioRad (США) при длине волны 450 нм (референс 620-655 нм).

Количество сорбированного общего IgG рассчитывали по разнице количества свободных антител в контрольной плазме в сравнении с концентрацией свободных антител в плазме, подвергнутой воздействию сорбентов.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Свойства ёмкости были установлены посредством расчета данных количеств, полученных в ходе динамических экспериментов и расчетов максимального количества, сорбированного общего IgG на 1 г сорбента. Количество связанного образцами сорбентов общего IgG рассчитывали по разнице количества свободного белка в плазме в сравнении с исходным количеством общего IgG в контрольном образце плазмы крови.

Для расчёта максимальной насыщаемости брали самый высокий результат связывания сорбентом иммуноглобулинов G.

**Таблица 1 — Количество свободного IgG в плазме при проведении динамических экспериментов (Мг)**

Образец сорбента	Время (Мин)					Максимальное сорбированное кол-во общего IgG (Мг)
	0	12	24	36	60	
Phe-Trp-DТур	412,60	225,40	237,30	210,00	209,65	202,95
Trp-Phe-DТур	357,70	346,85	333,20	307,65	320,32	50,05
Phe-Gln-Тур-ОМе	339,44	223,00	225,17	207,02	207,04	132,40
Phe-Asn-Тур-ОМе	358,54	297,36	229,39	257,04	237,27	129,15
Phe-Asp(Bzl)-Тур-ОМе	390,67	313,31	280,08	236,85	260,96	153,82
Phe-Ala-Тур-ОМе	365,05	323,40	257,25	254,80	281,40	110,25
Phe-Gly-Тур-ОМе	287,07	258,06	214,76	231,53	214,20	65,87

Исходя их данных таблицы, количество сорбированного общего IgG образцом на основе Phe-Trp-DТур составило 202,95 мг или 50,73 мг/г сорбента, для образца на основе Trp-Phe-DТур — 12,51 мг/г сорбента, Phe-Gln-Тур-ОМе — 33,10 мг/г сорбента, Phe-Asn-Тур-ОМе — 32,28 мг/г сорбента, Phe-Asp(Bzl)-Тур-ОМе — 38,46 мг/г сорбента, Phe-Ala-Тур-ОМе — 27,56 мг/г сорбента, Phe-Gly-Тур-ОМе — 16,47 мг/г сорбента.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее высоко свойства сорбции проявляют образцы на основе Phe-Trp-DТур, Phe-Gln-Тур-ОМе и Phe-Asp(Bzl)-Тур-ОМе.

Таким образом достоверно определена предельная насыщаемость образцов на основе Phe-Trp-DТур и образца Phe-Gln-Тур-ОМе наступившая на 36 минуте эксперимента. Для образцов Phe-Ala-Тур-ОМе, Phe-Asn-Тур-ОМе и Phe-Gly-Тур-ОМе предельная насыщаемость может быть определена на 24 минуте, после которой наступает период десорбции.

**Заключение.** Выявлено, что образцы на основе Phe-Trp-DТур и образца Phe-Gln-Тур-ОМе обладают высокой активностью лиганда, а также стабильностью. Выявлена сорбционная на-

и́большая ё́мкость для экспериментальных образцов сорбентов на основе Phe-Trp-DTyr — 50,73 мг/г и Phe-Asp(Bzl)-Tyr-OMe — 38,46 мг/г.

### Список литературы

1. Бардахивская, К. И. Иммуносорбция в лечении дилатационной кардиомиопатии / К. И. Бардахивская [и др.] // Эфферентная и физ.-хим. терапия. — 2012. — № 3. — С. 7–10.
2. Витковский, Ю.А. Состояние гуморального Иммуитета у детей при пиело-и гломерулонефрите / Ю.А. Витковский, Е. П. Батаева // Забайкальск. Мед. Вестн. — 2010. — № 1. — С. 30–33.
3. Bambauer, R. Auto-immune disorders treated with therapeutic apheresis / R. Bambauer [et al.] // Immunol. Res. Ther. — 2017. — Vol. 1, № 1. — P. 111–131.
4. Lund, L.N. Novel Peptide ligand with high binding capacity for antibody purification / L. N. Lund [et al.]// J. Chromatogr. A. — 2012. — №. 1225. — P. 158–167.
5. Naik, A.D. Newly synthesized bentonite–histidine (Bent–His) micro-composite affinity sorbents for IgG adsorption / A.D. Naik [et al.] // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. — 2007. — Vol. 301, iss. 1–3. — P. 490–497.
6. Левашов, П. А. Аффинные гемосорбенты на основе ароматических пептидов для связывания иммуноглобулинов класса G / П. А. Левашов [и др.] // Биоорг. хим. — 2015. — Т. 41, № 5. — С. 553–558.
7. Пустюльга, Е. С. Молекулярный докинг лигандов перспективных для сорбции IgG из биологических жидкостей / Е. С. Пустюльга [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. — 2020. Т. 56, № 1. — С. 88–95.
8. Пустюльга, Е. С. Селективность аффинных сорбентов на основе ароматических пептидов для связывания иммуноглобулинов класса G / Е. С. Пустюльга [и др.]// Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. — 2020. Т. 56, № 3. — С. 333–338.

## ESTIMATION OF THE SATURATION AND CAPACITY OF SORBENTS FOR IGG BINDING BASED ON TRIPEPTIDE LIGANDS

---

*Pustsuyulga Y.S.<sup>1</sup>, Gribovskaya O.V.<sup>1</sup>, Ermola E.M.<sup>1</sup>, Golubovich V.P.<sup>1</sup>, Moiseenok A.G.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Science of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *The properties of saturation and capacity of specific sorbents based on tripeptide ligands containing aromatic amino acids have been assessed. The maximum saturation of the samples has been determined; the maximum saturation of the sorbents has been reliably determined. The most promising sorbents based on Phe-Trp-DTyr and Phe-Gln-Tyr-OMe have been identified.*

## ОЦЕНКА СВОЙСТВ СЕЛЕКТИВНОСТИ СОРБЕНТОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ IGG НА ОСНОВЕ ТРИПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ

*Пустюльга Е.С., Ермола Е.М., Голубович В.П.*

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

**Резюме.** Созданы биоспецифические сорбенты для удаления IgG и подклассов из биологических жидкостей на основе олигопептидов, содержащих остатки ароматических аминокислот. Проведена оценка свойств селективности к IgM, IgE и белкам плазмы крови специфических сорбентов. Обнаружено, что созданные сорбенты проявляют низкую активность к общему белку плазмы, альбумину, IgM, IgE и высоко специфичны к IgG.

**Введение.** Как известно, именно иммуноглобулины класса G (IgG) и их подклассы могут быть патогенными при ряде аутоиммунных заболеваний, таких как дилатационная кардиомиопатия, системная красная волчанка, пиело- и гломерулонефрит [1,2]. Для лечения многих аутоиммунных заболеваний применяются сорбенты, связывающие IgG человека.

Подобный подход эффективен в лечении острых стадий заболеваний, связанных с избыточной концентрацией или накоплением IgG в биологических жидкостях организма [7].

В последние годы были разработаны различные виды высокоэффективных сорбентов медицинского назначения способные связывать IgG [9,10]. Однако они имеют ряд недостатков, таких как высокая стоимость и сложность в изготовлении.

Таким образом, на данный момент больший интерес представляют короткие лиганды на основе ди- или трипептидов, которые просты в синтезе и более дешевы в производстве.

Ранее в этом направлении нами был проведен теоретический поиск лигандов на основе аминокислот и пептидов, проявляющих высокую энергию связывания с Fc-фрагментами IgG различных подклассов. Было выявлено, что короткие пептиды, в структуре которых присутствуют остатки ароматических аминокислот фенилаланина и триптофана, показывают высокую энергию связывания с молекулами Fc-фрагментов подклассов IgG [3, 4, 5].

Целью данной работы является оценка свойств селективности полученных образцов сорбентов.

**Материалы и методы исследования.** Синтез пептидов осуществляли с использованием классических методов пептидного синтеза в растворе, путем последовательного присоединения трет-бутилоксикарбонил (Boc)-аминокислот к C-концевым фрагментам.

Прививку акриловой кислоты на полиэтиленовые гранулы проводили прямым радиационным методом в ГНУ «ОИЭЯИ — СОСНЫ». Для иммобилизации пептидов на гранулы последние предварительно модифицировали N-гидроксисукцинимидом с помощью N, N'-диизопропилкарбодиимида.

Функциональную оценку связывания IgG полученными образцами сорбентов проводили посредством иммуноферментного анализа [6]. Для установления сорбционных качеств к общему IgG, IgE и IgM экспериментальных образцов сорбентов был проведен иммуноферментный

анализ с использованием набора «IgG общий — ИФА–БЕСТ», «IgE общий — ИФА–БЕСТ», «IgM общий — ИФА–БЕСТ» фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), предназначенный для иммуноферментного определения концентраций общего IgG.

Для определения степени связывания исследуемых образцов сорбентов с Fc-фрагментом общего IgG использовали твердофазный метод иммуноанализа, основанный на принципе «сэндвич». Непосредственно перед проведением анализа изготовленные образцы сорбентов, а также активированные и неактивированные матрицы, инкубировали при температуре 37 °С в пробирках эппендорф с плазмой крови человека с использованием шейкера.

Эксперименты проводили с цитратной плазмой с предварительным центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. Образцы сорбентов объемом 0,05 мл инкубировали в 1,0 мл плазмы в течение 30 мин. Концентрацию сорбированного общего IgG и подклассов рассчитывали по разнице количества IgG в контрольной плазме в сравнении с концентрацией IgG в плазме, подвергавшейся воздействию сорбентов. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора iMark фирмы BioRad (США) при длине волны 450 нм (референс 620–655 нм).

Для оценки селективности сорбентов была взята величина отношения общего сорбированного IgG к общему количеству сорбированного белка. Количество белка в образцах определяли по методу Лоури [8]. Метод основывается на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении реактива Фолина с образованием окрашенных продуктов.

Интенсивность окраски образцов определяли по оптической плотности при длине волны 750 нм. Перед проведением анализа изготовленные образцы сорбентов инкубировали при температуре 37 °С в пробирках эппендорф с плазмой крови человека с использованием шейкера.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В результате проведенных экспериментов выявлено, что селективность образцов к IgG находится в пределах от 60,34 до 75,94 %, что является показателем высокой селективности (табл. 1).

**Таблица 1 — Селективность образцов сорбентов к IgG**

Образец сорбента	Сорбированный IgG (Мг/Мл)	Сорбированный общий белок (Мг/Мл)	Селективность (Мг/Мл)
Trp-Phe-DТyr	9,04	13,05	69,27
Phe-Trp-DТyr	10,13	13,34	75,94
Phe-Asn-Тyr-OMe	8,3	11,51	72,11
Phe-Gln-Тyr-OMe	8,91	13,23	67,35
Phe-Asp-bzl-Тyr-OMe	8,51	11,45	74,32
Phe-Ala-Тyr-OMe	8,42	11,12	75,72
Phe-Gly-Тyr	8,37	11,05	75,75

Данные таблицы показывают, что наибольшую селективность проявляет образец на основе Phe-Trp-DТyr — 75,94 %.

Также в ходе экспериментов были получены данные, свидетельствующие о той или иной специфичности образцов к классам Ig, таким как IgE и IgM. Так, данные по количеству сорбированного IgM в результате расчетов отображены в единицах мг/мл.

В результате проведенных статических экспериментов было выявлено, что сорбционные свойства экспериментальных образцов сорбентов к IgM низкие, в пределах от 0,73 до 2,46 мг при общем количестве IgM в контрольной плазме составляющем 10,91 мг/мл, что составляет от 6,7 до 24,1 % (табл. 2).

**Таблица 2 — Селективность образцов сорбентов к IgM**

Образец сорбента	Сорбированный IgM (Мг/Мл)	Сорбированный общий белок (Мг/Мл)	Селективность (%)
Trp-Phe-DТур	2,08	13,05	15,94
Phe-Trp-DТур	2,15	13,34	16,12
Phe-Asn-Тур-ОМе	0,73	11,51	6,34
Phe-Gln-Тур-ОМе	2,63	13,23	19,88
Phe-Asp-bzl-Тур-ОМе	1,86	11,45	16,24
Phe-Ala-Тур-ОМе	0,73	11,12	6,56
Phe-Gly-Тур	0,85	11,05	7,69

Минимум сорбированного IgM показали образцы на основе Phe-Asn-Тур-ОМе и Phe-Ala-Тур-ОМе, что составило для обоих образцов 0,73 мг IgM. Наиболее высокие показатели характерны для трипептидов Phe-Trp-DТур, Trp-Phe-DТур и составляют 2,15 и 2,08 мг сорбированного IgM. Подобный результат может объясняться тем, что при высокой активности к IgG, созданные трипептиды имеют достаточно высокий уровень активности к IgM, что может зависеть от аминокислотного состава самих трипептидных лигандов.

Селективность экспериментальных образцов сорбентов к IgE определялась в процентном отношении. Расчет велся относительно количества IgE в контрольной плазме (табл. 3).

**Таблица 3 — Селективность образцов сорбентов к IgE**

Образец сорбента	IgE (МЕ/Мл)	% сорбированного IgE
Phe-Asn-Тур-Оме	2,15	3,33
Phe-D-Тур	5,83	9,04
Phe-Trp-dТур	10,59	16,42
Phe-Gly-Тур	10,79	16,73
Phe-Ala-Тур-Оме	11,69	18,13
Trp-Phe-dТур	13,29	20,61
Phe-Gln-Тур-Оме	11,59	17,97
Phe-Arg-Тур-Оме	15,29	23,71
Phe-Asp(bzl)-Тур-Оме	14,89	23,09

Исходя из полученных данных можно заключить, что образцы сорбентов проявляют низкую активность к IgE, это указывает на их высокую селективность к молекулам-мишеням IgG.

**Заключение.** Выявлено, что все экспериментальные образцы сорбентов проявляют селективность к IgG относительно общего белка не менее 67 %, что является высоким показателем. Установлено, что селективность экспериментальных образцов к IgM низкая, в пределах от 6 до 20 %. Установлено, что сорбционные качества образцов сорбентов к IgE низкие, в пределах от 3 % (2,15 МЕ/Мл) до 24 % (15,29 МЕ/Мл) сорбированного IgE.

### Список литературы

1. Иммуносорбция в лечении дилатационной кардиомиопатии / К.И. Бардахивская [и др.] // Эфферентная и физ.-хим. терапия. — 2012. — № 3. — С. 7–10.
2. Витковский, Ю.А. Состояние гуморального иммунитета у детей при пиело- и гломеруло-нефрите / Ю.А. Витковский, Е.П. Батаева // Забайкальск. мед. вестн. — 2010. — № 1. — С. 30–33.
3. Пустюльга, Е. С. Поиск и оценка функциональных качеств лигандов сорбентов на основе ароматических аминокислот при связывании IgG из биологических жидкостей / Е.С. Пустюльга, Е.М. Ермола, В.П. Голубович // Биохимия и молекулярная биология. Выпуск 2. «Гра-

ницы биологических наук. Сигналинг и метоболизм» / Ин-т биох. биол. активн. соед. НАН Беларуси; ред.: И.Н. Семененя (гл. ред.) [и др.]. — Гродно, 2018. — С. 132–135.

4. Пустюльга, Е.С. Поиск лигандов сорбентов для извлечения IgG из биологических жидкостей / Е.С. Пустюльга, Е.М. Ермола // 2-й Международный биохимический конгресс «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» / Ин-т биох. биол. активн. соед. НАН Беларуси ; ред.: И.Н. Семененя (гл. ред.) [и др.]. — Гродно, 2018. — С. 482–487.

5. Молекулярный докинг лигандов перспективных для сорбции IgG из биологических жидкостей / Е.С. Пустюльга [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. — 2020. — Т. 56, № 1. — С. 88–95.

6. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. — М.: Высш. шк., 1991. — 288 с

7. Bambauer, R. Auto-immune disorders treated with therapeutic apheresis / R. Bambauer [et al.] // Immunol. Res. Ther. — 2017. — Vol. 1, № 1. — P. 111–131.

8. Protein measurment with the folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J. Biological chemistry. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275

9. Novel Peptide ligand with high binding capacity for antibody purification / L.N. Lund [et al.] // J. Chromatogr. — 2012. — № 1225. — P. 158–167.

10. Newly synthesized bentonite–histidine (Bent–His) micro-composite affinity sorbents for IgG adsorption / A.D. Naik [et al.] // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. — 2007. — Vol. 301, № 1–3. — P. 490–497.

## EVALUATION OF THE PROPERTIES OF SELECTIVE SORBENTS BASED ON TRIPEPTIDE LIGANDS FOR BINDING OF IGG

---

*Pustsyulga Y.S., Ermola E.M., Golubovich V.P.*

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *Biospecific sorbents for the removal of IgG and subclasses from biological fluids based on oligopeptides containing aromatic amino acid residues have been created. The properties of selectivity for specific sorbents for IgM, IgE and plasma proteins were evaluated. It was found that the created sorbents exhibited low activity to the total plasma protein, albumin, IgM, IgE and were highly specific for IgG.*













## ЭФФЕКТЫ АМИНОКИСЛОТНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА АМИНОКИСЛОТНЫЙ ФОНД ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

*Разводовский Ю.Е.<sup>1</sup>, Смирнов В.Ю.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси»,

г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,

г. Гродно, Республика Беларусь

**Резюме.** Исследовано влияние двух аминокислотных композиций на основе аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ), таурина и триптофана на фонд свободных аминокислот печени крыс при хронической алкогольной интоксикации (ХАИ). Установлено, что СХАИ вызывает дисбаланс в фонде свободных аминокислот печени, проявляющийся увеличением уровней глутамата, аспарагина, глицина, β-аланина, тирозина, а также снижением концентрации аланина. Введение композиции АРУЦ, таурина и триптофана оказывает нормализующий эффект в отношении ряда показателей аминокислотного фонда печени, в том числе на уровне ароматических аминокислот, глутамата и аланина. Нормализующий эффект композиции АРУЦ+таурин в отношении аминокислотного фонда печени выражены в меньшей степени.

**Введение.** Печень играет ключевую роль в обеспечении аминокислотного гомеостаза в организме, поскольку в ней происходят процессы трансаминирования и дезаминирования аминокислот, а также синтез белков [1]. Печень является основной мишенью токсических эффектов алкоголя [3]. Одним из ключевых факторов развития алкогольного поражения печени является белковая недостаточность, обычно сопутствующая длительной алкогольной интоксикации [7].

К настоящему времени накоплены данные относительно эффективности использования аминокислот и их композиций в качестве средств метаболических коррекции последствий хронической алкогольной интоксикации [2-5]. В то же время показано, что назначение аминокислот, адаптированных для применения у больных без поражения печени, может провоцировать аминокислотный дисбаланс у пациентов с печеночной недостаточностью [1]. Поэтому представляется целесообразным использование аминокислотных смесей, предназначенных для устранения метаболического дисбаланса при определенной патологии, т.е. аминокислот направленного действия.

Учитывая имеющиеся сведения относительно успешного использования АРУЦ таурина и триптофана в качестве средств метаболической терапии целого ряда патологических состояний [1], актуальной задачей является изучение возможности использования композиций на основе этих аминокислот с целью коррекции нарушений фонда аминокислот печени при различных режимах экспериментальной алкоголизации.

Целью исследования было изучение влияния двух аминокислотных препаратов на основе АРУЦ, таурина и триптофана на фонд свободных аминокислот печени при хронической алкогольной интоксикации.

**Материалы и методы исследования.** Хроническую алкогольную интоксикацию моделировали в течение 14 недель, используя 20% раствор этанола в качестве единственного источника питья [9]. Средняя доза этанола за весь период алкоголизации составила  $8 \pm 0,3$  г/кг (по данным регистрации потребления). Крысам 1-й опытной группы в течение последних 7 дней перед декапитацией внутрижелудочно вводили раствор композиции АРУЦ и таурина в массовых соотношениях 1:0,25:0,25:0,5 (композиция I) в дозе 0,5 г/кг, крысам 2-й группы — раствор композиции АРУЦ, таурина и L-триптофана в массовых соотношениях 1:0,25:0,25:0,5:0,4 (композиция II) в дозе 0,6 г/кг. Контрольные животные получали внутрижелудочно воду в эквивалентных количествах. Декапитацию проводили спустя 12 ч после последнего введения аминокислот.

Ткань печени гомогенизировалась в 0,2 М хлорной кислоте с норлейцином (0,25 мМ) в качестве внутреннего стандарта в соотношении 1:10 по массе. Полученные гомогенаты центрифугировались при 2000 g в течение 15 минут при температуре 5 градусов по Цельсию, после чего экстракты отделялись от белкового осадка.

Спектр определяемых соединений включал протеиногенные аминокислоты, орнитин, цитруллин, а также ряд родственных соединений (таурин,  $\alpha$ -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 [6].

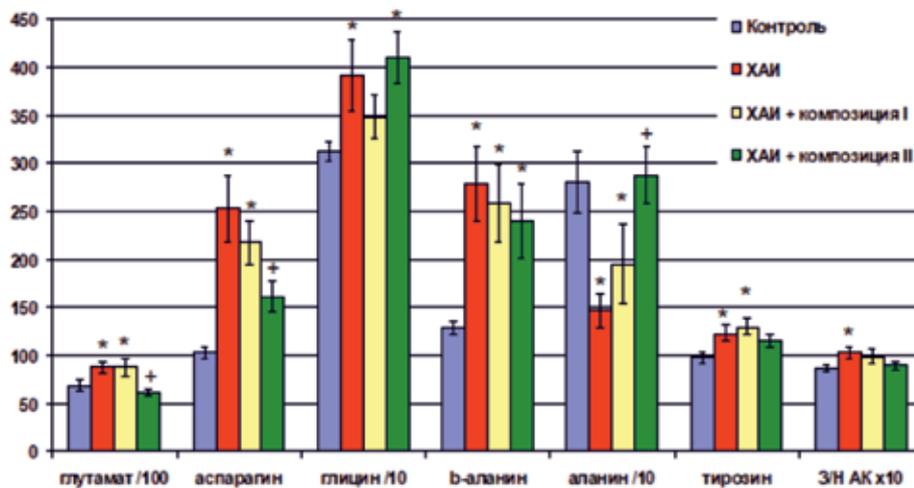
Статистическую обработку данных проводили с помощью программы StatSoft Statistica 10.0. Применялись методы описательной статистики, сравнение групповых средних производилось с помощью параметрического дисперсионного анализа после проверки на корректность его применения. В случае нарушения условий его применимости использовался непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Анализ аминокислотного дисбаланса осуществлялся при помощи линейного дискриминантного анализа.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Хроническая алкогольная интоксикация вызвала в печени увеличение уровней глутамата, аспарагина, глицина,  $\beta$ -аланина, тирозина, а также снижение концентрации аланина (рисунок 1). Обеднение пула аланина в печени может свидетельствовать о снижении катаболизма аминокислот под действием алкоголя в периферических тканях и, как следствие, переноса аланина в печень в глюкозо-аланиновом цикле. Влияние ХАИ на метаболизм ароматических аминокислот характеризуется, помимо повышения уровня тирозина и снижения соотношения фенилаланин/тирозин, также исчезновением положительной корреляции между их уровнями ( $r = 0,85$  в контроле,  $r = -0,12$  при ХАИ). Такая ситуация может быть объяснена снижением процессов утилизации тирозина при сохранении активности фенилаланин-гидроксилазной реакции.

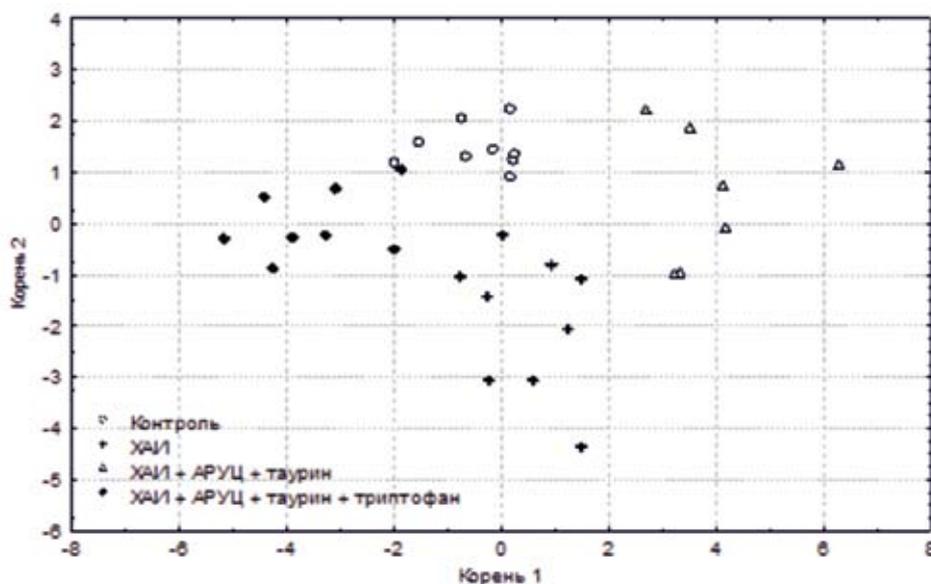
В целом, изменение структуры аминокислотного фонда печени характеризуется снижением доли незаменимых аминокислот и свидетельствует в пользу изменения соотношения между активностью глюконеогенеза и использования углеродных скелетов аминокислот в ЦТК гликолиза и глюконеогенеза (повышение уровней глутамата и глицина, снижение — аланина) и торможение процессов конъюгации (глицин) в печени. Это объясняет изменение уровней этих аминокислот в печени, несмотря на угнетающее действие алкогольной интоксикации на транспорт аминокислот в гепатоциты [5]. В предыдущих исследованиях было показано, что при хронической алкогольной интоксикации отмечается повышение уровня триптофана в печени и плазме вследствие угнетения активности триптофан-пирролазы [5]. Полученные нами данные не согласуются с этим положением, поскольку уровень триптофана в печени при хронической алкогольной интоксикации не повышался.

Введение композиции I на фоне ХАИ вызвало в печени рост уровней аспартата, серина, лейцина, оксипролина и цистина. В то же время композиция не повлияла на уровни аминокислот, изменившиеся при ХАИ — тирозина, глутамата, аспарагина, аланина и  $\beta$ -аланина. Исключение составляет глицин, повышение уровня которого предотвращалось при введении композиции.

Введение композиции II на фоне ХАИ индуцировало снижение уровней лизина (по отношению к контролю) и аспартата (по отношению к ХАИ), а также повышение концентраций серина, триптофана, таурина, цистина и гистидина. В то же время, предотвращалось нарушение уровней глутамата, аспарагина, аланина и тирозина, но оставались повышенными уровни глицина и  $\beta$ -аланина. Кроме того, введение композиции II нормализует соотношение заменимых и незаменимых аминокислот (рисунок 1). Как и при введении композиции I, наблюдался рост уровня лейцина в печени, однако он был менее выраженным и достоверен только по отношению к ХАИ. Причиной этого может быть конкуренция с триптофаном за общую систему транспорта в печень.



**Рисунок 1** — Содержание свободных аминокислот и их производных в печени крыс, нмоль/г. Примечание: \* —  $p < 0,05$  по отношению к контролю; † —  $p < 0,05$  по отношению к ХАИ



**Рисунок 2** — Проекция экспериментальных групп на плоскость двух главных компонент

Повышение при введении обеих композиций уровня цистина и метаболически связанного с ним серина свидетельствует о снижении катаболических превращений серосодержащих аминокислот. Как правило, повышение уровней серосодержащих аминокислот в печени говорит об усилении детоксикационных процессов [1], однако в данной ситуации рост цистина скорее всего обусловлен экзогенным поступлением таурина в составе композиций. Нормализация уровня тирозина и соотношения фенилаланин/тирозин, а также восстановление нормальной положительной корреляции между их уровнями ( $r = 0,8$ ), свидетельствует о нормализации утилизации ароматических аминокислот в печени после введения композиции. В то же время, накопление триптофана в печени может объясняться активацией его транспорта в печень, где, наряду с мозгом, происходит основная часть его превращений.

По значению критерия Фишера наиболее значимыми показателями являлись гистидин, аспарагин, оксипролин, пролин, серин, триптофан и лейцин ( $F = 12,1; 8,5; 7,1; 6,9; 4,4; 3,4$  и  $3,4$  соответственно). На плоскости двух главных компонент расстояние между контрольной и группами ХАИ и ХАИ+композиция II практически одинаково (расстояние Махаланобиса 12,6 и 15,2 соответственно), в то время как расстояние между контрольной и группой ХАИ+композиция I составляет 23,9 (рисунок 2). Расположение реализаций на плоскости двух главных компонент свидетельствует о том, что введение аминокислотных композиций на фоне ХАИ, наряду с эффектом нормализации, приводит к специфическим для каждой композиции изменениям в аминокислотном фонде печени. Причем, эти изменения более выражены в случае введения композиции I.

Таким образом, ХАИ сопровождается дисбалансом в фонде свободных аминокислот печени, основным проявлением которого является снижение доли незаменимых аминокислот. Введение композиции II оказывает нормализующий эффект в отношении ряда показателей аминокислотного фонда печени, в том числе на уровне ароматических аминокислот, глутамата и аланина. Нормализующий эффект композиции I в отношении аминокислотного фонда печени выражены в меньшей степени.

### 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. Влияние композиции аминокислот с разветвленной углеводородной цепью, триптофана и таурина на обмен аминокислот в экспериментальных моделях алкоголизма / В. Ю. Смирнов [и др.] // Укр. биохим. журн. — 2003. — Т. 75, № 4. — С. 101–107.
3. Гепатопротективные эффекты аминокислот при алкогольном поражении печени. / Ю. Е. Разводовский [и др.] // Актуальные вопросы гепатологии: материалы Междунар. научн.-практич. конф., Гродно, 27-28 сентября 2000. — С. 54.
4. Метаболическая терапия при алкоголизме. / В.В. Лелевич [и др.] // Медицинские Новости. — 2001. — № 2. — С. 12–16.
5. Островский, Ю.М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю.М. Островский, С.Ю. Островский. — Минск: Наука и техника, 1995. — 278 с.
6. Современные проблемы биохимии. Методы исследований / Е. В. Барковский [и др.] — Минск: Вышэйш. шк., 2013. — 496 с.
7. Шейбак, В.М. Обмен свободных аминокислот и кофермента А при алкогольной интоксикации / В.М. Шейбак. — Гродно, 1998. — 152 с.

# EFFECTS OF AMINO ACIDS COMPOSITION ON THE POOL OF AMINO ACIDS OF LIVER UNDER CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

---

*Razvodovsky Y.E.<sup>1</sup>, Smirnov V.Y.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Republican Scientific Research Unitary Enterprise «Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *The effect of two complex amino acid compositions based on branched chain amino acids (BCAA), taurine and tryptophan on the pool of free amino acids in rat liver in chronic alcohol intoxication (CAI) was studied. It was found that SCAI causes an imbalance in the pool of free liver amino acids, manifested by an increase in the levels of glutamate, asparagine, glycine,  $\beta$ -alanine, tyrosine, as well as a decrease in the concentration of alanine. The introduction of the composition of BCAA, taurine and tryptophan has a normalizing effect in relation to a number of indicators of the amino acid fund of the liver, including the levels of aromatic amino acids, glutamate and alanine. The normalizing effect of the BCAA+taurine composition on the liver amino acid pool is less pronounced.*

## ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ L-ТРИПТОФАНА НА СПЕКТР АМИНОКИСЛОТ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

*Разводовский Ю.Е.<sup>1</sup>, Смирнов В.Ю.<sup>2</sup>, Дорошенко Е.М.<sup>2</sup>, Переверзев В.А.<sup>3</sup>,  
Максимович Н.Е.<sup>2</sup>, Семененя И.Н.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск Республика Беларусь.

**Резюме.** Исследован пул аминокислот и биогенных аминов коры больших полушарий мозга крыс при субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) на фоне введения L-триптофана. СИГМ вызвала снижение в коре больших полушарий уровней глутамата, аспарагина, тирозина, триптофана, орнитина, лизина и 1-метилгистидина. Введение триптофана препятствует снижению уровня некоторых аминокислот, в том числе триптофана, а также нормализует ряд интегральных показателей аминокислотного фонда больших полушарий головного мозга.

**Введение.** Актуальным направлением экспериментальных исследований является поиск нейропротекторных средств, улучшающих восстановление нервных клеток, поврежденных ишемией-реперфузией, среди биологически активных соединений и естественных метаболитов [1,5]. Как известно, аминокислоты и их производные (в частности, биогенные амины) играют важную роль в функционировании головного мозга, как в норме, так и при патологии, участвуя в биосинтезе мембранных белков и сигнальных молекул, гормонов и регуляторных пептидов [7]. Поэтому развитие дисбаланса уровней аминокислот в головном мозге может стать причиной возникновения различных нервно-психических расстройств [6].

Незаменимая аминокислота L-триптофан является предшественником нейромедиатора серотонина, участвующего в регуляции различных процессов, происходящих в центральной нервной системе. Известно, что уровень серотонина в тканях головного мозга находится в прямой зависимости от содержания триптофана в плазме крови [4].

В предыдущих исследованиях была показана прогностическая значимость изменения уровня триптофана в плазме крови у больных с острым ишемическим инсультом [8]. Было установлено, что уровень триптофана в плазме пациентов с ишемическим инсультом ниже, по сравнению с контролем [8]. Низкий уровень триптофана в плазме снижает его биодоступность в головном мозге, что может стать причиной снижения синтеза серотонина, нарушение обмена которого имеет отношение к патогенезу ишемического поражения головного мозга [3].

Целью исследования была характеристика изменений пула аминокислот и биогенных аминов коры больших полушарий мозга крыс при СИГМ на фоне введения L-триптофана.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты выполнены на 18 белых беспородных крысах-самках (по 6 животных в каждой группе), массой 180-220 г. СИГМ моделировали

путём перевязки обеих сонных артерий в течении одного часа. L-триптофан (в дозе 100 мг/кг массы тела) вводили внутривенно непосредственно перед перевязкой общих сонных артерий. 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 осуществляли изъятие фрагмента коры больших полушарий с его последующим замораживанием в жидком азоте. Подготовка пробы для исследования включала гомогенизацию в 10-ти кратном объеме 0,2M хлорной кислоты, центрифугирование в течение 15 мин при 13000 g при 4°C с последующим отбором супернатанта.

Спектр определяемых соединений включал протеиногенные аминокислоты, орнитин, цитруллин, ряд родственных соединений (таурин,  $\alpha$ -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. Использовалась колонка Zorbax Eclipse Plus C18, 3,5 мкм, 2,1 x 150 мм, Идентификацию и количественный анализ производили в программе Agilent ChemStation B.04.01[2], калибровка метода осуществлялась с применением концентрата стандартной смеси аминокислот фирмы "Sigma-Aldridge". Используемые подвижные фазы: 0,1M 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 °C. 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.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы R. Для оценки влияния факторов применялся параметрический дисперсионный анализ с апостериорным сравнением по Тьюки. В случае нарушения однородности дисперсий дисперсионный анализ выполнялся в модификации Уэлча с апостериорным сравнением по Геймс-Хоувелл. При отсутствии нормальности распределения показателей использовался непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с поправкой Бенъямини-Хохберга на множественность сравнений. 95% доверительные интервалы получены методом непараметрического бутстрепа (R=500).

**Результаты исследования и их обсуждение.** СИГМ вызвала снижение в коре больших полушарий уровней глутамата, аспарагина, тирозина, триптофана, орнитина, лизина и 1-метилгистидина (табл. 1). Понижалось также и содержание суммарного пула аминокислот, причём наиболее существенное снижение наблюдалось для его заменимых компонентов (табл. 2). Анализ изменений других интегральных показателей аминокислотного пула свидетельствует об обеднении пулов гликогенных, нейротрансмиттерных и возбуждающих аминокислот. Снижение уровней ароматических аминокислот (ААК) при неизменном уровне АРУЦ обусловило повышение соотношения АРУЦ/ААК.

Введение триптофана при СИГМ предотвращало снижение уровня этой аминокислоты в коре больших полушарий головного мозга (табл. 1). Кроме того, введение триптофана при СИГМ повышало уровни аминокислот треонина, серина, лейцина, валина и родственных соединений — глутатиона, фосфоэтаноламина,  $\alpha$ -аминоадипиновой и  $\alpha$ -аминомасляной кислот, а также снижало концентрации цитруллина, аргинина, аланина, гистидина, 1-метилгистидина, ГАМК и этаноламина. Введение триптофана также предотвращало снижение уровней глутама-

та и аспарагина при СИГМ (уровень последнего повышался даже выше контрольных значений). В то же время, триптофан не оказывал влияния на уровни тирозина, орнитина и лизина — аминокислот, содержание которых снижалось при СИГМ. Снижение уровня лизина, предшественника  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты, а также рост уровня последней может свидетельствовать об активации катаболизма лизина.

**Таблица 1 — Концентрация свободных аминокислот и родственных соединений в коре больших полушарий крыс при СИГМ на фоне введения L-триптофана, нмоль/г.**

	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-триптофан
GSH	390 ± 38,1	370 ± 37,9	702 ± 45,5*†
Glu	13333 ± 340	11392 ± 275*	13604 ± 297†
Asn	206 ± 9,41	182 ± 4,59*	245 ± 4,67*†
Ser	1222 ± 26,7	1249 ± 17,7	1511 ± 29,9*†
$\alpha$ -AAA	46,6 ± 1,65	41,8 ± 1,39	52,9 ± 1,65*†
His	156 ± 8,47	152 ± 4,6	134 ± 2,3*
PEA	2080 ± 94,6	2158 ± 103	2543 ± 126*†
Thr	763 ± 21,1	747 ± 15,5	1065 ± 31,7*†
1-MHis	20,9 ± 1,86	16,2 ± 0,945	13,8 ± 0,574*
Ctr	35,1 ± 1,97	32,5 ± 1,76	27,6 ± 0,804*†
Arg	180 ± 6,33	165 ± 4,48	121 ± 4,26*†
Ala	1937 ± 113	1818 ± 81,9	1605 ± 56,2*
GABA	4017 ± 195	3491 ± 180	2783 ± 104*†
Tyr	117 ± 9,52	76 ± 2,49*	58,1 ± 2,82*†
$\alpha$ -ABA	10,6 ± 1	10,4 ± 0,802	22,5 ± 1,78*†
EA	1550 ± 79,6	1775 ± 96,7	1341 ± 23,1†
Val	154 ± 4,58	154 ± 5,59	186 ± 6,89*†
Trp	75,1 ± 2,87	62,3 ± 1,77*	67,1 ± 3,21
Leu	164 ± 10,1	168 ± 8,43	188 ± 4,67*
Orn	33,4 ± 3,3	22,8 ± 1,4*	15,5 ± 1,2*†
Lys	443 ± 10,5	393 ± 12*	389 ± 8,45*

Условные обозначения (здесь и в табл.2): p<0,05 при сравнении с группами: \* — контроль; † — СИГМ

**Таблица 2 — Интегральные показатели аминокислотного фонда коры больших полушарий крыс (нмоль/г) и их соотношения при СИГМ**

	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-триптофан
ААК	326 ± 16,6	265 ± 6,01*	257 ± 7,48*
АРУЦ	409 ± 17,7	410 ± 16,7	472 ± 15,5*†
Заменимые	29905 ± 592	27269 ± 535*	29874 ± 435†
Незаменимые	2078 ± 55,4	1989 ± 40,6	2350 ± 38,3*†
Гликогенные	31139 ± 611	28509 ± 549*	31413 ± 444†
Кетогенные	606 ± 16,8	560 ± 16	577 ± 10,9
Нейротрансмиттерные	32656 ± 644	29832 ± 538*	32277 ± 529†
Возбуждающие	18380 ± 367	16325 ± 338*	18945 ± 363†
Тормозные	14276 ± 421	13508 ± 356	13332 ± 292
АРУЦ/ААК	1,29 ± 0,0617	1,55 ± 0,0529*	1,86 ± 0,064*†
Заменимые/Незаменимые	14,5 ± 0,307	13,7 ± 0,219	12,8 ± 0,223*†
Гликогенные/Кетогенные	51,9 ± 1,37	51,4 ± 1,2	54,7 ± 1,01
Возбуждающие/Тормозные	1,3 ± 0,0397	1,22 ± 0,0343	1,43 ± 0,037*†
Суммарный пул АК	45142 ± 931	41729 ± 740*	44402 ± 620†

Среди интегральных показателей аминокислотного фонда следует отметить нормализацию пулов незаменимых, гликогенных, нейротрансмиттерных, возбуждающих аминокислот, а также суммарного пула аминокислот. Триптофан вызывал повышение суммарного содержания АРУЦ, обусловленное, в первую очередь, ростом концентрации валина. Нормализация пула незаменимых и рост содержания заменимых аминокислот объясняет снижение соотношения заменимых и незаменимых компонентов аминокислотного пула. В целом введение триптофана сдвигает баланс возбуждающих и тормозных аминокислот-трансммиттеров в сторону первых.

Снижение уровня триптофана в коре больших полушарий головного мозга на фоне СИГМ хорошо согласуется с данными о его снижении в плазме крови [7]. Снижение биодоступности триптофана в мозге в острой фазе ишемического инсульта может является одной из причин снижения синтеза серотонина. Провоспалительная реакция в ответ на острую ишемию является другой возможной причиной снижения скорости синтеза серотонина [4]. Показано, что нейротропный потенциал противовоспалительного цитокина IL-10 реализуется посредством повышения биодоступности триптофана для синтеза серотонина [8].

Таким образом, субтотальная ишемия вызывает снижение ряда показателей аминокислотного пула коры больших полушарий головного мозга, в том числе уровня триптофана. Введение триптофана препятствует снижению уровня некоторых аминокислот, в том числе триптофана, а также нормализует ряд интегральных показателей аминокислотного фонда больших полушарий головного мозга. Задачей дальнейших исследований является изучение роли нарушения обмена триптофана в патогенетических механизмах ишемического повреждения головного мозга.

### Список литературы

1. Изменения обмена ГАМК, глутамата и других нейроактивных аминокислот в разные сроки экспериментальной ишемии головного мозга. / Н.П. Канунникова [и др.] // Вестник гродненского государственного университета им. Я. Купалы. — 2006. — Том 2, № 3. — С. 102–106.
2. Современные проблемы биохимии. Методы исследований / Е.В. Барковский [др.] — Минск: Вышэйшая школа, 2013. — 491 с.
3. Disturbed Tryptophan Metabolism in Cardiovascular Disease. / H. Mangge [et al.] // Med Chem. — 2014; № 21(17): 1931–1937.
4. Inflammation-Induced Catabolism of Tryptophan and Tyrosine in Acute Ischemic Stroke. / H. Ormstad [et al.] // J. Mol Neurosci. — 2013. — № 51. — P. 893–902
5. Levels of free amino acids and their derivatives in the brain cortex of rats during unilateral ischemia. / Y.E. Razvodovsky // International Journal of Neuroscience and Behavior Studies. — 2017. — Vol. 1, № 1. — P. 18–21.
6. The role of tryptophan catabolism along the kynurenine pathway in acute ischemic stroke. / R. Brouns [et al.] // Neurochem Res. — 2010. — Vol. 35, № 9. — P. 1315–1322.
7. Tryptophan Metabolism and Gut-Brain Homeostasis. / W. Roth [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2021. — Vol. 22, №. 2973. — P. 2– 23.
8. Tryptophan Metabolism, Inflammation, and Oxidative Stress in Patients with Neurovascular Disease. / M. Hajsl [et al.] // Metabolites. — 2020. — Vol. 10, № 208. — P. 2– 19.

# THE EFFECT OF ADMINISTRATION OF L-TRYPTOPHAN ON THE SPECTRUM

---

## OF FREE AMINO ACIDS AND BIOGEN AMINES IN THE BRAIN CORTEX OF RATS UNDERGOING SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA

*Razvodovsky Y.E.<sup>1</sup>, Smirnov V.Y.<sup>2</sup>, Doroshenko E.M.<sup>2</sup>, Pereverzev V.A.<sup>3</sup>, Maksimovich N.Ye.<sup>2</sup>,  
Semenenya I.N.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Republican Scientific Research Unitary Enterprise «Institute of Biochemistry of Biologically Active  
Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

*<sup>3</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *The pool of amino acids and biogenic amines of the cerebral cortex of rats with subtotal cerebral ischemia (SIGM) on the background of L-tryptophan administration was studied. SIGM caused a decrease in the cerebral cortex levels of glutamate, asparagine, tyrosine, tryptophan, ornithine, lysine and 1-methylhistidine. The introduction of tryptophan prevents a decrease in the level of certain amino acids, including tryptophan, and also normalizes a number of integral indicators of the amino acid fund of the cerebral hemispheres.*

## ВЛИЯНИЕ ТОКОФЕРОЛА ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ НА ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ЛЕГКИХ НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОКСИИ

*Рутковская Ж.А., Котович И.Л., Таганович А.Д.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** Ингаляционное введение липосом с  $\alpha$ -токоферолом корректирует оксидантно-антиоксидантное равновесие в легких новорожденных морских свинок за счет увеличения содержания токоферола, нормализации активности глутатионпероксидазы и уровня SH-соединений в БАЛЖ и снижения содержания продуктов перекисного окисления липидов.

**Введение.** В последние десятилетия в развитых странах частота преждевременных родов достаточно стабильна и составляет 5-7% от числа всех родившихся детей [1]. Среди новорожденных с экстремально низкой массой тела (500–1000 г) доля выживших составляет около 50%. Качество жизни таких детей ухудшают бронхолегочная дисплазия, ретинопатия недоношенных (РН), нейросенсорная тугоухость и другие патологии [2]. В последние годы на первое место по частоте и клинической значимости выходит бронхолегочная дисплазия (БЛД) как наиболее распространенная форма патологических изменений легочной ткани в период новорожденности, нередко являющаяся причиной отдаленной летальности [3].

Высокие концентрации кислорода, которые используются при проведении оксигенотерапии у недоношенных оказывают повреждающее действие на структурное и функциональное состояние клетки легочной ткани. Точный механизм этого повреждения не установлен. Предполагают, что это связано с изменением валентности молекулярного кислорода и образованием промежуточных свободных супероксидных анион-радикалов и перекисных соединений. Эти агрессивные молекулы снижают прочность и разрушают биологические мембраны, нарушая структуру мембранных липопротеинов, вызывают структурно-функциональные нарушения ферментных систем, ослабляют биосинтез макроэргических соединений, ослабляют процессы клеточного дыхания. Интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков приводит к повышению уровня продуктов перекисного окисления, которые усугубляют развитие патологических изменений в тканях и в организме в целом.

Степень повреждения тканей активными формами кислорода (АФК) определяется не только такими факторами, как концентрация кислорода во вдыхаемой смеси и длительность его применения, но и состоятельностью антиоксидантной системы организма. Развитие антиоксидантной системы легких у плода происходит главным образом в течение третьего триместра беременности. В это время клеточные структуры легких недоношенных детей плохо защищены от воздействий продуктов перекисного окисления по причине незрелости сурфактанта [4]. В этот период даже кратковременная гипероксия вызывает длительный и потенциально опасный оксидативный стресс.

Принимая во внимание недостаточность антиоксидантов у недоношенных новорожденных [5], патогенетически оправдано их использование для предотвращения развития оксидативного стресса у недоношенных детей. Ранее неоднократно предпринимались попытки коррекции антиоксидантного статуса новорожденных с использованием ферментативных (супероксиддисмутаза) и неферментативных (преимущественно витамины А, Е, N-ацетилцистеин) антиоксидантов, которые вводили внутримышечно или перорально. На настоящий момент эти методы не нашли применения в практике в связи с незначительной эффективностью, а также в ряде случаев с достаточно высокой инвазивностью.

Важнейшим липофильным антиоксидантом в легких является витамин Е (токоферол), который оказывает мембраностабилизирующее действие, предохраняя липиды и SH-группы мембранных белков от окислительного повреждения. Его антиоксидантное действие заключается также в способности защищать от окисления двойные связи в молекулах каротина и витамина А. Витамин Е (совместно с аскорбатом) способствует включению селена в состав активного центра глутатионпероксидазы, тем самым он активизирует ферментативную антиоксидантную защиту [6]. Токоферол является не только антиоксидантом, но и актигипоксантом, и способен стабилизировать митохондриальную мембрану и экономить потребление кислорода клетками.

Поступление витамина Е в легкие из крови происходит при участии рецепторов к липопротеинам высокой плотности, а экспрессия рецепторов зависит от срока гестации и у недоношенных детей она низкая [7]. Поэтому препараты витамина Е, применяемые перорально, могут быть малоэффективны. Одним из способов, повышающим эффективность препаратов, считается их включение в липосомы [8]. Липосомы являются нетоксичными, а липосомная форма облегчает проникновение веществ в клетки и увеличивает продолжительность их действия.

Целью данного исследования явилось изучение возможности использования альфа-токоферола в составе мультиламеллярных липосом для коррекции изменений в системе оксиданты/антиоксиданты в легких новорожденных морских свинок, вызванных действием длительной гипероксии.

**Материалы и методы исследования.** В эксперименте использовали новорожденных морских свинок, которые находились на стандартном рационе вивария БГМУ. Исследование проводилось с соблюдением этических норм и правил проведения работ с лабораторными животными. Были сформированы 4 группы животных: 1 группа — интактные животные; 2 группа — животные, которые подверглись воздействию гипероксии; 3 группа — интактные животные, которые получали ингаляционно  $\alpha$ -токоферол; 4 группа — животные, которые во время воздействия гипероксии получали ингаляционно  $\alpha$ -токоферол в составе мультиламеллярных липосом. В каждой экспериментальной группе находилось 4-5 животных. В течение суток после рождения животных опытной группы помещали на 14 суток в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70% (температура 20-25 °С, относительная влажность 50-80%). Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом.

$\alpha$ -Токоферол вводили ингаляционно 1 раз в двое суток с использованием компрессорного небулайзера Comp Air (NE-C28-E, Omron, Китай). Для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь мультиламеллярных липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол (12,5 мг/кг) и ДПФХ (45 мг/кг) в 0,1 М натрий-фосфатном буфере.

По окончании инкубации животных обеих групп наркотизировали тиопенталом натрия и получали материал для исследования.

Бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ) получали путем промывания легких через эндотрахеальный зонд раствором 0,9% NaCl (3Ч8 мл). Затем жидкость центрифугировали (900 об/мин, 4оС) для осаждения клеток. Бесклеточный супернатант БАЛЖ использовали для определения активности глутатионпероксидазы (ГП), содержания восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений, карбонильных производных аминокислотных остатков в белках, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ). Общий белок определяли по методу Lowry.

В гомогенатах тканей легкого определяли содержание токоферола.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 8,0. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический тест Манна-Уитни для независимых выборок (U-тест). Отличия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Вдыхание смеси с высоким содержанием кислорода в течение 14 суток приводило к достоверному уменьшению содержания токоферола в легких на 39% ( $p < 0,05$ ) [таблица 1].

**Таблица 1 — Содержание неферментативных антиоксидантов и активность глутатионзависимых ферментов в БАЛЖ и в легких новорожденных морских свинок, подвергавшихся воздействию гипероксии на фоне ингаляционного введения токоферола в составе липосом**

Показатель	Контроль	Гипероксия	Контроль+ $\alpha$ -ТФ	Гипероксия+ $\alpha$ -ТФ
Небелковые SH-соединения, нмоль/мг белка	111,7 (60,2 — 178,6)	75,8 (36,7 — 121,3)*	145,3 (112,2 — 162,2)	117,9 (113,0 — 125,6)^
ГП, нмоль/мин/ мг белка	49,5 (29,5 — 62,1)	15,2 (0 — 20,2)*	95,2 (36,5 — 113,1)	61,8 (62,5 — 78,1)^
Токоферол, нмоль/мг белка/г ткани	305,4 (218,2 — 367,2)	188,3 (133,4 — 314,4) *	193,2 (138,3 — 238,3)*	376,6 (353,5 — 441,3)^

Примечание — \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «контроль»; ^ -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «гипероксия»;  $\alpha$ -ТФ -  $\alpha$ -токоферол.

Известно, что  $\alpha$ -токоферол является основным липофильным антиоксидантом в легких, поскольку входит в состав сурфактанта и защищает его от оксидантного повреждения, обезвреживая свободные радикалы кислорода и липидные гидроперекиси. Механизм действия токоферола обусловлен также его способностью индуцировать синтез глутатиона и ферментов глутатион-зависимой системы [9].

У животных, дышавших смесью с высоким содержанием кислорода, было выявлено достоверное снижение уровня восстановленного глутатиона и других небелковых SH-соединений в БАЛЖ на 33% по сравнению с контролем,  $p < 0,05$  [таблица 1]. Известно, что дефицит восстановленного глутатиона в БАЛЖ имеет место и у недоношенных новорожденных в первые недели жизни [10].

Как следует из данных, приведенных в таблице 1, активность ГП в БАЛЖ опытных животных также снизилась в 3,2 раза ( $p < 0,05$ ). В литературе имеются данные об индукции синтеза ГП на уровне транскрипции в условиях гипероксии [11]. Однако, как следует из приведенных данных, это не сопровождается ростом активности ГП в БАЛЖ. Снижение активности ГП, несмотря на усиление ее синтеза, может быть обусловлено целым рядом посттрансляционных воздействий, в частности, повреждением молекул фермента вследствие окислительной моди-

фикации или протеолитического расщепления. Выраженное снижение активности ГП является крайне неблагоприятным, поскольку данный фермент способен обезвреживать не только активные формы кислорода, но и органические гидроперекиси, включая перекиси ненасыщенных жирных кислот [12].

Снижение уровня глутатиона и токоферола привело к стимуляции процессов окислительного повреждения белков и липидов. Выявлено, что уровень первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) - диеновых конъюгатов - в БАЛЖ опытных животных достоверно увеличился и составил 168% от контроля ( $p < 0,05$ ), [таблица 2]. Содержание вторичных продуктов ПОЛ, реагирующих с ТБК, в БАЛЖ в условиях гипероксии также превышало контрольные значения в 1,9 раза и было статистически достоверным ( $p < 0,05$ ). В опытной группе животных выявлено также увеличение относительного содержания оснований Шиффа, которые являются конечными продуктами перекисного окисления липидов и у животных контрольной группы отсутствовали. [таблица 2].

**Таблица 2 — Содержание продуктов перекисного окисления липидов и белков в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся воздействию гипероксии на фоне ингаляционного введения токоферола в составе липосом**

Показатель	Контроль	Гипероксия	Контроль+ $\alpha$ -ТФ	Гипероксия+ $\alpha$ -ТФ
Карбонильные производные, нмоль/мг белка	24,23 (20,58 — 25,95)	33,9 (14,39 — 46,25)	17,49 (16,14 — 18,92)	15,53 (13,09 — 20,28)*^
ТБК-РП, отн.ед.	4,52 (3,75 — 7,39)	8,67 (5,25 — 18,45)*	4,83 (3,81 — 5,25)	4,05 (3,18 — 4,44)^
ДК, отн.ед.	2,18 (1,45 — 2,42)	3,66 (2,06 — 4,3)*	1,29 (1,24 — 1,36)*	2,52 (2,19 — 2,89)
ОШ, отн.ед.	0	0,75 (0,63 — 0,9) *	0,01 (0,01 — 0,01)	0,44 (0,23 — 0,65)*^

Примечание — \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «контроль»; ^ -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «гипероксия»;  $\alpha$ -ТФ -  $\alpha$ -токоферол.

Содержание карбонильных производных аминокислот в белках достоверно не изменялось, но имело тенденцию к увеличению [таблица 2]. По нашему мнению, данный факт может быть результатом протеолиза, которому подвергаются окислительно модифицированные белки [13], что и привело к уменьшению уровня карбонильных производных в БАЛЖ при длительной гипероксии.

По данным литературы [14] у недоношенных, рожденных на 24-28 неделе гестации и имеющих признаки развития БЛД, также было выявлено постепенное уменьшение концентрации карбонильных производных в БАЛЖ, начиная с 4-6 дня жизни. Однако авторы указывают на снижение содержания аскорбата в эти же сроки гестации, что может быть расценено как признак наличия оксидативного стресса у недоношенных детей.

После введения липосом с витамином Е содержание  $\alpha$ -токоферола в легких опытных животных, подвергшихся гипероксии, увеличилось в 2 раза ( $p < 0,05$ ) и соответствовало контрольным значениям [таблица 1].

Установлено, что ингаляционное введение липосом с  $\alpha$ -токоферолом животным, которые подверглись воздействию гипероксии, также сопровождалось нормализацией показателей системы глутатион/глутатионзависимые ферменты в БАЛЖ. Уровень восстановленного глутатиона увеличился в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными, которые длительно находились в условиях гипероксии и достоверно не отличалось от группы контроля [таблица 1]. Активность

глутатионпероксидазы в БАЛЖ также увеличилась в 4,1 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с животными, которые подверглись воздействию гипероксии, при этом разница с группой контроля была недостоверна.

Увеличение содержания глутатиона и токоферола способствовало снижению оксидативных процессов с ткани легких новорожденных морских свинок. Подтверждением этому является уменьшение содержания карбонильных производных белков в БАЛЖ у животных, получивших ингаляционно  $\alpha$ -токоферол, по сравнению с животными, подвергшимися гипероксии, на 54% ( $p < 0,05$ ).

На фоне введения липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол, у животных, находившихся в условиях высокой концентрации кислорода, количество продуктов, реагирующих с ТБК снизилось на 53% ( $p < 0,05$ ), оснований Шиффа на 41% ( $p < 0,05$ ) [таблица 2]. Уровень диеновых конъюгатов в БАЛЖ также имел тенденцию к снижению.

**Заключение.** Таким образом, в условиях длительной гипероксии в БАЛЖ новорожденных морских свинок выявлено значительное уменьшение уровня неферментативных антиоксидантов (небелковых SHсоединений и токоферола) и снижение активности глутатионпероксидазы. Недостаточность антиоксидантных систем ведет к накоплению в организме карбонильных производных аминокислотных остатков в белках, ТБК-РП, ДК и ОШ.

Ингаляционное введение липосом с  $\alpha$ -токоферолом животным, которые подверглись воздействию гипероксии, нормализует показатели системы глутатион/глутатионзависимые ферменты в БАЛЖ и препятствует накоплению карбонильных производных аминокислотных остатков в белках, ТБК-РП, ДК и ОШ.

### Список литературы

1. Радзинский, В.Е., Костин, И.Н., Оленев, А.С., Гагаев, Ч.Г., Парыгина, А.Н., Гаврилова, А.А. и др. Преждевременные роды — нерешенная мировая проблема. *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение*, 2018; 6(S3): 55–64. DOI: 10.24411/2303-9698-2018-13909.
2. Радзинский, В.Е. *Акушерская агрессия*. М.: Status Praesens; 2017. 872 с.
3. *Бронхолегочная дисплазия. Методические рекомендации* / под ред. Н.Н. Володина. — М.: РГМУ, 2010. 56 с.
4. Frank, L. Antioxidants, nutrition, and bronchopulmonary dysplasia / L. Frank // *Clinic in perinatal*. — 1992. — Vol. 19. — № 3. — P. 541–561.
5. Шишко, Г.А. *Современные подходы к ранней диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии: учебно-методическое пособие для врачей* / Г.А. Шишко, Ю.А. Устинович // Минск, БелМАПО. — 2006. — 25 с.
6. Морозкина, Т. С., Мойсеенок, А. Г. *Витамины*. — Минск: Асар, 2002. — С. 66–72.
7. Kolleck, I. Vitamin E as an antioxidant of the lung. Mechanisms of vitamin E delivery to alveolar type II cells / I. Kolleck, P. Sinha, B. Rustow // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. — 2002. — Vol. 166. — P. S62 — S66.
8. Suntres, Z.E. Liposomal antioxidants for protection against oxidant-induced damage / Z. E. Suntres // *J. Toxicol*. — 2011. — Vol. 2011. — id.152474, 16 p.
9. Rimbach, G. Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol / G. Rimbach, J. Moehring, P. Huebbe, J.K. Lodge // *Molecules*. — 2010. — Vol. 15 (3). — P. 1746–1761
10. Jain, A. Glutathione metabolism in newborns: evidence for glutathione deficiency in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lymphocytes in prematures / A. Jain, T. Mehta, P.A. Auld [et al.] // *Pediatr. Pulmonol*. — 1995. — Vol. 20, № 3. — P. 160-166.

11. Comhair, S.A.A. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100 O<sub>2</sub> or cigarette smoke / S. A. A. Comhair, Thomassen M.J., Erzurum S.C. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Boil.* — 2000. — Vol. 23. — P. 350–354.
12. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение / Е.Е. Дубинина // С-Пб., «Медицинская пресса». — 2006. — 400 с.
13. Муравлева, Л.В. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравьева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Клюев [и др.] // *Фундаментальные исследования.* — 2010. — № 1. — С. 74–78.
14. Schock, B. Oxidative stress in lavage fluid of preterm infants at risk of chronic lung disease / B. Schock, D.G. Sweet, H.L. Halliday, I.S. Young, M. Ennis // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* — 2001. — Vol. 281. — P. L1386-L1391.

---

## **INFLUENCE OF TOCOPHEROL WITH INHALATION IN THE COMPOSITION OF LIPOS ON CHANGE OF SOME BIOCHEMICAL INDICATORS IN LUNG NEWBORN ANIMALS UNDER HYPEROXIA**

---

*Rutkovskaya Zh.A., Kotovich I.L., Taganovich A.D.*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

***Summary.*** *Inhaled liposomes with  $\alpha$ -tocopherol in hyperoxia-exposed newborn guinea pigs restore the oxidant-antioxidant balance in the lungs by increasing the content of tocopherol, normalizing the activity of glutathione peroxidase and the level of SH-compounds in BALF and reducing the content of lipid peroxidation products.*

## ПЛАНКОВСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

---

*Савельев С.В., Морозова Л.А.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН»,  
г. Фрязино, Российская Федерация*

**Резюме.** Предложен комплексный метод исследования биологически активных веществ и их растворов путем определения свойств их электромагнитных полей планковского излучения в СВЧ и миллиметровом диапазоне длин волн на основе определения физических параметров вынужденного излучения (радиоотклика) на внешнее электромагнитное поле и статистических параметров люминесцентного и спонтанного излучений, таких как Фурье-спектр и фазовые портреты. Сделан вывод о применимости предложенного метода для исследования особенностей биологических организмов и идентификации растворов веществ различной природы.

**Введение.** Информационно-волновым свойствам водной среды в научной литературе уделяется особенное внимание (см., например, статью [1] и приведенные в ней ссылки). Такое название своих электромагнитных свойств вода получила преимущественно из-за амплитудно-частотной зависимости общей картины экспериментальных результатов, полученных при исследованиях водных растворов, живых организмов, т. е. всего множества наблюдаемых в присутствии воды электромагнитных явлений [2]. Однако экспериментальные результаты по исследованию взаимодействия живых и водных сред с электромагнитным полем авторам научных трудов оказалось легче всего объяснить так называемыми информационным воздействием электромагнитных полей и волновыми свойствами водной среды. В результате полученные экспериментальные данные по взаимодействию водных сред с электромагнитными полями так и остаются экспериментальными данными без какой-либо достаточной теоретической подтверждающей базы.

В ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН построена качественная теория воздействия электромагнитного излучения (ЭМИ) коротковолнового спектра частот, начиная с СВЧ-диапазона, миллиметров (ММ) и выше, дающая объяснение, каким образом ЭМИ указанных диапазонов, затухающее в водной среде на расстоянии меньше 1 мм, например, в ММ диапазоне длин волн, проникает в глубь живых и водных сред. Теория базируется на генерации вынужденного излучения воды или радиоотклика на внешнее электромагнитное воздействие [3]. В дальнейшем эта плодотворная идея была развита авторами настоящей работы и экспериментально было показано, что спектр радиоотклика может занимать сверхширокий диапазон радиочастот от самых низких, декаметровых волн, вплоть до как минимум терагерцевых волн [4, 5]. Такой подход позволил дать теоретическое объяснение равнозначного по порядку величины действия, силе и физической природе ЭМИ практически любого частотного диапазона длин волн на биологические и водосодержащие объекты.

Вместе с этим эксперименты по исследованию генерации радиоотклика на внешнее ЭМИ водными средами показали, что параметры радиоотклика в заметной степени зависят от состава испытываемой живой или водной среды. Следуя этому, теория генерации радиоотклика на внешнее

ЭМИ может быть применена для исследования физических, химических и медико-биологических свойств водных сред для всех случаев определения особенностей биологических субстанций и определения базовых веществ растворов и их непосредственной концентрации.

Задача определения особенностей живых систем и идентификации исследуемых водных сред с точки зрения определения как состава растворенных веществ, так и их концентраций является одной из первостепенных задач, стоящих перед современной наукой. Теория генерации радиоотклика на внешнее ЭМИ, по всей видимости, в состоянии в определенной мере указать однозначное решение по определению состава водных растворов.

В дополнение к теории радиоотклика, для однозначного ответа на поставленный вопрос авторами статьи предложен метод исследования статистических характеристик ЭМИ живых организмов и растворов исследуемых веществ, которыми являются характеристики люминесцентного и спонтанного ЭМИ. Наиболее значимыми из них являются изменение радиоярких свойств ЭМИ в реальном времени, Фурье-спектры и фазовые портреты, вид которых сможет определить состояние живых организмов и составы водных растворов.

**Цель работы** — дать описание метода определения физических свойств ЭМИ водосодержащих сред и растворов веществ путем определения количественных и статистических параметров их вынужденных, спонтанных и люминесцентных ЭМИ.

**Материалы и методы исследования.** *Метод исследования живых и водных сред путем определения параметров радиоотклика на внешнее ЭМИ.*

В работе [5] впервые экспериментально показана возможность генерации вынужденного ЭМИ или радиоотклика на внешнее ЭМИ на частотах выше, чем частота внешнего возбуждающего поля. В экспериментах было установлено, что параметры радиоотклика живых организмов отличаются от параметров радиоотклика водосодержащих сред. Кроме того, было замечено, что параметры радиоотклика различаются при небольшом изменении физических, химических или иных параметров исследуемых сред, например [6, 7].

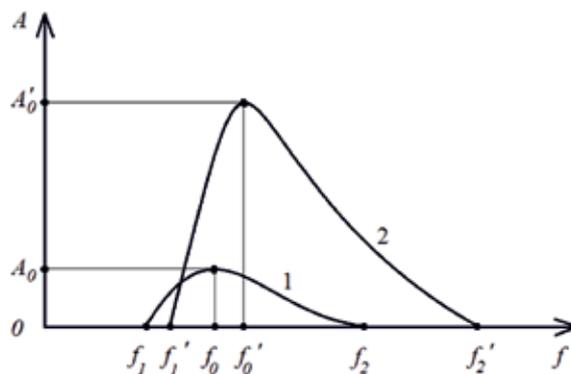
В многочисленных экспериментах отмечается, что радиоотклик есть неотъемлемая часть реакции водной среды живых организмов или водных растворов веществ на действие ЭМИ. Несмотря на сверхмалую амплитуду радиоотклика, которая обычно в среднем превышает люминесцентное или спонтанное ЭМИ исследуемого живого или водосодержащего объекта не более чем на 10 дБ, экспериментально существует возможность установить основные параметры радиоотклика. Впервые в работе [3] было показано, что радиоотклик водных объектов есть значимая характеристика исследуемой водной субстанции. Однако, как показывают эксперименты, радиоотклик возможно фиксировать только с помощью сверхвысокочувствительных радиоприемников-радиометров. Радиометры имеют флуктуационную чувствительность принимаемого сигнала не более 0,15 К при минимальном значении измеряемой мощности  $P_{\text{мин}} = 4 \cdot 10^{-16}$  Вт. Исследования показывают, что даже при таком низком уровне мощности измеряемого вынужденного ЭМИ есть возможность определить различия параметров радиоотклика в зависимости от исследуемой в эксперименте субстанции.

Обратимся к рис. 1, который схематично отражает кривые амплитуд  $A$  радиооткликов водного из значимых диапазонов радиочастот при изменении частоты  $f$  внешнего ЭМИ. На рисунке представлены две кривые радиооткликов, которые получены на одной частоте приема, имеющую значение 61,2 ГГц, кривая 1 и кривая 2. Воздействующее ЭМИ в эксперименте изменялось в диапазоне 53–68 ГГц. Кривая 1 соответствует радиоотклику деионизированной дистиллированной воды, кривая 2 получена путем регистрации ЭМИ биологически активной точки человека V13 фэй-шу. Рисунок наглядно представляет различие радиооткликов, зафиксированных от выбранных сред.

Рассмотрим определяемые в эксперименте значимые параметры радиоотклика. Первым важным параметром радиоотклика является частота приема сверхвысокочувствительного радиометра  $F_{rf}$ , с помощью которого ведется прием наведенного радиоизлучения радиоотклика. Для кривой 1 на рисунке введены обозначения, отражающие основные параметры радиоотклика исследуемого бидистиллята:  $A_0$  — максимальная амплитуда радиоотклика при фиксированном значении плотности мощности сигнала облучения  $P = 5 \text{ мкВт/см}^2$  в эксперименте, которой соответствует значение частоты  $f_0$  внешнего ЭМИ и значения частот  $f_1$  и  $f_2$  нижнего и верхнего порога фиксации радиоотклика внешнего ЭМИ указанного частотного диапазона. Важным является численное значение интегрального параметра  $C$ , определяемого как:

$$C = \int_{f_1}^{f_2} A(f) df, \quad (1)$$

где  $A(f)$  — нормализованная кривая, определяющая зависимость амплитуды радиоотклика от частоты облучающего сигнала для рассматриваемого частотного интервала.



**Рисунок 1 — Зависимость амплитуды вынужденного ЭМИ или радиоотклика дистиллята (1) и человека (2) на частоте 61,2 ГГц при изменении внешнего ЭМИ**

Обратимся к кривой 2. Данная кривая построена при равнозначных кривой 1 внешних условиях, т. е. при таких же параметрах облучающего сигнала. Однако, как видно из рис., значения определяющих параметров для рассматриваемой кривой 2 значительно отличаются от последних кривой 1. Указанные отличия значений параметров кривых 1 и 2 хорошо коррелируют с результатами, полученными в работе [5]. Сопоставление определяющих параметров радиооткликов физическим, химическим и медико-биологическим параметрам исследуемых субстанций сможет явиться предтечей для создания базы хранения и получения информации идентификации субстанций по физическим параметрам их вынужденных излучений, т. е. радиооткликам.

Набор значений величин  $F_{rf}, A_0, P, f_0, f_1, f_2, C$  сможет в некоторой мере являться достаточным условием для определения таких физических параметров исследуемых растворов, как вид химического соединения базового вещества и его концентрация. Набор значений упомянутых выше величин сможет стать также достаточным условием определения концентрации заранее известного базового вещества в исследуемом растворе.

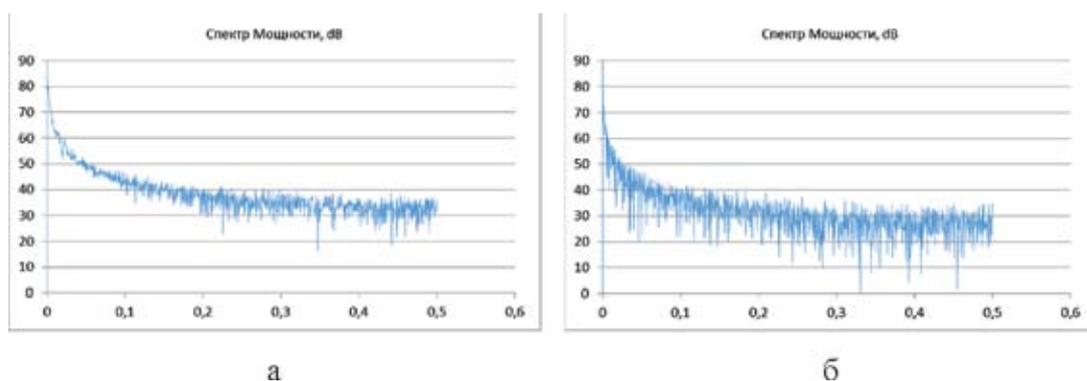
*Метод исследования живых и водных сред путем определения статистических параметров их ЭМИ.*

Электромагнитные излучения живых организмов и растворов веществ в свободном состоянии являет собой электромагнитное люминесцентное или спонтанное излучение водных свободных или связанных осцилляторов со случайной временной радиояркостной характеристикой,

в общем случае хаотически меняющейся во времени. При внешнем воздействии ЭМИ, благодаря поляризации молекулы воды и механизму генерации радиоотклика на внешнее ЭМИ, возможно частичное упорядочивание молекул воды, которое может сказываться и после воздействия внешних электромагнитных полей. Эффект генерации радиоотклика и остаточные явления групповой переориентации молекул воды изменяют люминесцентное и спонтанное ЭМИ живых систем и водных структур, чьи параметры могут быть идентифицированы с помощью прецизионных измерений. Эксперименты по исследованию физических свойств люминесцентных и спонтанных ЭМИ живых организмов и водосодержащих сред указывают на взаимно-однозначное соответствие параметров ЭМИ и их физических, химических и медико-биологических параметров, таких как температура, наличие или отсутствие патологий, вид и концентрация химических соединений базовых веществ.

Любое изменение в макромолекуле воды проявляется в изменении статистических свойств люминесцентного, спонтанного или вынужденного ЭМИ исследуемого объекта, которое на первый взгляд является просто белым шумом. Однако статистические характеристики, которыми являются Фурье-спектр радиояркой характеристики ЭМИ и сопутствующие Фурье-спектру математические объекты, такие как фазовые портреты во множестве параметрических пространств системы, полученные с помощью высокочувствительных радиометров, могут с высокой степенью вероятности указать характер воздействия ЭМИ, химический состав исследуемых водосодержащих сред [3], наличие нестандартных или патологических изменений жизнедеятельности исследуемых объектов [6, 7].

Для иллюстрации сказанного выше на рис. 2 и 3 приведены статистические характеристики люминесцентного и спонтанного ЭМИ, полученные с помощью высокочувствительного радиометра, принимающего сигнал ЭМИ на длине волны 4,9 мм. Радиометр имел следующие технические параметры: рабочая частота  $F = 61,2$  ГГц, точность установки и поддержания частоты гетеродина  $\pm 200$  МГц; входная полоса рабочих частот  $\pm 200$  МГц; флуктуационная чувствительность  $\Delta T$  приемника не более 0,15К, при постоянной времени  $\tau = 1$  сек. Минимальное значение мощности, измеряемой радиометром:  $P_{\text{мин}} = kT \cdot \Delta\nu = 1,38 \cdot 10^{-23} \cdot 0,15 \cdot 200 \cdot 10^6 (\text{Вт}) \approx 4,14 \cdot 10^{-16}$  Вт. Приемная антенна радиометра представляла собой рупор с переходом на волновод сечением  $3,6 \times 1,8$  мм с фланцем прямоугольного сечения.

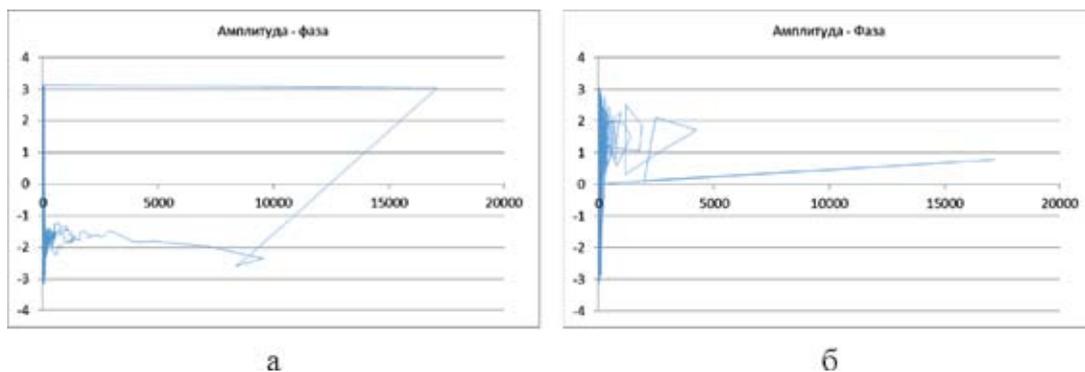


**Рисунок 2 — Фурье-спектры люминесцентного (а) и спонтанного (б) излучения исследуемого дистиллята**

В качестве предмета исследования была взята деионизированная дистиллированная вода с электропроводностью не менее 0,8 мкСм/см. Экспериментально с помощью радиометра, измерялись радиояркие характеристики исследуемых образцов воды. Радиояркие характеристики измерялись во времени, время экспозиции одного измерения составляло один час.

Для проведения измерений первоначально исследуемые образцы воды помещались в чашки Петри, которые ставились на приемный рупор принимающей антенны радиометра, осуществлявшего фиксацию люминесцентного излучения ЭМИ образца. Затем образец облучался ЭМИ с интегральной мощностью 10 мВт на частоте 42,25 ГГц в течение часа. После облучения фиксировалось спонтанное излучение образца. Время регистрации сигнала во всех экспериментах составлял один час. Сигнал с радиометра подавался на компьютер, который производил запоминание и обработку получаемой информации.

На рис. 2 представлены Фурье-спектры одного и того же образца воды до облучения, люминесцентное ЭМИ (см. рис. 2а), и после облучения, спонтанное ЭМИ (см. рис. 2б). Для наглядности Фурье-спектры мощности принимаемого сигнала построены в логарифмическом масштабе в частотном диапазоне 0–0,5 Гц. Именно этот частотный диапазон является наиболее информативным для радиоярких характеристик и отражает значимые медленные процессы изменения радиояркой температуры ЭМИ водной структуры с большой длительностью (до 10 мин по порядку величины), что и определяет минимальное необходимое время экспозиции ЭМИ при проведении эксперимента. Об изменениях свойств ЭМИ, произошедших в образце после облучения, говорит деформация формы Фурье-спектра радиояркой характеристики ЭМИ после облучения и значительное изменение амплитуды его частотных составляющих.



**Рисунок 3 — Фазовые портреты в пространстве «амплитуда — фаза» люминесцентного (а) и спонтанного (б) ЭМИ исследуемого дистиллята**

На рис. 3 представлены фазовые портреты временной реализации радиояркой характеристики исследуемого образца дистиллята воды в параметрическом пространстве системы амплитуда — фаза. Рис. 3а отражает свойства люминесцентного ЭМИ образца до облучения, соответствующего Фурье-спектру на рис. 2а. В соответствии в представленной формой Фурье-спектра движение изображающей точки временной реализации в фазовом пространстве системы занимает сравнительно небольшую область, ограниченную отрезком значений фазы  $\{-1, -3\}$  и отрезком значений амплитуды  $\{0, 750\}$ . После длительного (в течение часа) воздействия ЭМИ движение изображающей точки временной реализации радиояркой характеристики в фазовом пространстве системы меняется (рис. 3б). Изображающая точка системы, соответствующая состоянию системы с Фурье-спектром на (см. рис. 2б), охватывает большее фазовое пространство. Область движения в данном случае уже ограничивается отрезками значений фазы  $\{3, -3\}$  и значений амплитуды  $\{0, 1000\}$ . Это указывает на то, что движение в фазовом пространстве исследуемой системы амплитуда — фаза меняется, что говорит об отличии спонтанного ЭМИ образца после воздействия от люминесцентного излучения до облучения. Наши исследования показали, что формы фазовых портретов времен-

ных реализаций радио яркостной характеристики исследуемых образцов и их изменения прямым образом зависят от физических, химических и медико-биологических характеристик исследуемых живых и водосодержащих образцов. Наблюдаемые изменения фазовых портретов во множестве фазовых пространств в определяемых параметрах исследуемой системы совместно со значением частоты, длительности и мощностных характеристик воздействующих ЭМИ могут стать табличными значениями основных параметров исследуемых биологических и водосодержащих систем с целью определения и идентификации исследуемых биологических сред и растворов веществ.

**Заключение.** Экспериментально показана значимость эффекта изменения параметров вынужденного ЭМИ, или радиоотклика, при действии ЭМИ на водные растворы веществ и живые организмы. Установлены основополагающие параметры радиоотклика, отвечающие физическим, химическим и медико-биологическим свойствам исследуемых биологических субстанций и водосодержащих веществ. Сделан вывод о том, что набор табличных значений установленных параметров радиоотклика всего многообразия частотных диапазонов сможет служить отправной точкой для определения биологических свойств живых организмов и химических составов водосодержащих субстанций.

Предложен метод определения водосодержащих и живых сред путем определения статистических свойств их люминесцентных и спонтанных ЭМИ. Экспериментально показано изменение Фурье-спектров и фазовых портретов в пространстве определяющих параметров временной реализации радиояркостной характеристики после воздействия на образец ЭМИ. Установлено минимально значимое время экспозиции радиоприема спонтанного ЭМИ для получения достоверных и повторяющихся экспериментальных данных, равное одному часу.

Таким образом, предложенные методики определения значимых параметров вынужденного ЭМИ, или радиоотклика, на внешнее ЭМИ и статистических свойств их люминесцентных и спонтанных излучений позволяют при их взаимном дополнении определять физические, химические и медико-биологические свойства изучаемых живых и водосодержащих объектов.

### Список литературы

1. Механизм информационного воздействия миллиметрового и терагерцового излучения на водосодержащие и живые объекты / О.В. Бецкий [и др.] // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2017. — № 11. — С. 30–35.
2. Петросян, В.И. Радиоволновые экологические факторы / В.И. Петросян, Г.Е. Бриль // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2018. — № 4. — С. 21–26.
3. Особая роль системы «миллиметровая волна — водная среда» в природе / Н.И. Синицын [и др.] // Биомедицинская радиоэлектроника. — 1999. — № 1. — С. 3–21.
4. Савельев, С.В. Основные положения теории действия миллиметровых волн на водосодержащие и живые биологические объекты / С.В. Савельев, О.В. Бецкий, Л.А. Морозова // Журнал радиоэлектроники : биомедицинская радиоэлектроника. — 2012. — № 11.
5. Генерация радиоотклика на внешнее электромагнитное излучение в водных и биологических средах / Л.А. Морозова [и др.] // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2017. — №12. — С. 46–49.
6. Авшалумов, А.Ш. Функциональная неинвазивная диагностика органов и систем человека / А.Ш. Авшалумов, Р.У. Балтаева, Г.Ф. Филаретов. — М.: Медицинское информационное агентство. — 2015. — С. 264.
7. Свойства миллиметрового излучения организма человека при нормальном и патологическом состояниях / С.В. Савельев [и др.] // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2018. — № 4. — С. 27–32.

# PLANK RADIATION OF AQUEOUS SOLUTIONS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

---

*Savelyev S.V., Morozova L.A.*

*Federal State Budgetary Institution of Science V.A. Kotelnikov  
Institute of Radiotechnology and Electronics, RAN,  
Fryazino, Russia*

**Summary.** *A complex method is proposed for studying biologically active substances and their solutions by determining the properties of their electromagnetic fields in the microwave and millimeter wavelength ranges based on the determination of physical parameters of stimulated emission (radio response) to an external electromagnetic field and statistical parameters of luminescent and spontaneous radiation, such as the Fourier spectrum and phase portraits. A conclusion is drawn on the applicability of the proposed method for studying the characteristics of biological organisms and the identification of solutions of substances of various nature.*

## ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА «АНТИМИОПАТИК» ДЛЯ КОРРЕКЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У КОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДЕФИЦИТОМ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

*Сафонов В.А.<sup>1</sup>, Ляпко Н.И.<sup>2</sup>, Черницкий А.Е.<sup>3</sup>*

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

*<sup>2</sup>ОАО «Турино-агро» Могилевская обл., Глусский р-н, аг. Турино, Республика Беларусь;*

*<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация*

**Резюме.** В условиях биогеохимической провинции Республики Беларусь изучена эффективность применения препарата «Антимиопатик» (содержащего в 1 мл 0,8 мг селена, 0,4 мг марганца, 0,2 мг цинка, 0,1 мг меди, 0,02 мг кобальта, 40 мг витамина Е и 30 000 МЕ витамина А) для коррекции репродуктивных нарушений у коров, ассоциированных с полигипомикроэлементозом. Обнаружена зависимость между показателями воспроизводительной функции животных и содержанием в их организме селена, марганца, кобальта.

**Введение.** Низкое содержание микроэлементов в почвах биогеохимических провинций обуславливает их дефицит в пищевой цепи и сопровождается различными формами дисэлементозов у сельскохозяйственных животных [5, 6], многие из которых проявляются репродуктивными нарушениями [10, 12–14]. На большей части территории Республики Беларусь почвы и кормовые растения бедны селеном, марганцем, цинком, медью и кобальтом [2, 5]. Данное обстоятельство определяет необходимость дополнительного включения в рационы животных минеральных подкормок и премиксов либо применение им пролонгированных инъекционных препаратов, содержащих недостающие микроэлементы [6–8]. Одним из таких препаратов, широко используемых на молочных фермах Республики Беларусь, является «Антимиопатик» [1, 6]. В 1 мл препарата содержится 0,8 мг селена, 0,4 мг марганца, 0,2 мг цинка, 0,1 мг меди, 0,02 мг кобальта, 40 мг витамина Е и 30 000 МЕ витамина А.

**Цель исследования** — изучить влияние препарата «Антимиопатик» на элементный статус и показатели воспроизводительной функции у коров в условиях биогеохимической провинции Республики Беларусь.

**Материалы и методы исследования.** Исследования выполнены в производственных условиях ОАО «Турино-агро» аг. Турино Глусского района Могилевской области Республики Беларусь. Было сформировано 2 группы коров голштинской породы с  $n = 30$  каждая. Контрольная группа животных получала только основной рацион, включающий 9 кг сена тимофеевки луговой, 30 кг сенажа клевера лугового, 5 кг зерна ржи, 25 кг силоса кукурузного в день. Коровам в экспериментальной группе дополнительно к основному рациону внутримышечно вводили препарат «Антимиопатик» трехкратно за 60, 40 и 20 дней до предполагаемого отела

в разовой дозе 10 мл. Образцы растений ( $n = 10$  для каждого вида), входящих в состав кормов, для исследования отбирали по методике В.В. Ковальского [4], волос у коров получали с кисти хвоста сразу после отела [3]. Содержание селена, марганца, цинка, меди и кобальта в образцах определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (Nexion 300D, PerkinElmer, США). У коров учитывали продолжительность периодов от отела до первого осеменения, между отелами, сервис-периода, число осеменений, случаи задержания последа и заболевания послеродовым эндометритом. Все исследования выполнены в соответствии с этическими нормами, установленными в Хельсинкской декларации (1964) с последующими поправками. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ *Statistica 8.0* (StatSoftInc., США) и *IBM SPSS Statistics 20.0* (IBM Corp., США). Результаты выражали как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное распределение. Достоверность различий между группами животных определяли, сравнивая медианы с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Взаимосвязи между показателями выявляли с помощью непараметрических критериев корреляции Спирмена ( $r_s$ ) и  $\tau$ -Кендалла ( $r_{\tau-k}$ ). Нулевую гипотезу отвергали при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Анализ содержания микроэлементов в рационе животных выявил недостаток селена ( $0,03 \pm 0,008$  мг/кг сухого вещества), цинка ( $23,9 \pm 4,2$  мг/кг сухого вещества), меди ( $3,9 \pm 0,08$  мг/кг сухого вещества) и кобальта ( $0,04 \pm 0,01$  мг/кг сухого вещества), при этом содержание марганца было в пределах нормы ( $66,1 \pm 8,9$  мг/кг сухого вещества) [6, 8].

Результаты определения концентрации микроэлементов в волосе коров представлены в таблице. Элементный статус животных контрольной группы характеризовался дефицитом марганца, селена и кобальта, пониженным (в пределах физиологических границ) содержанием цинка и меди [4, 11]. Применение коровам экспериментальной группы препарата «Антимиопатик» приводило к повышению в их волосе содержания марганца на 133,2 % ( $P < 0,001$ ), селена на 113,3 % ( $P < 0,001$ ), кобальта на 87,5 % ( $P < 0,001$ ), цинка на 5,8 % ( $P < 0,05$ ) соответственно по сравнению с контрольной группой, в тоже время уровень меди существенно не изменялся (см. табл.).

**Таблица — Содержание микроэлементов в волосе у коров (мг/кг сухого вещества)**

Микро-элемент	Контрольная группа	Экспериментальная группа	Физиологический интервал [3, 10]
Селен	$0,083 \pm 0,020$	$0,177 \pm 0,069$	0,60–0,80
Марганец	$3,49 \pm 0,81$	$8,14 \pm 2,61$	10–20
Цинк	$98,8 \pm 3,6$	$104,5 \pm 6,9$	100–130
Медь	$6,80 \pm 1,49$	$7,80 \pm 0,73$	7,0–15,0
Кобальт	$0,008 \pm 0,001$	$0,015 \pm 0,005$	0,02–0,05

Среди коров контрольной группы выявлено 12 случаев (40,0 %) задержания последа и 9 (30,0 %) острого послеродового эндометрита, в экспериментальной группе 3 и 2 случаев (10,0 и 6,7 %) соответственно. У животных, получавших только основной рацион, продолжительность периода от отела до первого осеменения составила  $79,6 \pm 4,45$  дней, сервис-периода —  $92,2 \pm 3,92$  дней, между отелами —  $384,7 \pm 5,11$  дней, у коров, которым дополнительно применяли препарат «Антимиопатик», на 16,3, 13,2 и 29,6 дней соответственно меньше ( $P < 0,01$ ).

Обнаружена зависимость между задержанием последа у коров и содержанием в их организме кобальта ( $r_{\tau-k} = -0,514$ ,  $P < 0,01$ ), селена ( $r_{\tau-k} = -0,596$ ,  $P < 0,01$ ), марганца ( $r_{\tau-k} = -0,756$ ,  $P < 0,01$ ). Заболеваемость животных острым послеродовым эндометритом коррелировала с содержанием в волосе кобальта ( $r_{\tau-k} = -0,417$ ,  $P < 0,01$ ), селена ( $r_{\tau-k} = -0,596$ ,  $P < 0,01$ ), марганца

( $r_{r-k} = -0,414$ ,  $P < 0,01$ ). Продолжительность периода от отела до первого осеменения находилась в обратной зависимости от содержания марганца в волосе коров ( $r_s = -0,429$ ,  $P < 0,05$ ). Число осеменений, необходимых для оплодотворения животных, коррелировало с содержанием в волосе кобальта ( $r_s = -0,775$ ,  $P < 0,01$ ) и марганца ( $r_s = -0,655$ ,  $P < 0,01$ ).

Очевидно, что дефицит селена и кобальта в пищевой цепи был обусловлен биогеохимическими особенностями региона. Несмотря на пониженное содержание цинка и меди в кормовых растениях и рационе коров [7, 9], содержание этих микроэлементов в организме животных находилось у нижней границы физиологического интервала [4, 11]. Содержание марганца в растениях и рационе коров было оптимальным [7, 8]. В тоже время у животных наблюдался дефицит марганца, вероятно, связанный с нарушением его усвоения из растений [3, 8]. Полигипомикроэлементоз у коров сопровождался нарушениями воспроизводительной функции (снижением фертильности, увеличением продолжительности периодов от отела до первого осеменения, между отелами, сервис-периода) и повышением частоты послеродовых заболеваний.

Наши данные согласуются с результатами других исследований [3, 7, 11–14], показавшими, что дефицит селена и марганца у крупного рогатого скота может иметь такие экономически значимые последствия, как снижение фертильности, задержание последа, повышение заболеваемости метритом. Дефицит кобальта может проявляться у коров замедлением инволюции матки и нарушениями эстрального цикла [10].

**Заключение.** Результаты исследования убедительно доказывают, что в условиях биогеохимического дефицита селена, марганца, цинка, меди, кобальта мероприятия по коррекции репродуктивных нарушений и профилактике послеродовых заболеваний у коров обязательно должны включать восполнение недостающих в рационе животных микроэлементов. Одним из способов может быть внутримышечное применение коровам и нетелям за 60, 40 и 20 дней до предполагаемого отела препарата «Антимиопатик», содержащего эти микроэлементы, в разовой дозе 10 мл.

### Список литературы

1. Белькевич, И.А. Фармако-токсикологическая оценка нового препарата «Антимиопатик» и его профилактическая эффективность при полигипомикроэлементозах крупного рогатого скота: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.03 / И.А. Белькевич. — Минск, 2014. — 159 с.
2. Беус, А.А. Геохимия окружающей среды / А.А. Беус, Л.И. Грабовская, Н.В. Тихонова. — М.: Недра, 1976. — 248 с.
3. Ермаков В.В. Биологическая индикация микроэлементозов / В.В. Ермаков, С.Ф. Тютюков, В.А. Сафонов. — М., 2018. — 386 с.
4. Замана, С.П. Определение химического элементного состава волосяного покрова у крупного рогатого скота / С.П. Замана // Сельскохозяйственная биология. — 2006. — № 4. — С. 121–125.
5. Ковальский, В.В. Геохимическая экология / В.В. Ковальский. — М.: Наука, 1974. — 302 с.
6. Методические рекомендации по применению животным новых препаратов на основе микроэлементов и витаминов (антианемин, антианемин-форте, неовитселен, наноселен, антимиопатик, антимиопатик-2) / М.П. Кучинский [и др.]. — Минск, 2015. — 16 с.
7. Самохин, В.Т. Профилактика нарушений обмена микроэлементов у животных / В.Т. Самохин. — Воронеж: ВГУ, 2003. — 136 с.
8. Goff J. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid-base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status / J. Goff // J. Dairy Sci. — 2018. — Vol. 101, № 4. — P. 2763–2813.
9. Juknevičius, S. The content of mineral elements in some grasses and legumes / S. Juknevičius, N. Sabienė // J. Ekologija. — 2007. — Vol. 53, № 1. — P. 44–52.

10. Importance of micro minerals in reproductive performance of livestock / S. Kumar [et al.] // *Veterinary World*. — 2011. — Vol. 4, № 5. — P. 230–233.
11. The content of toxic elements in hair of dairy cows as an indicator of productivity and elemental status of animals / S. Miroshnikov [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. — 2019. — Vol. 26. — P. 18554–18564.
12. Safonov, V.A. Biological role of selenium and correction effects of its content in the organism of animals / V.A. Safonov // *Geochemistry International*. — 2018. — Vol. 56, № 10. — P. 1046–1050.
13. Diselementosis as a risk factor of embryo loss in lactating cows / S. Shabunin [et al.] // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. — 2017. — Vol. 41, № 4. — P. 453–459.
14. Wilde, D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle / D. Wilde // *J. Animal Reproduction Science*. — 2006. — Vol. 96, № 3–4. — P. 240–249.

---

## THE USE OF THE DRUG «ANTIMIOPATIK» FOR THE CORRECTION OF REPRODUCTIVE DISORDERS IN COWS ASSOCIATED WITH DEFICIENCY OF TRACE ELEMENTS

---

*Safonov V.A.<sup>1</sup>, Lyapko N.I.<sup>2</sup>, Chernitsky A.E.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*V.I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry,  
Moscow, Russia;*

<sup>2</sup>*OAO Turino-Agro, Turino, Republic of Belarus;*

<sup>3</sup>*All-Russia Research Veterinary Institute of Pathology,  
Pharmacology and Therapy, Voronezh, Russia*

**Summary.** *The effectiveness of the «Antimiopathic» drug usage (0.8 ml of selenium, 0.4 mg of manganese, 0.2 mg of zinc, 0.1 mg of copper, 0.02 mg of cobalt, 40 mg vitamin E and 30,000 IU of vitamin A per 1 ml) for correction the reproductive disorders associated with polyhypomicroelementosis in cows was studied in the biogeochemical province of the Republic of Belarus. A relationship between the indicators of the reproductive function of animals and the content of selenium, manganese, and cobalt in their bodies was found.*

## РОЛЬ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

*Семененя И.Н.*

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

**Резюме.** В статье представлен обзор литературных и собственных данных о роли гормонов щитовидной железы в регуляции процессов жизнедеятельности в норме и при патологии. Описаны процессы биосинтеза, секреции и катаболизма йодсодержащих гормонов (тироксина, трийодтиронина) и кальцитонина, молекулярные и клеточные механизмы их действия, эффекты влияния на органы и ткани, физиологические системы организма в норме и при различных нарушениях жизнедеятельности. Представлены сведения о гуморальной, нервной и иммунной регуляции функциональной активности щитовидной железы, секреторной активности органа в онтогенезе.

Формирование представлений о функциональном значении щитовидной железы берет начало с первой половины 19-го века, когда впервые в 1836 г. Кингом Т. на основании результатов экспериментальной тиреоидэктомии (Шифф П.) была сформулирована концепция об инкреторной активности этого органа [54, 80]. В 1895-1896 гг. Бауманом Е. была установлена тесная связь функционирования железы с поступлением в нее йода и образованием тиреоглобулина [65, 66, 81]. Первым йодсодержащим гормоном щитовидной железы, выделенным из тиреоглобулина в 1915 г. Кендалом Э., был тироксин, вторым — трийодтиронин (1952 г., Гросс М.) [2, 20]. В 60-х годах 20-го в. Коппом Д. с сотрудниками впервые получены данные о существовании третьего гормона щитовидной железы кальцитонина, отличающегося от первых двух отсутствием йода в молекуле [20, 21]. Таким образом, физиологическая роль щитовидной железы заключается в выработке трех гормонов. Два из них — тироксин и трийодтиронин (тиреоидные гормоны) — обладают сходными свойствами и широким спектром влияния на метаболические реакции и физиологические процессы в организме, третий — кальцитонин (тиреокальцитонин) — характеризуется относительно узконаправленным действием регулируя в основном, фосфорно-кальциевый обмен.

Щитовидная железа отличается весьма интенсивным кровоснабжением и занимает по этому показателю 1-е место среди других органов и тканей. В течение 1 мин. через каждый грамм ее ткани протекает в среднем 5,6 мл крови, в то время как в почках (втором по интенсивности кровоснабжения органе) эта величина составляет всего 1,5 мл [20, 80]. Такая особенность железы свидетельствует о ее высокой секреторной активности и, следовательно, особой физиологической значимости. Щитовидная железа — единственная эндокринная железа, имеющая настолько большой запас гормонов (тиреоидных), что его, в обычных условиях жизнедеятельности, может хватить на 2 мес. [35]. Название железе дал в 1656 г. Уортон Т. за сходство со щитом. Среди эндокринных желез щитовидная железа — первая, за исследования которой в области физиологии, патологии и хирургии которой была присуждена Нобелевская премия (швейцарскому хирургу Кохеру Э. в 1909 г.) [37, 72].

# ТИРЕОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

## Метаболизм гормонов

*Биосинтез.* Основными компонентами для синтеза тиреоидных гормонов являются йод и аминокислота тирозин. Йод относится к микроэлементам и поступает в организм человека в основном (на 90%) с пищей, главным образом растительного происхождения (особенно богаты йодом морские продукты — рыба, капуста и др.); остальные 10% извлекаются из питьевой воды и воздуха [21, 23, 24, 44]. Значительная часть этого микроэлемента всасывается преимущественно в виде йодидов (калия и натрия) и небольшое количество — в органической форме (например, йодированные жирные кислоты), превращаясь затем в йодиды в печени [38, 44, 54]. Суточная потребность взрослого человека в нем составляет 100-200 мкг (минимальная — около 50 мкг). За всю жизнь человек потребляет в среднем 12-13 г йода. Общее содержание йода в организме взрослого человека составляет 20-50 мг, из них до 80% находится в щитовидной железе. Концентрация в ней йода в 30-40 раз выше, чем в плазме крови (0,3 мкг/л) [44, 64, 80, 81].

Биосинтез тиреоидных гормонов осуществляется следующим образом. Вначале в клетках фолликулярного эпителия (тиреоцитах) синтезируется гликопротеин тиреоглобулин, составляющий приблизительно 10% от массы щитовидной железы, который выделяется в просвет фолликулов и конденсируется в виде коллоида. Параллельно с этим тиреоциты активно, против электрохимического и концентрационного градиентов с затратой энергии АТФ захватывают из крови ионы йода с помощью йодидного насоса, локализованного в базальной мембране ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$  симпортер — NIS, трансмембранный белок-переносчик, гликопротеин, транспортирующий внутрь тиреоцита два иона  $\text{Na}^+$  и один ион  $\text{I}^-$ ). Транспорт йодид-ионов через апикальную мембрану тиреоцитов в фолликулярное пространство осуществляется путем их перемещения через специфические йодные ТТГ-зависимые каналы и с помощью трансмембранного ТТГ-независимого белка-переносчика пендрина. Апикальная поверхность тиреоцитов покрыта мелкими ворсинками; имеются единичные псевдоподии, кроме того, каждая клетка имеет ресничку в просвете фолликула. Йодиды, транспортируясь через клетку, в цитоплазме тиреоцитов, на апикальной мембране или в просвете фолликула на поверхности раздела «клетка-коллоид» окисляются в присутствии перекиси водорода до молекулярного йода и других активных продуктов под влиянием йодпероксидазы (тиреопероксидазы) (около 2% йода остается в форме йодидов, которые легко вытесняются из железы одновалентными анионами, например, нитратами) [2, 45, 67, 75, 89, 99, 113, 137, 141]. Затем в просвете фолликула происходит йодирование активными формами йода ( $\text{I}^+$ ,  $\text{HOI}$ ) остатков аминокислоты тирозина, входящих в состав тиреоглобулина (1 молекула тиреоглобулина, включающая примерно 5500 аминокислотных остатков, содержит 130–134 остатка тирозина, из которых только 18–40 йодированы; установлено, что образование  $\text{T}_4$  является результатом йодирования тиреоглобулина по остаткам  $\text{Tyr}^5$  и  $\text{Tyr}^{130}$ ), с образованием моно- и дийодтирозинов (йод включается в 3-е, а затем в 5-е положение бензольного кольца тирозина), практически не обладающих гормональной активностью. Последующая окислительная конденсация остатка монойодтирозина с остатком дийодтирозина приводит к образованию в составе молекулы тиреоглобулина 3,5,3-трийодтиронина (трийодтиронин,  $\text{T}_3$ ), а конденсация двух остатков дийодтирозина дает 3,5,3,5-тетрайодтиронин (тироксин,  $\text{T}_4$ ). Соотношение синтезируемых  $\text{T}_4$  и  $\text{T}_3$  примерно 4:1 [65-69, 81, 82, 92]. Тиреоидные гормоны, таким образом, содержатся в составе молекул тиреоглобулина, который является формой их внеклеточного хранения. Общее содержание йода в тиреоглобулине составляет обычно 0,2-1,0%. На-

ряду с тиреоглобулином тиреоциты синтезируют также тиреоальбумин, который также йодирован до стадии йодтирозинов, но не участвует в образовании тиреоидных гормонов; соотношение тиреоглобулина и тиреоальбумина в норме составляет 9:1. Показано, что 90% тиреоглобулина, синтезированного в тиреоците, поступает через апикальную мембрану в полость фолликула, а остальные 10% - через базальную мембрану в межклеточное пространство, а оттуда в небольшом количестве в системный кровоток [45, 75, 81].

Показано, что высокая метаболическая активность щитовидной железы сочетается с высокой активностью процессов свободнорадикального окисления в ней, избыточная стимуляция которых приводит к повреждению железы и нарушению ее функциональной активности [45].

*Секреция.* Для выведения тиреоидных гормонов из полости фолликулов во внутреннюю среду организма необходимо обратное поступление уже йодированного тиреоглобулина в тиреоциты, осуществляющееся путем эндоцитоза (фаго- и пиноцитоза). В тиреоцитах йодтиреоглобулин подвергается гидролизу лизосомальными ферментами (протеазами, пептидазами и др.) с высвобождением  $T_4$  и  $T_3$ , а также моно- и дийодтирозинов (йодтирозины и йодтиронины тиреоглобулина находятся в следующих соотношениях: 5-8% —  $T_3$ , 17-23% — монойодтирозин, 25-42% — дийодтирозин, 35% —  $T_4$ ). Тиреоидные гормоны через базальную мембрану тиреоцитов поступают в перикапиллярное пространство, а оттуда в кровеносные и отчасти лимфатические капилляры. За сутки щитовидная железа секретирует 80-100 мкг  $T_4$  и 4 мкг  $T_3$ . Йодтирозины в тиреоцитах полностью дейодируются под влиянием дейодиназы и в кровоток как правило не поступают. Освободившийся из них йод в основном используется для синтеза тиреоидных гормонов; небольшое его количество (10%) выделяется в кровь. Микроколичества тиреоглобулина также могут попадать в кровь, где период полураспада белка составляет 4 суток. Различные заболевания щитовидной железы (рак, тиреоидиты и др.), приводящие к повышению проницаемости тиреогемаического барьера, характеризуются увеличением выхода тиреоглобулина в кровоток и возрастанием его концентрации в крови [20, 26, 52, 60, 65-69, 71, 75, 80-82].

*Катаболизм.* Тиреоидные гормоны в крови находятся в свободной и связанной (в основном с белками) форме. Часть гормонов связана с форменными элементами крови, преимущественно эритроцитами, которые могут выполнять функцию депо  $T_3$  и  $T_4$ . Биологически активными являются только свободные гормоны, концентрация которых в крови значительно меньше, чем связанных. Содержание свободного  $T_4$  составляет 0,02–0,04% от общего количества  $T_4$ , а концентрация свободного  $T_3$  — 0,2–0,4% от общего  $T_3$  [20, 31, 68, 69, 71, 81, 166]. В связи с этим концентрацию белково-связанного йода в крови часто рассматривают как показатель секреторной активности щитовидной железы [20, 81]. Основным циркулирующим гормоном является  $T_4$ , связанная форма которого на 70% представлена комплексом с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), на 20% — с тироксинсвязывающим преальбумином (ТСПА) и на 10% — с альбумином. Связанный  $T_3$  также представлен комплексами с этими белками приблизительно в такой же пропорции, однако, его сродство к ТСГ и ТСПА существенно меньше, чем у  $T_4$ . Небольшая часть гормонов связана с апопротеинами липопротеинов (особенно липопротеинов высокой плотности), иммуноглобулинами (преимущественно IgM) другими белками. Связывание гормонов с белками защищает их от разрушения, препятствует потере через почки, формирует депо гормонов в крови и служит буфером, т.е. обеспечивает регуляцию необходимого уровня активных (свободных) гормонов в крови. Период полураспада  $T_4$  составляет 4–7, а  $T_3$  — 1–3 суток. Концентрация общего  $T_4$  в плазме крови у здоровых взрослых людей варьирует в пределах 60–140 нмоль/л, а уровень общего  $T_3$  — 1,2–2,2 нмоль/л. Циркулирующий в крови  $T_4$

содержит  $s$  всего йода крови, а на йодиды приходится 21-30%. Выявлены суточные ритмы колебания уровня гормонов в крови. Максимальное содержание  $T_4$  выявляется утром, а минимальное — ночью. Для  $T_3$  такой зависимости не обнаружено. Незначительное повышение его уровня отмечено с 2 до 8 часов [17, 20, 21, 30, 32, 34-36, 51].

В норме до 80%  $T_3$  образуется в периферических тканях из  $T_4$  путем его внутриклеточного монодейодирования (в эндоплазматическом ретикулуме, а также на плазматической мембране) специфической дейодиназой (известно 3 типа дейодиназ). При этом, в результате отщепления йода не от внешнего фенольного кольца молекулы тироксина, а от внутреннего тирозильного образуется небольшое количество так называемого обратного или реверсивного  $T_3$  (3,3,5-трийодтиронин,  $rT_3$ ), который, как считается, в физиологическом отношении не активен (около 50% всего  $rT_3$  секретируется щитовидной железой, где он образуется в результате внутриклеточного [в тиреоцитах] монодейодирования тироксина или путем конденсации моно- и дийодтирозинов; его среднее содержание в крови, где он связан с ТСГ, ТСПА и альбумином, составляет 0,6 нмоль/л). Этот процесс рассматривается как способ выведения избытка  $T_3$  из обмена веществ, особенно в тех случаях, когда преобладают катаболические процессы. Однако получены данные о том, что  $rT_3$  влияет на цитоскелет астроцитов, вызывая полимеризацию актина, и значительно повышает противовирусную активность интерферона- $\gamma$  в клетках HeLa. При циррозе печени, токсикозах беременности, ожогах, лихорадке, голодании, после хирургических операций, при других патологических состояниях и процессах образование  $rT_3$  существенно возрастает, и в связи с этим изменения величины соотношения  $T_3/rT_3$  приобретают диагностическое значение. Скорость метаболизма  $T_3$  в несколько раз (до 10 раз) больше, чем  $T_4$ . Приблизительно 75% всего  $T_4$  катаболизируется в печени; при этом образуется около 35%  $T_3$  и 40%  $rT_3$ . Кроме реакций дейодирования распад гормонов происходит путем дезаминирования, декарбоксилирования и разрыва дифенилэфирной связи в молекулах с образованием, в частности, тетра- и трийодтироуксусных кислот. В печени продукты распада гормонов конъюгируются с глюкуроновой и серной кислотами, затем поступают в желчь, а с ней — в кишечник. Освобожденный йод частично всасывается и с током крови поступает обратно в щитовидную железу, где вновь используется для синтеза тиреоидных гормонов. Небольшая его часть выводится слюнными, другими пищеварительными, а также потовыми железами. Основная часть йодидов выводится с мочой. Из общего количества  $T_3$  в организме 20% выводится в неизменном виде с мочой и калом [1, 9, 51, 54, 64, 103, 111, 117, 129, 138, 156].

#### **Механизмы действия**

Многообразные эффекты действия тиреоидных гормонов в организме обуславливаются прежде всего связыванием их с клеточными рецепторами практически всех органов и тканей (считается, что к тиреоидным гормонам у взрослых людей нечувствительны или малочувствительны головной мозг, семенники, семенные пузырьки и селезенка). Физиологические эффекты тиреоидных гормонов на 70% обусловлены трийодтиронином. Его гормональная активность в 3-10 раз выше, чем у тироксина. Эффекты действия в организме  $T_3$  развиваются гораздо быстрее по сравнению с  $T_4$ . Учитывая эти данные сформировалось представление о тироксине как прогормоне, являющемся транспортной формой  $T_3$ . Однако есть основания считать, что  $T_4$  занимает свою биологическую нишу в системе гормональной регуляции функций организма. Так, например, существуют рецепторы, специфичные для  $T_3$  и  $T_4$ ;  $T_4$  оказывает более выраженное стимулирующее влияние на процессы эритропоэза, активность протеинкиназы C и  $Ca^{2+}$ -АТФазы в эритроцитах, чем  $T_3$ ;  $T_4$ , в отличие от  $T_3$ , стимулирует тромбоцитопоэз, влияет на цитос-

келет астроцитов путем индукции полимеризации сократительного белка актина, изменяя при этом количество молекул йодтиронин-5-монодейодиназы II типа, локализованной в плазматической мембране этих клеток.  $T_4$  является основным лигандом для рецептора, содержащегося на внеклеточном домене интегрина  $\alpha v \beta 3$  плазматической мембраны. Связываясь с ним,  $T_4$  регулирует деление злокачественных и эндотелиальных клеток, защищает опухолевые клетки путем торможения апоптоза и активации ангиогенеза в опухолях, поддерживает метастазирование, радиорезистентность и химиорезистентность опухолевых клеток. Молекулярные механизмы этих эффектов включают передачу сигнала через митоген-активированную протеинкиназу и фосфатидилинозитол-3-киназу, дифференциальную экспрессию генов, связанных с указанными клеточными процессами, регуляцию активности других белков клеточной поверхности, таких как рецепторы фактора ангиогенеза опухолей и др. [18, 50, 54, 57, 81, 86, 91, 102, 114, 164].

Рецепторы тиреоидных гормонов являются белками и обнаружены в плазматической мембране клеток, цитоплазме, внутренней мембране митохондрий, хроматине клеточных ядер. Продемонстрировано даже угнетающее влияние тиреоидных гормонов на функциональную активность н-холинорецепторов. Действие тиреоидных гормонов на рецепторы плазматических мембран клеток приводит к активации аденилатциклазной системы,  $Na^+, K^+$ -АТФазы, протеинкиназы С,  $Ca^{2+}$ -АТФазы (в присутствии комплекса кальмодулин- $Ca^{2+}$ ), инактивации  $Na^+$ -каналов в миокардиоцитах с увеличением длительности потенциалов действия, изменению скорости трансмембранного переноса ионов, аминокислот, глюкозы и др. веществ, усилению образования ц-3,5-АМФ, который запускает каскад внутриклеточных биохимических реакций (активация протеинкиназ, фосфорилирование различных белков и т.д.), приводящих, в конечном итоге, к развитию тех или иных физиологических эффектов. Проникновение гормонов через плазматические мембраны внутрь клеток, в частности, эритроцитов, может осуществляться с помощью переносчиков. Так, трансмембранный перенос  $T_4$  может обеспечивать ТСГ. Существуют энергозависимые транспортные системы переноса тиреоидных гормонов внутрь клеток, сопряженные с транспортом некоторых аминокислот и  $Na^+$ - $H^+$ -обменом. В митохондриях тиреоидные гормоны в физиологических концентрациях усиливают тканевое дыхание и синтез АТФ, в частности за счет активации образования митохондриальных белков, участвующих в транспорте электронов, цикла трикарбоновых кислот, поставляющего доноров электронов, повышения активности адениннуклеотидтранслоказы с увеличением захвата митохондриями АДФ, стимуляции АТФ-синтазы и усиления поглощения фосфата. В токсических же концентрациях они вызывают разобщение окисления и фосфорилирования на внутренней мембране митохондрий (в частности, за счет активации экспрессии генов разобщающих белков) и снижение синтеза АТФ, приводя к рассеиванию энергии в виде тепла. Важным свойством тиреоидных гормонов является их высокая антиоксидантная активность [3, 13, 29, 43, 52, 55, 56, 90, 91, 94-96, 108, 112, 119, 124, 136, 138, 139, 143-145, 162, 173].

Точкой приложения действия тиреоидных гормонов в комплексе со своими рецепторами в ядре клеток является ДНК, где они активируют транскрипцию, синтез РНК и белка (сродство ядерных рецепторов к  $T_3$  в 4-10 раз выше, чем к  $T_4$ ). При этом усиливается экспрессия генов многих ферментов, участвующих в важнейших метаболических реакциях организма, активируются процессы пролиферации и дифференцировки клеток. Некоторые транскрипционные процессы подавляются тиреоидными гормонами. Ядерные рецепторы тиреоидных гормонов кодируются двумя протоонкогенами — *c-erbA*, один из которых у человека расположен на  $\alpha$ -локусе 17-й хромосомы, другой — на  $\beta$ -локусе 3-й хромосомы. В настоящее время известны

четыре основные изоформы таких рецепторов: TR $\alpha$ -1, TR $\alpha$ -2, TR $\beta$ -1 TR $\beta$ -2. Каждый рецептор имеет ДНК-связывающий участок, одним из важнейших элементов которого являются «цинковые пальцы», T<sub>3</sub>-связывающий локус и димеризационный домен для взаимодействия (димеризации) с другими ядерными белками [16, 52, 77, 81, 93, 120, 149, 151].

Количество рецепторов к тиреоидным гормонам варьирует в зависимости от их концентрации в организме, что свидетельствует о наличии механизма саморегуляции чувствительности клеток к уровню этих гормонов. Так, например, количество ядерных T<sub>3</sub>-рецепторов в лимфоцитах больных гипотиреозом в 3 раза выше, чем у здоровых лиц, что увеличивает эффект действия гормонов при их недостаточной концентрации в организме. После соответствующей гормонотерапии количество рецепторов снижается до нормальных значений. При гипотиреозе в несколько раз возрастает активность 5-дейодиназы II типа (которая превращает T<sub>4</sub> в значительно более активный T<sub>3</sub>) в клетках головного мозга, что также направлено на усиление эффектов центрального действия тиреоидных гормонов в условиях их недостатка в организме. В основе многих эффектов тиреоидных гормонов лежит их способность оказывать перmissive (разрешающее) действие в отношении чувствительности тканей организма к действию катехоламинов, т.е. T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> повышают чувствительность адренорецепторов к норадреналину и адреналину и увеличивают плотность некоторых адренорецепторов на поверхности клеток (T<sub>3</sub>, например, повышает количество  $\beta$ -адренорецепторов в плазмалемме кардиомиоцитов). Этот феномен проявляется, например, в том, что малые дозы катехоламинов в условиях избытка тиреоидных гормонов в организме могут вызывать весьма значительные эффекты. В настоящее время активно изучаются механизмы так называемых синдромов низкой и высокой резистентности периферических тканей организма к действию тиреоидных гормонов [10, 52, 54, 60, 70, 76, 102, 167].

### **Эффекты действия тиреоидных гормонов в организме**

Тиреоидные гормоны вызывают в организме многообразные физиологические эффекты. Они необходимы для обеспечения процессов роста и развития организма, дифференцировки тканей, регуляции обмена веществ и энергии, поддержания определенного уровня активности физиологических и функциональных систем организма, развития адаптационных реакций.

*Рост тела, костная и мышечная системы.* Физиологическое действие тиреоидных гормонов проявляется в обеспечении роста тела, органов и тканей, процессов энхондрального окостенения, дифференцировки мышечных волокон быстрого и медленного типа, нарастания их массы, повышения тонуса и сократительной активности мышц. Так, например, в клетках костной и хрящевой тканей (остеобластах, остеоцитах, хондроцитах) тиреоидные гормоны изменяют экспрессию некоторых регуляторных генов (c-jos, c-jun), ростовых факторов, маркеров костеобразования (белка остеокальцина — gla-белок, щелочной фосфатазы), ускоряя дифференцировку остеобластов, участвующих в построении костной ткани. Анаболическое действие тиреоидных гормонов реализуется также через индукцию образования соматотропного гормона (СТГ), увеличение содержания в тканях инсулиноподобных факторов роста. Снижение функции щитовидной железы в детском возрасте может приводить к задержке роста, запаздыванию оксификации скелета, прорезывания и развития зубов, уменьшению тонуса и силы скелетных мышц, замедлению их сократимости и удлинению сухожильных рефлексов. При тиреотоксикозе также уменьшается масса тела, появляется мышечная слабость, развивается атрофия мышц, уменьшается доля красных мышечных волокон и нарушается их строение, повышается интенсивность метаболизма в костной ткани, снижается ее минеральная плот-

ность, формируется остеопороз. При этом увеличивается количество макрофагов костной ткани — остеокластов, разрушающих кость, подавляется активность остеобластов, стимулируется их апоптоз, нарушается соотношение резорбционных и костеобразующих пространств, возрастает площадь неминерализованного матрикса, происходит потеря оссеомукоида (катаболическое действие избытка тиреоидных гормонов может, в частности, опосредоваться через индукцию образования цитокинов — интерлейкина-1 и интерлейкина-6, активирующих остеокласты) [1, 5, 16, 20, 21, 25, 33, 109, 148, 168].

*Нервная система.* Тиреоидные гормоны необходимы для нормального созревания мозговой ткани. Развитие мозга ребенка в значительной мере зависит от уровня  $T_4$  в сыворотке крови, так как 80% необходимого нейронам коры больших полушарий головного мозга  $T_3$  получается именно из  $T_4$  крови, который превращается в  $T_3$  под влиянием 5-дейодиназы II типа в глиальных клетках. Тиреоидные гормоны усиливают экспрессию генов, кодирующих микротубулин-ассоциированные белки, изотубулины b-4, основной белок миелина, миелин-связанный гликопротеин, протеин-2 клеток Пуркинью, фактор роста нервов, RC-3 протеин, синапсин I и др., обеспечивают связывание ламинина (основного компонента матрикса в развивающемся мозге) с белками-интегринами плазматической мембраны астроцитов, которые стабилизируются в ней микрофиламентами актина, полимеризацию которого вызывают  $T_4$  и  $rT_3$ , влияют на деление нейробластов, дифференцировку нейронов и глиальных клеток, образование синапсов, миелинизацию, модулируют ( $T_3$ ) активность норадренергических нейротрансмиттерных систем, концентрируясь в норадренергических нейронах и др. [23, 54, 79, 85, 91, 92, 97, 102, 103, 117, 127, 133, 147, 158]. Их значение особенно велико в так называемый критический период формирования мозга, а именно — последний триместр беременности и первые недели после рождения (существует также мнение, что критический период имеет более широкие границы: начинается со второго триместра беременности и продолжается до 1-2 лет). Недостаток гормонов в этом периоде развития плода (при недоразвитии щитовидной железы) и у новорожденного приводит к значительным нейрохимическим и морфофункциональным нарушениям в мозгу (уменьшение массы головного мозга, снижение содержания в нем ДНК и белка, гипоплазия нейронов, уменьшение ветвления дендритов и образования межнейронных связей, биохимические дефекты синапсом, нарушение структуры цитоплазматических микротубул, ядерных и цитоплазматических  $T_3$ -рецепторов и др.) и проявляется в дальнейшем в различных формах кретинизма — умственной отсталости, нарушений роста, пропорций тела, спастической диплегии, глухоты и др. (в мире насчитывается более 40 млн. человек, страдающих умственной отсталостью, связанной с гипофункцией щитовидной железы в результате дефицита йода). В более легкой форме кретинизм протекает в случае снижения функции щитовидной железы (гипотиреоз), развившейся в детском возрасте [после 1,5 лет, когда основные процессы морфогенеза мозга (дифференцировка клеток, миелинизация нервных волокон и др.) в значительной мере завершены]. При кретинизме, а также снижении функциональной активности щитовидной железы у взрослых (микседема) замедляется мышление и речь, ослабевает внимание, восприятие и память, развивается апатия, сонливость и состояние, близкое к эмоциональной тупости, затрудняется аналитико-синтетическая деятельность и выработка условных рефлексов, снижается двигательная активность, нарушается функционирование обонятельного анализатора вплоть до anosмии, падает уровень постоянного потенциала мозга и др. [24, 32, 33, 38, 46, 49, 110, 122, 126, 127]. В случаях генетической предрасположенности к каталепсии снижение функциональной активности щитовидной железы увеличивает частоту развития этого нарушения [47]. Избыток тиреоидных гормонов при тиреотоксикозе приводит к значительному

повышению возбудимости нервной системы, снижению порога болевой чувствительности, возрастанию показателей постоянного потенциала мозга, что проявляется в повышенной раздражительности, беспокойстве, появлении чувства страха, развитии депрессий, нарушении сна, треморе пальцев рук, языка, туловища и др. Увеличение плотности опиатных рецепторов в мозге при тиреотоксикозе может быть связано с появлением гипоманиакальных и маниакальных состояний. Возбуждение симпатического отдела вегетативной нервной системы при этом приводит к соответствующим проявлениям симпатикотонии. Показано, что в динамике купирования алкогольного абстинентного синдрома в сыворотке крови возрастает содержание свободного  $T_3$ . Высказано предположение, что снижение содержания этого гормона может усиливать абстинентный синдром и тягу к алкоголю [19, 30, 32, 48, 73, 104, 131].

*Сердечно-сосудистая система.* Избыточное действие тиреоидных гормонов на сердечно-сосудистую систему проявляется тахикардией, имеющей отчасти рефлекторное происхождение, связанное с расширением периферических сосудов (при гипертиреозе тиреоидные гормоны вызывают расслабление гладкомышечных клеток сосудов, ослабляют реакцию сосудов на норадреналин), увеличением минутного объема кровотока, систолического артериального давления (под влиянием тиреоидных гормонов в миокарде увеличивается количество  $\beta_1$ -адренорецепторов, при возбуждении которых увеличивается частота и сила сердечных сокращений), появлением аритмий сердца (мерцательная аритмия, экстрасистолия). При гипотиреозе отмечается брадикардия, снижается сократительная способность миокарда (при этом усиливается апоптоз кардиомиоцитов) и артериальное давление с возрастанием тонуса артериальных сосудов, повышается риск развития некоторых сердечно-сосудистых заболеваний в результате повышения в крови уровня холестерина, гомоцистеина, I и VII плазменных факторов свертывания крови со сдвигом баланса активности свертывающей и противосвертывающей систем крови в сторону гиперкоагуляции [5, 19, 20, 39, 61, 72, 81, 107, 128, 130, 160, 165].

*Дыхательная система.* Тиреоидные гормоны стимулируют развитие всех компонентов легких. Изменения со стороны системы дыхания при гипертиреозе проявляются одышкой, увеличением частоты дыхательных движений и минутного объема дыхания, повышении потребления кислорода и выделения углекислого газа. При тиреотоксикозе развивается слабость дыхательных мышц, снижение растяжимости легочной ткани, уменьшение жизненной емкости легких, снижение диффузионной способности аэрогематического барьера. При гипотиреозе показатели внешнего дыхания также снижаются. Обнаружена способность тиреоидных гормонов облегчать выведение альвеолярной жидкости и уменьшать тяжесть повреждения легких, вызванного гипоксией, влияя, в частности, на экспрессию аквапорина 5 в легких [5, 19, 20, 33, 154].

*Желудочно-кишечный тракт.* Тиреоидные гормоны усиливают моторную и секреторную активность желудка и кишечника. Особенно заметно это проявляется при тиреотоксикозе в виде диареи, тошноты, рвоты, а также повышения аппетита при легкой и средней степени тяжести болезни. При гипотиреозе снижается аппетит, тормозится моторная, секреторная и всасывательная функция желудка и кишечника, развиваются метеоризм, запоры [5, 19, 20, 33, 170].

*Репродуктивная система.* Тиреоидные гормоны необходимы для созревания и поддержания функциональной активности репродуктивной системы организма. Тиреоидэктомия, например, приводит к угнетению выработки люлиберина, лютеинизирующего гормона и тестостерона [86]. При врожденном гипотиреозе и снижении функции щитовидной железы в детском возрасте уменьшается число и функциональная активность клеток Сертоли в семенных канальцах. Ослабление функции щитовидной железы в зрелом возрасте приводит к снижению либидо,

развитию олигоспермии и импотенции. У женщин фертильного возраста при гипотиреозе возникает функциональная недостаточность яичников и нарушается менструальный цикл (тиреоидные гормоны увеличивают чувствительность яичников к гонадотропным гормонам, эндометрия — к эстрогенам), в регионах с дефицитом йода у женщин увеличивается частота спонтанных аборт, мертворожденных, врожденных аномалий, отмечается повышенная перинатальная и детская смертность; при гипертиреозе также развиваются овариальные нарушения и снижается фертильность (известно, что избыток  $T_3$  через рецептор  $TR\alpha-1$  нарушает функционирование рецепторов эстрогенов —  $ER\alpha$ ) [11, 15, 27, 29, 33, 115, 132, 153, 155].

*Иммунная система.* Тиреоидные гормоны обладают иммуностимулирующим действием. Оно проявляется, в частности, в гиперплазии тимуса, лимфатических узлов и селезенки, повышении количества лимфоцитов в крови при гипертиреозе, увеличении массы лимфоузлов после введения тироксина, атрофии тимуса после тиреоидэктомии, восстановлении реакции гиперчувствительности замедленного типа и усилении реакции бласттрансформации лимфоцитов, сниженными при гипотиреозе, под влиянием тироксина и т.д. Показано, что такое действие тиреоидных гормонов может реализовываться через тимус, так как после тимэктомии введение  $T_4$  не вызывает лимфоцитостимулирующего эффекта. Под влиянием тиреоидных гормонов значительно возрастает иммуномодулирующая и противовирусная активность интерферона- $\gamma$ . Последними исследованиями установлено, что тяжесть течения коронавирусной инфекции COVID-19 коррелирует с уровнями ТТГ и  $TT_3$  в сыворотке крови. Так, у пациентов с COVID-19 содержание этих гормонов было значительно ниже, чем у контрольной группы здоровых лиц и пациентов с пневмонией без COVID-19. И чем тяжелее COVID-19, тем ниже были уровни ТТГ и  $TT_3$  [21, 54, 74, 76, 88, 172].

*Кроветворение.* Под влиянием тиреоидных гормонов усиливается эритропоэз. Такое действие тиреоидных гормонов может быть прямым и опосредованным. Так,  $T_3$  и  $T_4$  прямо усиливают пролиферативные процессы в эритроидных колониях, причем  $T_4$  оказывает более выраженное влияние, чем  $T_3$ , что доказано в опытах *in vitro*. Фармакологическая блокада  $\beta_2$ -адренорецепторов плазматических мембран клеток-мишеней отменяет стимуляцию пролиферации эритроидных колоний под влиянием тиреоидных гормонов, что указывает на определенную связь механизма такого действия гормонов с  $\beta_2$ -адренорецепторами. Как известно, возбуждение  $\beta_2$ -адренорецепторов приводит к повышению внутриклеточной концентрации ц-3,5-АМФ, который усиливает рост эритроидных колоний и синтез гемоглобина в присутствии эритропоэтина. Опосредованный путь активации эритропоэза тиреоидными гормонами может быть связан с увеличением под их влиянием потребности организма в кислороде в результате возбуждения нервной системы и активации метаболизма с развитием относительной гипоксии, которая усиливает выработку эритропоэтина в почках. Описанный эффект стимулирующего действия тиреоидных гормонов на эритропоэз лежит, по-видимому, в основе развития вторичного эритроцитоза с повышением уровня эритропоэтинов в крови у больных с гипертиреозом. При гипотиреозе нередко развивается железодефицитная анемия и лейкопения. Тиреоидные гормоны ( $T_4$ ) оказывают стимулирующее влияние на тромбоцитопоэз [50, 57, 83, 87, 98, 105, 114, 135].

*Энергетический обмен.* Тиреоидные гормоны повышают потребность организма в кислороде, его поглощение и утилизацию, т.е. обладают калоригенным действием, прямо активируя процессы образования тепла в калоригенных тканях (скелетные мышцы, печень, жировая ткань) и повышают возбудимость центров терморегуляции (потребление кислорода тканью мозга не изменяется), что приводит к смещению установочной точки («set-point») на более высокий уровень регуляции температуры тела. Этим объясняется повышение основного обмена и раз-

витие небольшой гипертермии при гипертиреозе и снижение температуры тела при гипотиреозе. Адаптация к холоду способствует повышению в крови у людей и животных уровня  $T_3$ , который, в частности, является индуктором экспрессии в буром жире, печени и почках йодтирониндейодиназы, способствующей увеличению адренергической реактивности бурого жира.  $T_3$ , также, приводит к увеличению экспрессии разобщающих белков (UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5), разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях и выработки тепла. Калоригенное действие тиреоидных гормонов проявляется, в частности, потемнением подкожной белой жировой ткани, что свидетельствует об увеличении теплопродукции в ней. Установлено, в частности, что стимулированный  $T_3$  мышечный термогенез реализуется через активацию рецепторов TR $\alpha$ -1 и транскрипцию генов *sarcolipin* и UCP3. Повышение температуры тела при лихорадке также связано с действием тиреоидных гормонов, концентрация которых в крови при этом заметно возрастает. В то же время во многих случаях затяжного субфебрилитета уровень тиреоидных гормонов (свободных и связанных) в крови понижается, что можно рассматривать как компенсаторную реакцию организма, направленную на ограничение образования тепла и восстановление температурного гомеостаза. Усиленная выработка тиреоидных гормонов является характерной реакцией организма на действие низких внешних температур, и длительное нахождение в условиях холода приводит к гипертрофии щитовидной железы. Увеличение основного обмена после приема пищи также, в значительной степени, связано с увеличением выброса (в 3-5 раз) в кровотоки тиреоидных гормонов [7, 40, 42, 58, 59, 121, 142, 146, 157, 159, 169].

*Состояние гипобиоза.* Известно, что значительное физиологическое угнетение функциональной активности щитовидной железы необходимо для развития зимней спячки у животных. Так, добавление в пищу сушкам порошка щитовидной железы отменяет развитие этого естественного состояния, а введение метилтиоурацила ускоряет его [134]. По-видимому, такое изменение активности щитовидной железы может иметь место и при развитии летаргического сна у человека.

*Белковый обмен.* В физиологических концентрациях  $T_3$  и  $T_4$  совместно с СТГ стимулируют синтез белка. Избыток тиреоидных гормонов при тиреотоксикозе активирует синтез и распад белка, причем катаболическое действие преобладает над анаболическим, что приводит к отрицательному азотистому балансу, снижению содержания белка в крови, массы тела, мышц. Для гипотиреоза характерно увеличение содержания альбуминов в крови и спинномозговой жидкости, нарушение синтеза коллагена [5, 20, 33, 81, 140].

*Жировой обмен.* Тиреоидные гормоны играют важную роль в липогенезе, бета-окислении жирных кислот и метаболизме холестерина. Пациенты с гипотиреозом имеют более высокие уровни липопротеинов низкой плотности, триацилглицеролов и аполипопротеина В. Даже у эутиреоидных пациентов более низкие уровни тироксина связаны с более высокими уровнями общего холестерина, липопротеинов низкой плотности и триацилглицеролов. Риск неалкогольной жировой болезни печени увеличивается при более низких уровнях свободного тироксина и снижается — при более высоких. Под влиянием тиреоидных гормонов изменяется состав липидов мембранных структур клеток различных тканей, жирнокислотный состав липидов хроматина и др. Тиреоидные гормоны усиливают синтез холестерина, одновременно ускоряя его катаболизм и выведение с желчью. Причем катаболическое действие гормонов преобладает над анаболическим в отношении обмена этого стероида. Заметное снижение содержания холестерина в крови является характерным признаком гипертиреоза (при гипотиреозе уровень холестерина в крови заметно возрастает) и противодействию-

ет развитию атеросклероза в условиях гиперфункции щитовидной железы. Тиреоидные гормоны активируют липолиз (отчасти за счет возбуждения  $\beta_3$ -адренорецепторов плазматической мембраны адипоцитов) и усиливают липолитическое действие катехоламинов, глюкагона, АКТГ и ТТГ. Одновременно активируется окисление жирных кислот. В то же время тиреоидные гормоны активируют связывание инсулина адипоцитами в результате увеличения количества мембранных рецепторов и повышения их сродства к гормону. Учитывая то, что инсулин стимулирует синтез жира, такое действие тиреоидных гормонов можно рассматривать как компенсаторное, направленное на ограничение возможного развития избыточной реакции липолиза. При гипотиреозе липогенез и липолиз заметно ослабевают; в крови увеличивается содержание липопротеинов промежуточной и низкой плотности [5, 14, 20, 33, 34, 81, 106, 121, 140].

*Углеводный обмен.* Тиреоидные гормоны ускоряют всасывание глюкозы в кишечнике, усиливают поглощение и окисление глюкозы в печени и мышцах, активируют гликогенолиз и гликолиз с уменьшением содержания в органах и тканях гликогена. Результатом этих процессов является увеличение содержания глюкозы в крови. Индукция гипотиреоза мерказолилом приводит к снижению уровня глюкозы в крови и истощению запасов гликогена в печени, миокарде и скелетных мышцах; скорость всасывания углеводов в кишечнике и поглощение глюкозы жировой и мышечной тканями заметно уменьшаются. При недостатке тиреоидных гормонов углеводы накапливаются в коже в виде глюкозаминогликанов и хондроитинсульфатов [5, 21, 33, 36, 54, 78, 81, 100, 101, 171].

*Водно-солевой обмен.* Тиреоидные гормоны в физиологических условиях усиливают диурез, выведение натрия и калия с мочой, потоотделение. Это может быть связано с увеличением секреции предсердного  $\text{Na}^+$ -уретического фактора в результате переполнения кровью предсердий и подавлением функциональной активности нейросекреторных клеток гипоталамуса, продуцирующих антидиуретический гормон (АДГ). Снижение секреции АДГ закономерно приводит к торможению реабсорбции воды в почечных канальцах и увеличению диуреза. Удаление надпочечников отменяет влияние тиреоидных гормонов на обмен натрия, что может свидетельствовать о реализации такого эффекта  $\text{T}_3$  и  $\text{T}_4$  через гормоны надпочечников. При тиреотоксикозе наблюдается активация  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы с накоплением  $\text{K}^+$  в клетках и развитием гипокалиемии; концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в крови при этом увеличивается в результате усиления резорбции костей; нередко отмечается появление отеков рук, ног, суставов, периорбитальных тканей в результате гипоальбуминемии и снижения онкотического давления. При недостатке тиреоидных гормонов наблюдается снижение скорости клубочковой фильтрации, уменьшение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в проксимальных канальцах нефрона, задержка воды, натрия и калия в организме. При этом снижается содержание в крови  $\text{Ca}^{2+}$ , ренина, альдостерона, предсердного  $\text{Na}^+$ -уретического фактора и повышается уровень АДГ [2, 5, 16, 21, 33, 36, 54, 81].

## КАЛЬЦИТОНИН

### Метаболизм

Кальцитонин, открытый в 1961 г., представляет собой полипептид, состоящий из 32 аминокислотных остатков. Он синтезируется в парафолликулярных «светлых» клетках [С-клетки (от англ. calcitonin) или К-клетки (рус. кальцитонин)], расположенных в прослойках соединительной ткани между фолликулами. Эти клетки относятся к диффузной нейроэндокринной системе (АПУД-системе) и вырабатывают кроме кальцитонина некоторые моноамины (дофа-

мин, норадреналин, серотонин), а также соматостатин. У человека кальцитонин вырабатывается аналогичными клетками также в тимусе и околощитовидных железах. Этот гормон, синтез которого детерминируется двумя генами —  $\alpha$  и  $\beta$ , расположенными на 11-й хромосоме, первоначально образуется в виде более крупной молекулы-предшественника (прогормона, состоящего из 141 аминокислотного остатка), которая под влиянием протеаз расщепляется с высвобождением активного гормона. В процессе образования кальцитонина от молекулы-предшественника отщепляется кроме того более мелкий пептид катакальцин, состоящий из 21 аминокислотного остатка и поначалу отнесенный к гормонам. В настоящее время его классифицируют как пептидный биорегулятор, участвующий наряду с кальцитонином в понижении уровня кальция в крови. Кальцитонин может находиться в мономерной, димерной и, возможно, полимерных формах, однако биологически активной является только мономерная форма гормона. Циркулирующий в крови кальцитонин, так же, как и тиреоидные гормоны, находится в свободном и связанном с белками виде. Период его полураспада составляет около 5 мин. Катаболизируется кальцитонин в почках, печени и, возможно, костной ткани [8, 16, 20, 22, 53, 54, 72, 75, 82].

### **Механизмы действия и физиологические эффекты**

Значение кальцитонина в организме обусловлено прежде всего его влиянием на обмен кальция, которое обусловлено в значительной степени активацией аденилатциклазы плазматических мембран клеток чувствительных к нему тканей, накоплением ц-3,5-АМФ и угнетением проницаемости клеточных мембран для  $\text{Ca}^{2+}$  (тормозится его активный транспорт из клеток). Кальций — жизненноважный элемент, ионы которого необходимы для обеспечения синаптической передачи нервных импульсов, секреторных процессов, мышечного сокращения, свертывания крови, межклеточного взаимодействия, реализации действия гормонов и других биологически активных веществ на клетки, регуляции проницаемости клеточных мембран, активности многих ферментов и др. По влиянию на фосфорно-кальциевый обмен кальцитонин выступает в роли антагониста паратгормона и активной формы витамина  $\text{D}_3$  — 1,25-дигидроксиголекальциферола, образование которой он угнетает в результате подавления активности фермента  $1\alpha$ -гидроксилазы в почках. Кальцитонин угнетает резорбцию костей, подавляя активность остеокластов и стимулируя функции остеобластов. В результате тормозится резорбция основного костного минерала — гидроксиапатита и усиливается его отложение в костях наряду с усилением образования коллагена, составляющего основу органического матрикса костной ткани. Кроме того, под влиянием кальцитонина подавляется всасывание кальция и фосфатов в кишечнике (уменьшается образование кальций-связывающего белка в энтероцитах) и тормозится их реабсорбция в почках (рецепторы к кальцитонину обнаружены в восходящей части петли Генле и дистальных канальцах нефрона), что приводит к увеличению экскреции кальция и фосфатов через кишечник и с мочой. При этом усиливается выведение из организма  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Косвенно вмешиваясь в регуляцию этих процессов кальцитонин также усиливает секрецию тиреоидных гормонов, выполняет функцию стресс-лимитирующего (антистрессового) фактора, ограничивая активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при действии на организм стрессовых раздражителей, подавляет выработку тиротропина, пролактина, инсулина, уменьшает частоту и увеличивает силу сердечных сокращений, обладает антиаритмическим и антигипертензивным действием, тормозит моторную и секреторную функции желудочно-кишечного тракта (секреция кишечного сока усиливается), ускоряет процессы регенерации тканей и т.д. [1, 2, 8, 16, 20, 22, 35, 36, 53, 54, 81].

# РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

## Гуморальная регуляция

*Регуляция секреции тиреоидных гормонов.* Существует трехуровневая система ключевого гуморального звена регуляции функциональной активности щитовидной железы: гипоталамус — гипофиз — щитовидная железа или тиролиберин — тиреотропный гормон — тиреоидные гормоны. В этой системе существуют прямые и обратные связи саморегуляции образования гормонов. Так, тиролиберин гипоталамуса активирует секрецию ТТГ в аденогипофизе (положительная прямая связь). ТТГ активирует секрецию тиреоидных гормонов щитовидной железой (положительная прямая связь). Избыток тиреоидных гормонов по механизму отрицательной обратной связи подавляет продукцию тиролиберина (длинная обратная связь), ТТГ (короткая обратная связь) и собственную продукцию, прямо угнетая секреторную активность тиреоцитов (ультракороткая обратная связь). ТТГ также может подавлять продукцию тиролиберина (короткая обратная связь), тиролиберин — собственную продукцию (ультракороткая обратная связь).

Основной функцией вырабатываемого в гипоталамусе трипептида тиролиберина (период полураспада его в крови составляет 2-4 мин) является активация секреции базофильными клетками аденогипофиза (тиреотрофоцитами) ТТГ, представляющего собой гликопротеин, состоящий из двух субъединиц —  $\alpha$  (92 аминокислотных остатка) и  $\beta$  (112 аминокислотных остатков). Биологическая специфичность ТТГ определяется  $\beta$ -субъединицей. Введение в организм тиролиберина вызывает быстрое высвобождение ТТГ, достигающее максимума через 5-10 мин. Кроме функции рилизинг-фактора ТТГ тиролиберин усиливает также секрецию пролактина и СТГ, модулирует эффекты ацетилхолина, норадреналина, дофамина и серотонина, обладает антидепрессивным и противонаркозным действием, стимулирует дыхание, влияя на респираторные нейроны ядра солитарного тракта продолговатого мозга, регулирует мнестические функции [1, 2, 6, 17, 21, 35, 36, 72, 82, 92, 123]. Выявлено также, что синтетический гормон тиролиберин (создан в Институте биоорганической химии НАН Беларуси) обладает антиалкогольными, нейро- и гепатопротекторными свойствами, уменьшает потребление этанола и коэффициент его предпочтения у экспериментальных животных в условиях сформированной алкогольной мотивации после лишения алкоголя, снижает проявления алкогольной абстиненции, выраженность деструктивных морфологических изменений в коре больших полушарий и мозжечке у крыс при хронической алкогольной интоксикации [28].

Тиролиберин поступает в аденогипофиз из мелких нейросекреторных клеток медиобазального отдела гипоталамуса по системе портальных сосудов и усиливает выработку ТТГ, воздействуя на специфические рецепторы плазматической мембраны тиреотрофоцитов. В результате активируется G-белок, фосфолипаза C, протеинкиназа C, аденилатциклаза, обеспечивающие каскад биохимических реакций с накоплением внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , что приводит к усилению синтеза и секреции ТТГ, субъединицы которого кодируются генами, расположенными на 1-й и 6-й хромосомах. Секреция тиролиберина зависит от баланса содержания норадреналина и серотонина в гипоталамусе: норадреналин усиливает образование и выделение тиролиберина, а серотонин, наоборот, тормозит эти процессы. К факторам, тормозящим секрецию тиролиберина, а также ТТГ, относятся соматостатин, вырабатываемый, в частности, в гипоталамусе, тиреоидные (особенно трийодтиронин) и глюкокортикоидные гормоны. Секреция ТТГ заметно снижается под влиянием серотонина и дофамина. Повышен-

ный уровень ТТГ в крови угнетает секрецию тиролиберина. ТТГ, содержание которого в плазме крови здорового человека составляет 0,3-5,0 мМЕ/л, а период полураспада равен 30-80 мин, имеет четкий суточный ритм секреции: его концентрация повышается до 200% в период ночного сна с максимумом между полуночью и 4 часами утра, а минимумом — в послеобеденное время. ТТГ связывается со специфическими рецепторами плазматической мембраны тироцитов и через активацию аденилатциклазной и фосфатидилинозитольной систем (фосфолипазой С),  $Ca^{2+}$ -зависимых нейтральных протеиназ (кальпаинов) и др. усиливает выработку тироидных гормонов, влияя практически на все стадии их синтеза и секреции. Установлено, что при гиперактивации рецепторов ТТГ у пациентов развивается синдром относительного  $T_3$ -токсикоза [1, 2, 6, 17, 20, 21, 35, 36, 54, 62, 63, 81, 82, 92, 163]. Повышение концентрации ТТГ в результате снижения уровня тироидных гормонов или йода в крови приводит к увеличению кровотока через железу, мобилизации запасов йода в ней, повышению эффективности экстракции йода тироцитами из крови, ускорению внутритироидного дейодирования свободного  $T_4$  с образованием  $T_3$ , увеличению соотношения  $T_3/T_4$  и др. При этом изменяется также объем тироцитов: при его недостатке они уплощаются, а при избытке гормона вытягиваются — становятся кубическими или цилиндрическими. Такие морфологические изменения в щитовидной железе являются основой для развития диффузного или узлового зоба в условиях недостаточного поступления йода в организм и усиления в связи с этим продукции ТТГ. Избыток йода в организме в нормальных физиологических условиях не приводит к угнетению секреции тироидных гормонов, в то время как при тироотоксикозе их продукция значительно подавляется высокими концентрациями йода в крови. Рецепторы ТТГ обнаружены также на мембранах жировых клеток, что обуславливает способность этого гормона стимулировать липолиз. Как уже упоминалось, между содержанием тироидных гормонов и секрецией ТТГ существует обратная зависимость: при повышении содержания  $T_3$  и  $T_4$  в крови тормозится выработка ТТГ, и наоборот, что характеризует наличие отрицательной обратной связи в системе гуморальной регуляции образования тироидных гормонов. При гипертиротропиновом тироотоксикозе нарушается функционирование этой связи между гипофизом и щитовидной железой, в результате чего в крови обнаруживаются высокие уровни как тироидных гормонов, так и ТТГ. Избыток тироидных гормонов может прямо угнетать секреторную активность тироцитов. Способностью подавлять синтез и секрецию тироидных гормонов обладают также глюкокортикоиды, интерлейкин-1,  $\alpha$ -фактор некроза опухолей, интерфероны. Обнаружена связь активности рецепторов печени LXR $\beta$  с подавлением тироидной функции. Периферическое введение в организм норадреналина, наоборот, приводит к увеличению концентрации тироидных гормонов в крови. Хорионический гонадотропин человека, стимулируя щитовидную железу, способствует селективному увеличению в крови уровня свободного  $T_4$ . Учитывая, что продукция ТТГ и тироидных гормонов зависит от уровня  $Ca^{2+}$  в тироцитах, регулировать этот процесс могут кальцитонин и паратгормон [1, 2, 6, 17, 20, 21, 35, 36, 54, 62, 63, 81, 82, 92, 121, 155, 161, 163].

Образование  $Na^+/I^-$  симпортера, участвующего в синтезе тироидных гормонов, стимулируется аденозином, хорионическим гонадотропином, подавляется избыточной концентрацией йода, эстрадиолом, интерлейкинами 1 $\alpha$  и 1 $\beta$ , интерлейкином-6,  $\alpha$ -фактором некроза опухолей,  $\beta$ -адреноблокаторами (атенолол, метопролол). Синтез белка пендринина, транспортирующего йодид-ионы из цитоплазмы тироцитов через апикальную мембрану в фолликулярное пространство, повышается при снижении концентрации тироглобулина [45, 141, 155].

## ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО НЕДОСТАТКА ИЛИ ИЗБЫТКА ЙОДА В ОРГАНИЗМЕ

### Недостаток йода в организме

Причинами дефицита йода в организме и развития йоддефицитных заболеваний являются недостаточное поступление микроэлемента с пищей и водой, нарушение всасывания йода в желудочно-кишечном тракте, угнетение процессов усвоения йода щитовидной железой, генетические дефекты синтеза тиреоидных гормонов, дефицит в окружающей среде и продуктах питания цинка, брома, меди, кобальта, молибдена, селена и избыток кальция, фтора, хрома, марганца [24].

Важно отметить, что даже в условиях нормальной обеспеченности организма йодом может наблюдаться относительная тиреоидная недостаточность, если при этом имеется дефицит, например, микроэлемента селена, недостаток которого характерен для населения Беларуси. Дело в том, что селен является кофактором дейодиназ (селеноэнзимы), превращающих тироксин в трийодтиронин, проявляющий в 3-10 раз более высокую метаболическую и физиологическую активность, чем  $T_4$ . Именно за счет сниженной активности  $T_4$ -дейодиназ и, соответственно, уменьшения образования  $T_3$ , и развивается относительная тиреоидная недостаточность. В условиях хронического дефицита йода происходит снижение синтеза и секреции тироксина и трийодтиронина с активацией секреции по принципу обратной связи ТТГ, стимулирующего все этапы синтеза тиреоидных гормонов. Избыток ТТГ вызывает увеличение щитовидной железы в результате гипертрофии (увеличения размеров клеток) и гиперплазии (увеличения количества клеток) с формированием диффузного, а затем и узлового зоба. Однако следует отметить, что йодная недостаточность не всегда приводит к гипотиреозу и, соответственно, увеличению продукции ТТГ [24, 45].

Компенсаторные реакции щитовидной железы, направленные на преодоление недостатка  $T_3$  и  $T_4$ , выражаются в увеличении ТТГ-зависимого и ТТГ-независимого захвата йода тиреоцитами, ускорения синтеза гормонов, снижения накопления тиреоглобулина в фолликулах, усиления протеолитических механизмов высвобождения гормонов из тиреоглобулина, изменения соотношения  $T_3$  и  $T_4$  в щитовидной железе в сторону преобладания  $T_3$  как значительно более активного гормона, ускорения конверсии  $T_4$  в  $T_3$  в периферических тканях [24, 45, 126].

#### *Избыток йода в организме.*

Несколько лет назад было выделено 10 стран с чрезмерным потреблением йода. Длительное потребление повышенного количества йода (с пищей, прежде всего, морепродуктами, йодированной солью, питьевой водой, лекарственными препаратами) может приводить к развитию как гипо- так и гипертиреоза. Формирование гипотиреоза может быть связано с уменьшением поглощения йода щитовидной железой (угнетение  $Na^+/I^-$  симпортера), ингибированием тиреопероксидазы, подавлением образования пероксида водорода, торможением окисления йодидов, синтеза и йодирования тиреоглобулина, угнетением конверсии  $T_4$  в  $T_3$  в периферических тканях. Высокие дозы йода могут приводить к апоптозу тиреоцитов, вероятно, за счет значительной активации свободнорадикальных процессов. Развитие гипертиреоза при высокой концентрации йода в организме изучено гораздо меньше [45, 99, 116, 118, 125, 152].

*Регуляция секреции кальцитонина.* Интенсивность секреции этого гормона определяется главным образом содержанием кальция в крови: повышение концентрации катиона в плазме крови увеличивает образование и выделение гормона, а снижение уровня кальция, наоборот, уменьшает продукцию кальцитонина. Повышение образования кальцитонина вызывают кате-

холамины, эстрогены, некоторые гастроинтестинальные гормоны — гастрин, панкреозимин, холецистокинин, энтеролюкагон, а также глюкагон, которые тем самым предотвращают гиперкальциемию при избыточном поступлении кальция с пищей. Усиленный, но не умеренный синтез кальцитонина эффективно ингибируется соматостатином, который является фактором, ограничивающим избыточную продукцию гормона, приводя ее в соответствие потребностям организма [1, 2, 8, 21, 22, 54, 81].

### **Нервная регуляция**

Нервные влияния на гормонпродуцирующую активность щитовидной железы выражены существенно слабее, по сравнению с гуморальными. Регулирующее воздействие на секреторную активность железы оказывают симпатические (веточки шейных симпатических узлов) и парасимпатические нервы (веточки вагуса — верхний и возвратный гортанные нервы). Усиление симпатической импульсации активизирует выработку тиреоидных гормонов и кальцитонина, а возбуждение парасимпатических нервов оказывает угнетающее действие на продукцию гормонов. Кроме того, афферентные нервные импульсы, поступающие из самой щитовидной железы в мозг, достигнув гипоталамуса, ослабляют функциональную активность гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы [1, 2, 21, 54, 81].

### **Иммунорегуляция**

Кроме ТТГ способностью стимулировать секрецию тиреоидных гормонов обладают аутоантитела (тиреоидстимулирующие иммуноглобулины — ТСИ), относящиеся к классу IgG. К ним относятся длительно действующий тиреоидный стимулятор — LATS (long acting thyroïd stimulator), LATS-протектор, стимулятор щитовидной железы, стимулятор аденилатциклазы щитовидной железы, стимулятор высвобождения  $T_3$  и др. Аутоантигенами, индуцирующими выработку ТСИ, являются рецепторы ТТГ, локализующиеся в плазматической мембране тиреоцитов. ТСИ продуцируются плазматическими клетками, которые вместе с лимфоцитами в избытке инфильтрируют щитовидную железу при болезни Грейвса. Эти антитела, в частности LATS-фактор, считаются ответственными за развитие диффузного токсического зоба. По современным представлениям ТСИ, обычно отсутствующие в крови у здоровых лиц, связываются с теми же рецепторами тиреоцитов, что и ТТГ, вступая с ним в конкурентное взаимодействие. Результатом связывания ТСИ с рецепторами ТТГ является длительная стимуляция выработки тиреоидных гормонов. В этой связи интересно отметить, что в 5% случаев тиреотоксикоза в крови повышается только уровень  $T_3$  при нормальной концентрации  $T_4$ . Возможно, что в этих случаях селективно вырабатывается именно стимулятор высвобождения  $T_3$ . В отличие от ТТГ эффект ТСИ развивается после длительного латентного периода и достигает максимума через 7-16 ч (после введения ТТГ максимальный тиреоидный эффект отмечается через 2-3 ч) [1, 2, 4, 5, 17, 19, 41, 54, 81, 84].

### **СЕКРЕТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ**

Способность щитовидной железы к накоплению йода и синтезу тиреоидных гормонов появляется у плода на 10-12 неделях внутриутробного развития. В этот же период в крови обнаруживаются тиролиберин и ТТГ. В первые 3 месяца обеспечение эмбриона и плода тиреоидными гормонами осуществляется организмом матери. Снижение у нее функции щитовидной железы в этот период беременности может привести к нарушениям психомоторного развития новорожденного. В дальнейшем трансплацентарный перенос тиреоидных гормонов не имеет существенного значения для развития плода, т.к. не превышает 1%. Гипоталамо-гипофизарный

контроль функции щитовидной железы, т.е. формирование биологической обратной связи между продукцией тиролиберина, ТТГ и тиреоидных гормонов устанавливается в период между 20-й и 30-й неделями внутриутробного развития и 1-м месяцем постнатальной жизни. Самый высокий уровень тиреоидных гормонов в крови у плода отмечается перед рождением. Сразу после рождения функциональная активность щитовидной железы существенно возрастает как результат адаптации к внеутробной жизни. Содержание ТТГ в крови повышается уже на 30-й минуте, а через 1-3 суток постепенно снижается до уровня взрослых. Концентрация  $T_3$  возрастает через 2 ч, а пик  $T_4$  в крови достигает максимума спустя сутки после рождения. Выявлены 2 возрастных периода подъема уровня  $T_4$  в крови — препубертатный (8-10 лет) и поздний пубертатный (15-16 лет). Содержание  $T_3$  достигает максимума в 5-6 лет, затем снижается и вновь повышается после 10 лет. В препубертатном и пубертатном периодах активность щитовидной железы у девочек выше, чем у мальчиков. В зрелом и пожилом возрасте продукция тиреоидных гормонов щитовидной железой сохраняется на относительно стабильном уровне, постепенно ослабевая в старости [6, 12, 17, 21-23, 51, 68, 69, 125].

Кальцитонин обнаруживается на 14-й неделе внутриутробного развития плода человека и его уровень в крови постепенно повышается к концу беременности (гормон матери через плаценту не проникает). В период родов и после них концентрация кальцитонина в крови заметно возрастает и поддерживается на высоком уровне в течение первой недели, что рассматривается как участие гормона в родовом стрессе, предотвращающее чрезмерную активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и других эндокринных желез в результате снижения содержания  $Ca^{2+}$  в крови. Повышенный уровень гормона сохраняется в течение всего грудного периода, что, по-видимому, связано с высоким содержанием кальция в продуктах питания (грудное молоко и молочные продукты) и необходимостью участия кальцитонина в обеспечении интенсивного роста скелета в этом возрасте. Уровень кальцитонина в крови постепенно увеличивается с периода детства до взрослого возраста, затем стабилизируется. К старости его содержание, по одним данным, опять возрастает, отражая процесс возрастной деструкции костной ткани, по другим данным — снижается [8, 12, 17, 21-23].

К настоящему времени исследования в области биохимии, молекулярной биологии, морфологии и физиологии щитовидной железы позволили достичь больших успехов в понимании механизмов образования, секреции, переноса в организме и действия на клетки-мишени тиреоидных гормонов и кальцитонина, особенностей нейро-гуморальной регуляции этих процессов, зависимости эффектов действия гормонов щитовидной железы от их концентрации и исходного функционального состояния органов и тканей в норме и при различных нарушениях жизнедеятельности. Эти знания необходимы врачам широкого круга специальностей, прежде всего, специалистам в области практической тиреологии, в том числе хирургической онкопатологии щитовидной железы, для разработки оптимальных методов заместительной гормональной или супрессивной (L-тироксин) терапии пациентов соответствующего профиля, сочетанного применения тиреоидных (антитиреоидных) препаратов с медикаментозными средствами других фармакологических групп и т.д. Дальнейшие исследования в области фундаментальных и прикладных проблем тиреологии помогут решить ряд важных в практическом отношении задач, особенно связанных с использованием подходов метаболической терапии при тиреопатологии.

### Список литературы

1. Алешин, Б. В. Эндокринная система и гомеостаз / Б. В. Алешин // Гомеостаз / Под ред. П. Д. Горизонтова. — М. : Медицина, 1981. — С. 74–113.

2. Алешин, Б. В. Гипоталамус и щитовидная железа / Б. В. Алешин, В. И. Губский. — М. : Медицина, 1983. — 184 с.
3. Антиоксидантный эффект тироксина в головном мозге крыс / О. В. Галкина [и др.] // Новое в изучении пластичности мозга: Материалы конф. — М., 2000. — С. 38.
4. Аутоантитела к уровням антигенов щитовидной железы в популяции российской Арктики при разных уровнях дофамина в крови / Д. С. Потуткин [и др.] // Клин. лаб. диагн. — 2020. — Т. 65, № 3. — С. 179–184.
5. Балаболкин, М. И. Тиреотоксикоз / М. И. Балаболкин, Л. С. Славина, М. Ф. Логачев // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1985. — Т. 25. — С. 83–84.
6. Балаболкин, М. И. Тиреотропный гормон / М. И. Балаболкин // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1985. — Т. 25. — С. 84–86.
7. Барбараш, Н. А. Адаптация к холоду / Н. А. Барбараш, Г. Я. Двуреченская // Физиология адаптационных процессов : Руководство по физиологии. — М. : Наука, 1986. — С. 251–302.
8. Булатов, А. А. Кальцитонин / А. А. Булатов // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1979. — Т. 10. — С. 55.
9. Валдина, Е. А. Заболевания щитовидной железы. — 2-е изд. / Е. А. Валдина. — СПб. : Питер, 2001. — 416 с.
10. Влияние тиреоидного статуса на адаптационные резервы организма / В. В. Удут [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2001. — № 3. — С. 70–73.
11. Влияние тиреоидных гормонов на нейросекреторные клетки супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса крыс в условиях *in vitro* / М. В. Глазова [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1997. — № 5. — С. 528–530.
12. Волкова, Н. И. Щитовидная железа / Н. И. Волкова. — М. : Эксмо, 2016. — 128 с.
13. Вплив тироксину на активність ферментів енергетичного обміну та антиоксидантною системи в нейтрофільних гранулоцитах поросят / Н. О. Бабич [и др.] // Физиол. журнал. — 2000. — № 3. — С. 84–91.
14. Гацко, Г. Г. Жировая ткань при старении / Г. Г. Гацко, А. С. Жукова, Л. Д. Чайка. — Минск : Наука и техника, 1985. — 184 с.
15. Гзгян, А. М. Способность к репродукции у женщин с гипотиреозом / А. М. Гзгян, Д. А. Ниаури // 60 лет содружества СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова и больницы Святого Великомученика Георгия : Сб. науч. работ. — СПб., 1998. — С. 86–87.
16. Данилова, Л. И. Гормоны щитовидной железы и метаболизм костной ткани / Л. И. Данилова, А. В. Матвеева // Мед. новости. — 2001. — № 9. — С. 3–7.
17. Дедов, И. И. Биоритмы гормонов / И. И. Дедов, В. И. Дедов. — М. : Медицина, 1992. — 256 с.
18. Дейвис, П. Д. Негеномные эффекты тиреоидных гормонов / П. Д. Дейвис, Ф. Б. Дейвис // Болезни щитовидной железы : Пер. с англ. / Под ред. Л. И. Бравермана. — М. : Медицина, 2000. — С. 18–37.
19. Диагностика и хирургическое лечение диффузного токсического зоба / П. С. Ветшев [и др.] // Хирургия. — 1999. — № 11. — С. 51–56.
20. Држевецкая, И. А. Основы физиологии обмена веществ и эндокринной системы : Учеб. пособие для биол. спец. ун-тов и пед. ин-тов / И. А. Држевецкая. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Высшая школа, 1983. — 272 с.
21. Држевецкая, И. А. Эндокринная система растущего организма : Учеб. пособие для биол. спец. вузов / И. А. Држевецкая. — М. : Высшая школа, 1987. — 207 с.

22. Држевецкая, И. А. Тирокальцитонин — компонент стресса / И. А. Држевецкая, Н. Ф. Мишина, Н. Н. Лиманский // Гисто-гематические барьеры и их нейрогуморальная регуляция. — М. : Наука, 1981. — С. 273–276.
23. Жуковский, М. А. Детская эндокринология : Руководство для врачей / М. А. Жуковский. — 2-е изд. — М. : Медицина, 1982. — 448 с.
24. Забаровская, З. В. Заболевания щитовидной железы, обусловленные дефицитом йода : учеб.-метод. пособие / З. В. Забаровская, Т. В. Мохорт, А. П. Шепелькевич. — Мн. : БГМУ, 2007. — 27 с.
25. Зорова, О. В. Роль тиреоидных гормонов в адаптационных перестройках мышечной системы / О. В. Зорова, Л. В. Сорокина // Физиол. механ. природ. адапт. : Тез. докл. 3-го Всерос. симп. — Иваново, 27 июня–1 июля 1999 г. — Иваново, 1999. — С. 69–70.
26. Изменение метаболического состояния при нарушениях периферической конверсии тироксина у больных раком щитовидной железы / В. Б. Гаврилов [и др.] // Клиническая онкология : Сб. науч. работ / Под ред. Ю. Е. Демидчика. — Минск, 1999. — С. 39–45.
27. Ионова, Ж. П. К вопросу о йоддефицитных состояниях щитовидной железы у детей и беременных / Ж. П. Ионова // Современные медицинские технологии — здравоохранению : Матер. юбилейн. конф., посвящ. 10-летию Ставропольского краевого клин.-диагн. центра. — Ставрополь, 1999. — Ч. 2. — С. 298–299.
28. Исследование влияния тиролиберина и его аналога Gpr-His-Pro-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> на токсичность этанола при хронической алкогольной интоксикации / К. В. Бородина [и др.] // Сборник ст. междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные медико-биологические проблемы алкогольной и других химических зависимостей», 3–4 октября 2019 г., г. Гродно, Республика Беларусь / глав. ред. И. Н. Семененя. — Минск : ИВЦ Минфина, 2019. — С. 16–21.
29. Карпыза, Е. И. Характеристика специфического связывания тиреоидных гормонов с плазматическими мембранами синцитиотрофобласта плаценты человека / Е. И. Карпыза, М. Н. Ермоленко, О. В. Свиридов // Вопр. мед. химии. — 1990. — Т. 36, № 3. — С. 45–48.
30. Кейн, Л. А. Исследование состояния щитовидной железы: клинический подход / Л. А. Кейн, Х. Гариб // Болезни щитовидной железы : Пер. с англ. / Под ред. Л. И. Бравермана. — М. : Медицина, 2000. — С. 38–54.
31. Кинетика связывания трийодтиронина с эритроцитами детей при заболеваниях щитовидной железы / Е. И. Федорович [и др.] // Тез. докл. III съезда Белорус. об-ва фотобиол. и биофиз. — Минск, 1998. — С. 190.
32. Клиническая эндокринология: Руководство / Под ред. Н. Т. Старковой. — 3-е изд. — СПб. : Питер, 2002. — 576 с.
33. Клячко, В. Р. Гипотиреоз / В. Р. Клячко, Д. Д. Орловская // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1977. — Т. 6. — С. 7–12.
34. Количественная оценка индивидуальной чувствительности липидного обмена к тироксину в организме человека / В. Б. Гаврилов [и др.] // Докл. Акад. наук Беларуси. — 1997. — № 3. — С. 64–68.
35. Кригер, Д. Т. Физиология нейроэндокринной системы / Д. Т. Кригер // Эндокринология и метаболизм : Пер. с англ. / Под ред. Ф. Фелига, Д. Д. Бакстера, А. Е. Бродуса, Л. А. Фромена. — В 2-х т. — Т. 1. — М. : Медицина, 1985. — С. 228–272.
36. Кэтт, К. Д. Действие гормонов: регуляция функции клеток мишеней белковыми, тиреоидными и стероидными гормонами / К. Д. Кэтт, М. Л. Дюфо // Эндокринология и метаболизм : Пер. с англ. / Под ред. Ф. Фелига, Д. Д. Бакстера, А. Е. Бродуса, Л. А. Фромена. — В 2-х т. — Т. 1. — М. : Медицина, 1985. — С. 113–199.
37. Лауреаты Нобелевской премии : Энциклопедия. — Кн. 1 (А–Л) / Пер. с англ. — М. : Прогресс, 1992. — 775 с.
38. Лекторов, В. Н. Йоддефицитные состояния: проблемы и решения / В. Н. Лекторов // Здравоохранение. — 2002. — № 9. — С. 2–4.

39. Лукша, Л. С. Сократительные и эндотелийзависимые дилататорные реакции аорты при гипертиреозе / Л. С. Лукша, И. М. Багель, Л. М. Лобанок // Пробл. эндокринологии. — 2000. — № 6. — С. 38–40.
40. Лупандин, Ю. В. Терморегуляционная активность двигательной системы человека / Ю. В. Лупандин, А. Ю. Мейгал, Л. В. Сорокина. — Петрозаводск : Изд-во Петрозав. ун-та, 1995. — 232 с.
41. Макар, Р. Д. Сучасні уявлення про антитиреоидні антитіла / Р. Д. Макар, Н. В. Чернова // Лаб. діагност. — 2000. — № 3. — С. 32–37.
42. Медведева, Г. И. Об изменении возбудимости терморегулирующего центра под влиянием тиреоидных гормонов / Г. И. Медведева // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. — 1972. — № 5. — С. 750–753.
43. Мембранная рецепция тиреоидных гормонов / Я. Х. Туракулов [и др.] // Биохимия. — 1991. — Т. 56, № 5. — С. 839–845.
44. Мохнач, И. В. Йодвысокополимеры и биологические возможности организма / И. В. Мохнач. — Л. : Наука, 1979. — 80 с.
45. Надольник, Л. И. Свободнорадикальные процессы и метаболизм йода в клетках щитовидной железы / Л. И. Надольник. — Мн. : Беларуская навука, 2014. — 275 с.
46. Нарушение окислительного метаболизма при экспериментальном гипотиреозе у кроликов / Н. А. Антелава [и др.] // Georg. med. news. — 2001. — Vol. 73, № 4. — P. 7–9.
47. Недостаток тиреоидных гормонов предрасполагает крыс к каталепсии / Н. Н. Барыкина [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2001. — № 7. — С. 13–15.
48. Нейрофизиологические паттерны при заболеваниях щитовидной железы / Е. Л. Союстова [и др.] // Научные аспекты практического здравоохранения : Сб. трудов. — М., 2000. — С. 303–304.
49. Особенности психического статуса у больных йоддефицитным зобом / Т. П. Голдырева [и др.] // Клин. мед. — 2000. — № 3. — С. 32–35.
50. Павлов, А. Д. Регуляция эритропоэза : физиологические и клинические аспекты / А. Д. Павлов, Е. Ф. Морщакова. — М. : Медицина, 1987. — 272 с.
51. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований» от 21 февраля 2000 г. № 64.
52. Рачев, Р. Р. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры / Р. Р. Рачев, Н. Д. Ещенко. — М. : Медицина, 1975. — 296 с.
53. Реакция щитовидной железы на введение кальцитонина / Л. Д. Сандомирская [и др.] // Морфология. — 2000. — № 3. — С. 106.
54. Розен, В. Б. Основы эндокринологии : Учеб. пособие для студ. ун-тов / В. Б. Розен. — М. : Высшая школа, 1980. — 344 с.
55. Саатов, Т. С. Выделение и характеристика мембранного рецептора тироксина / Т. С. Саатов, Н. Н. Яковлева // Вопр. мед. химии. — 1994. — № 6. — С. 10–13.
56. Свободнорадикальное окисление при экспериментальном гипотиреозе у крыс / Л. И. Надольник [и др.] // Цитология. — 1999. — № 9. — С. 774.
57. Семененя, И. Н. Причины и механизмы развития вторичных эритроцитозов / И. Н. Семененя // Здравоохр. Белоруссии. — 1990. — № 7. — С. 48–51.
58. Семененя, И. Н. Участие тиреоидных гормонов в нарушении терморегуляции у экспериментальных животных при действии пирогенных факторов / И. Н. Семененя // Весці Акадэміі навук Беларусі. Сер. хім. навук. — 1997. — № 2. — С. 114–117.
59. Семененя, И. Н. Проблема субфебрилитета (фундаментальные аспекты) / И. Н. Семененя. — Минск : ООО «Ковчег», 2002. — 290 с.
60. Синдромы низкой и высокой периферической резистентности к тиреоидным гормонам у больных раком щитовидной железы / В. Б. Гаврилов [и др.] // Здравоохранение. — 2000. — № 6. — С. 54–56.

61. Соболев, В. И. Физиологические механизмы адаптогенного действия тиреоидных гормонов / В. И. Соболев, Г. И. Чирва // Матер. Всерос. науч. конф. с междунар. участием, посвящ. 150-летию со дня рождения академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 15–17 сент. 1999 г. — СПб., 1999. — С. 289.
62. Строев, Е. А. Влияние тиреотропина на активность кальпаинов щитовидной железы. Роль вторичных мессенджеров / Е. А. Строев, Н. Н. Булаева, М. Ю. Кочуков // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1998. — № 12. — С. 649–651.
63. Строев, Е. А. Внутриклеточное распределение и некоторые особенности регуляции кальпаинов в щитовидной железе / Е. А. Строев, Н. Н. Булаева, М. Ю. Кочуков // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2001. — № 2. — С. 153–155.
64. Ткачева, Г. А. Радиоиммунохимические методы исследования : Справочник / Г. А. Ткачева, М. И. Балаболкин, И. П. Ларичева. — М. : Медицина, 1983. — 192 с.
65. Туракулов, Я. Х. Йодный обмен / Я. Х. Туракулов, Е. Г. Матвеев // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1978. — Т. 9. — С. 477–479.
66. Туракулов, Я. Х. Йодтирозины / Я. Х. Туракулов // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1978. — Т. 9. — С. 482.
67. Туракулов, Я. Х. Йодтиронины / Я. Х. Туракулов // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1978. — Т. 9. — С. 482–483.
68. Туракулов, Я. Х. Тироксин / Я. Х. Туракулов // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1985. — Т. 25. — С. 87–89.
69. Туракулов, Я. Х. Трийодтиронин / Я. Х. Туракулов // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1985. — Т. 25. — С. 261–262.
70. Фактор переносу імунноп реактивності як модулятор функціональноп активності лімфоцитів шурів / О. Г. Голева [и др.] // Фізіол. журнал. — 2000. — № 4. — С. 58–65.
71. Федорович, Е. И. Биомедицинские аспекты взаимодействия тиреоидных гормонов с эритроцитами при раке щитовидной железы / Е. И. Федорович, Ю. Е. Демидчик, О. В. Свиридов. — М. : АОЗТ «Издательский дом «Огонек», 2001. — 95 с.
72. Физиология человека : В 4-х т. — Т. 4. — Пер. с англ. / Под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. — М. : Мир, 1986. — 312 с.
73. Фромен, Л. А. Заболевания передней доли гипофиза / Л. А. Фромен // Эндокринология и метаболизм : Пер. с англ. / Под ред. Ф. Фелига, Д. Д. Бакстера, А. Е. Бродуса, Л. А. Фромена. — В 2-х т. — Т. 1. — М. : Медицина, 1985. — С. 273–432.
74. Хочачка, П. Стратегия биохимической адаптации / П. Хочачка, Д. Сомеро / Пер. с англ. Ю. И. Лашкевича. — М. : Мир, 1977. — 398 с.
75. Хэбинер, Д. Ф. Биосинтез и секреция гормонов / Д. Ф. Хэбинер // Эндокринология и метаболизм : Пер. с англ. / Под ред. Ф. Фелига, Д. Д. Бакстера, А. Е. Бродуса, Л. А. Фромена. — В 2-х т. — Т. 1. — М. : Медицина, 1985. — С. 60–113.
76. Чеботарев, В. Ф. Эндокринная регуляция иммуногенеза / В. Ф. Чеботарев. — Киев : Здоровья, 1979. — 160 с.
77. Чин, У. У. Молекулярные механизмы внутриядерного действия тиреоидных гормонов / У. У. Чин, П. М. Йен // Болезни щитовидной железы : Пер. с англ. / Под ред. Л. И. Бравермана. — М. : Медицина, 2000. — С. 1–17.
78. Чугунова, Л. Г. Действие монофлерной обножки на состояние углеводного обмена при гипотиреозе / Л. Г. Чугунова, К. В. Савилов, И. В. Хныкина // Пчеловодство — 21 век : Матер. междунар. науч. конф. — М., 2000. — С. 65–66.
79. Щеплягина, Л. А. Йод и интеллектуальное развитие ребенка / Л. А. Щеплягина, Н. Д. Макулова, О. Н. Маслова // Рус. мед. журнал. — 2002. — № 7. — С. 358–363.
80. Щитовидная железа / Н. Т. Старкова [и др.] // БМЭ. — 3-е изд. — М. : Сов. энциклопедия, 1986. — Т. 21. — С. 514–529.

81. Щитовидная железа. Фундаментальные аспекты / Под ред. А. И. Кубарко, S. Yamashita. — Минск–Нагасаки, 1998. — 368 с.
82. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт : Пер. с англ. — М. : Мир, 1985. — 456 с.
83. Adamson, J. W. Modulation of in vitro erythropoiesis: hormonal interactions and erythroid colony growth / J. W. Adamson, W. J. Popovic, J. E. Brown // Differentiation of normal and neoplastic hematopoietic cell. — Book A. — Cold Spring Harbor, 1978. — P. 235–248.
84. Al-Rabia, M. W. Correlation of thyroid antibodies with TSH, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> hormones in patients diagnosed with autoimmune thyroid disorders / M. W. Al-Rabia // Pak. J. Pharm. Sci. — 2017. — Vol. 30, № 2. — P. 607–612.
85. Bernal, J. Thyroid hormones and brain development / J. Bernal, J. Nunez // Eur. J. Endocrinol. — 1995. — Vol. 133, № 4. — P. 390–398.
86. Brent, G. A. The molecular basis of thyroid hormone action / G. A. Brent // N. Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 331. — P. 847–853.
87. Brown, J. E. Modulation of in vitro erythropoiesis: enhancement of erythroid colony growth by cyclic nucleotides / J. E. Brown, J. W. Adamson // Cell. Tiss. Kinet. — 1977. — Vol. 10. — P. 289–298.
88. Chen, M. Thyroid function analysis in 50 patients with COVID-19: A retrospective study / M. Chen, W. Zhou, W. Xu // Thyroid. — 2021. — Vol. 31, № 1. — P. 8–11.
89. Dai, G. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter / G. Dai, O. Levy, N. Carrasco // Nature. — 1996. — Vol. 379, № 6564. — P. 458–460.
90. Davis, P. J. Nongenomic actions of thyroid hormone / P. J. Davis, F. B. Davis // Thyroid. — 1996. — Vol. 6, № 5. — P. 497–504.
91. Davis, P. J. Nongenomic actions of thyroid hormone: the integrin component / P. J. Davis, S. A. Mousa, H. Y. Lin // Physiol. Rev. — 2021. — Vol. 101, № 1. — P. 319–352.
92. *De novo* triiodothyronine formation from thyrocytes activated by thyroid-stimulating hormone / C. E. Citterio [et al.] // J. Biol. Chem. — 2017. — Vol. 292, № 37. — P. 15434–15444.
93. Differential crosstalk between estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and the thyroid hormone receptor results in flexible regulation of the consensus ere / N. Vasudevan [et al.] // 30<sup>th</sup> Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience. — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 1. — P. 1105.
94. Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone / J. A. Enrriquez [et al.] // Mol. Cell. Biol. — 1999. — Vol. 19, № 1. — P. 657–670.
95. Dudley, S. C. J. Bursting of cardiac sodium channels after acute exposure to 3,5,3-triiodo-L-thyronine / S. C. J. Dudley, C. M. Baumgarten // Circ. Res. — 1993. — Vol. 73. — P. 301–313.
96. Effect of thyroid hormones on G proteins in synaptosomes of chick embryo / A. Giguere [et al.] // Endocrinol. — 1996. — Vol. 137. — P. 2558–2564.
97. Effects of thyroid hormone on neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus / M. A. Caria [et al.] // 30<sup>th</sup> Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience. — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 1. — P. 181.
98. Erythropoiesis and erythropoietin in hypo- and hyperthyroidism / K. C. Das [et al.] // J. Clin. Endocrinol. — 1975. — Vol. 40. — P. 211–220.
99. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein / P. H. Eng [et al.] // Endocrinol. — 1999. — Vol. 140, № 8. — P. 3404–3410.
100. Etienne, L. A. Thyroxine alters glutathione s-transferase expression and activity in the olfactory mucosa of propylthiouracil treated mice / L. A. Etienne, J. A. Maruniak, E. Walters // 30<sup>th</sup>

Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience. — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 2. — P. 1706.

101. Fanjul, A. N. Cold-sensitive cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding protein and pyruvatekinase from human erythrocytes share similar regulatory properties of hormone binding by glycolytic intermediates / A. N. Fanjul, R. N. Farias // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268. — P. 175–179.

102. Farwell, A. P. Thyroxine targets different pathways of internalization of type II iodothyronine 5-deiodinase in astrocytes / A. P. Farwell, D. J. DiBenedetto, J. L. Leonard // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268. — P. 5055–5062.

103. Farwell, A. P. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes / A. P. Farwell, M. P. Tranter, J. L. Leonard // *Endocrinol.* — 1995. — Vol. 136. — P. 3909–3915.

104. Găluscă, D. Graves disease — importance of TSH antireceptor antibodies and thyroid peroxidase autoantibodies / D. Găluscă // *Rom. Arch. Microbiol. Immunol.* — 2000. — Vol. 59, № 4. — P. 348.

105. Golde, D. W. Hormonal modulation of erythropoiesis in vitro / D. W. Golde // *In vitro aspects of erythropoiesis* / Ed. M. J. Murphy. — New York, 1978. — P. 81–85.

106. Goodman, H. M. Role of thyroid hormones in lypolysis / H. M. Goodman, C. A. Bray // *Amer. J. Physiol.* — 1966. — Vol. 210, № 5. — P. 1053–1058.

107. Haemostatic profile in hypothyroidism as potential risk factor for vascular or thrombotic disease / B. Møller [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 31, № 2. — P. 131–137.

108. Harris, D. R. Acute thyroid hormone promotes slow inactivation of sodium current in neonatal cardiac myocytes / D. R. Harris, W. L. Green, W. Craelius // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — Vol. 1095. — P. 175–181.

109. Heise, E. Insulin binding and response to insulin of adipocytes from thyroxine treated rats / E. Heise, H. G. Joost, A. Hasselblatt // *Endocrinol.* — 1982. — Vol. 110, № 3. — P. 955–960.

110. Hetzel, B. S. Iodine and neuropsychological development / B. S. Hetzel // *J. Nutr.* — 2000. — Vol. 130. — P. 493–495.

111. Hoppner, W. Role of thyroid hormones in the regulation of hepatic glucokinase and phosphoenolpyruvatecarboxykinase gene expression during the starvation-refeeding transition / W. Hoppner, H. J. Seits // *Biochem. Soc. Transact.* — 1990. — Vol. 18. — P. 845–847.

112. Hulbert, A. J. The thyroid hormones: a thesis concerning their action / A. J. Hulbert // *J. Theor. Biol.* — 1978. — Vol. 73, № 1. — P. 81–100.

113. Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking / L. Fayadat [et al.] // *Endocrinol.* — 1998. — Vol. 139, № 10. — P. 4277–4285.

114. Ijaz, S. H. Relationship between thyroid hormone levels and mean platelet count and volume: quantitative assessment / S. H. Ijaz, S. M. Jamal, R. Qayyum // *Cureus.* — 2018. — Vol. 10, № 10. — P. 3421.

115. Impact of neonatal onset hypothyroidism on sertoli cell number, plasma and testicular interstitial fluid androgen binding protein concentration / R. R. Maran [et al.] // *Endocrinol. Res.* — 1999. — Vol. 25, № 3–4. — P. 307–322.

116. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha and decreased expression of thyroglobulin and thyroid peroxidase mRNA levels in the thyroids of iodide-treated BB/Wor rats / K. Mori [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* — 1998. — Vol. 139, № 5. — P. 539–545.

117. Integrin function : molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules / S. Miyamoto [et al.] // *J. Cell. Biol.* — 1995. — Vol. 131. — P. 791–805.

118. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress / M. Vitale [et al.] // *Endocrinol.* — 2000. — Vol. 141, № 2. — P. 598–605.
119. Lawrence, W. D. Stimulation in vitro of rabbit erythrocyte cytosol phospholipid-dependent protein kinase activity / W. D. Lawrence, M. Schoenl, P. J. Davis // *J. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264. — P. 4766–4768.
120. Lazar, M. A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities / M. A. Lazar // *Endocrinol. Rev.* — 1993. — Vol. 14. — P. 184–193.
121. Liver X receptor  $\beta$  controls thyroid hormone feedback in the brain and regulates browning of subcutaneous white adipose tissue / Y. Miao [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — Vol. 112, № 45. — P. 14006–14011.
122. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy / V. J. Pop [et al.] // *Clin. Endocrinol.* — 1999. — Vol. 50, № 2. — P. 149–155.
123. Mansouri, J. Thyrotropin releasing hormone receptor binding in the medulla of the developing piglet / J. Mansouri, L. Rava, H. C. Kinney // 30<sup>th</sup> Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience. — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 1. — P. 929.
124. Mason, G. A. Depolarization-dependent <sup>45</sup>Ca uptake by synaptosomes of rat cerebral cortex is enhanced by L-triiodothyronine / G. A. Mason, C. H. Walker, A. J. J. Prange // *Neuropsychopharmacol.* — 1990. — Vol. 3. — P. 291–295.
125. Maturation in serum thyroid function parameters over childhood and puberty: Results of a longitudinal study / P. N. Taylor [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2017. — Vol. 102, № 7. — P. 2508–2515.
126. Mechanisms of adaptation to iodine deficiency in rats: thyroid status is tissue specific. Its relevance for man / P. E. Pedraza [et al.] // *Endocrinol.* — 2006. — Vol. 147, № 5. — P. 2098–2108.
127. Mussa, G. C. Thyroid and growth : thyroid hormones and development of the nervous system / G. C. Mussa, M. Zaffaroni, F. Mussa // *J. Endocrinol. Invest.* — 1989. — Vol. 12. — P. 85–94.
128. Nedrebun, B. G. Plasma total homocysteine in hyper- and hypothyroid patients before and during 12 months of treatment / B. G. Nedrebun, O. L. P. M. Nygbrd, E. A. Lien // *Clin. Chem.* — 2001. — Vol. 47, № 9. — P. 1738–1741.
129. Nongenomic potentiation by thyroid hormone of interferon-gamma-induced antiviral state requires PKA and PKC activities / H.-Y. Lin [et al.] // *Amer. J. Physiol.* — 1996. — Vol. 271. — P. 1256–1261.
130. Ojaama, K. Acute effects of triiodothyronine on arterial smooth muscle cells / K. Ojaama, C. Balkman, I. L. Klein // *Ann. Thorac. Surg.* — 1993. — Vol. 56. — P. 61–67.
131. Papineni, J. K. Thyroid hormone levels in chronic alcoholic liver disease patients before and after treatment / J. K. Papineni, V. B. K. Pinnelli, R. Davanum // *J. Clin. Diagn. Res.* — 2017. — Vol. 11, № 7. — P. 13–16.
132. Petersson, U. Thyroid function tests, serum lipids and gender interrelations in a middle-aged population / U. Petersson, T. Kjellström // *Scand. J. Prim. Health Care.* — 2001. — Vol. 19, № 3. — P. 183–185.
133. Pharaoh, P. Iodine and brain development / P. Pharaoh, K. Connolly // *Develop. Med. Child Neurol.* — 1995. — Vol. 38. — P. 464–469.
134. Popovic, V. Lethargic hypothermia in hibernators and nonhibernators / V. Popovic // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1959. — Vol. 80. — P. 320–331.

135. Popovic, W. J. Modulation of in vitro erythropoiesis. Studies with euthyroid and hypothyroid dogs / W. J. Popovic, J. E. Brown, J. W. Adamson // *J. Clin. Invest.* — 1979. — Vol. 64. — P. 56–61.
136. Puia, G. Thyroid hormones reduce nicotinic receptor mediated currents in SH-SY5Y neuroblastoma cells / G. Puia, F. Ravazzini // *Pharmacol. Rep.* — 2020. — Vol. 72, № 6. — P. 1766–1771.
137. Regulation of deiodinase activity by cellular redox status / L. G. Gregory [et al.] // *Drug Metab. Rev.* — 2000. — Vol 32, № 1. — P. 58.
138. Relationship between the thyroid hormone transport and neutral amino acid transport in JAR human choriocarcinoma cells / P. D. Prasad [et al.] // *Endocrinol.* — 1994. — Vol. 134. — P. 574–581.
139. Relationship between the thyroid hormone transport system and the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in cultured rat brain astrocytes / A. Beslin [et al.] // *Endocrinol.* — 1995. — Vol. 136. — P. 5385–5390.
140. Ritter, M. J. Thyroid hormone signaling and the liver / M. J. Ritter, I. Amano, A. N. Hollenberg // *Hepatology.* — 2020. — Vol. 72, № 2. — P. 742–752.
141. Schumm-Draeger, P. M. Sodium/iodide symporter (NIS) and cytokines / P. M. Schumm-Draeger // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* — 2001. — Vol. 109, № 1. — P. 32–34.
142. Semeneya, I. N. Effects of indomethacin on body temperature, interleukin-6 activity, and the content of thyroid and steroid hormones in blood of rats during adjuvant-induced hyperthermia / I. N. Semeneya // *Basic and Applied Thermophysiology* : Ed. by V. N. Gourine. — Minsk, 2000. — P. 246–251.
143. Sholz, T. D. Thyroid hormone regulation of the NADH Shuttles in liver and cardiac mitochondria / T. D. Sholz, C. J. TenEuck, B. C. Schutte // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2000. — Vol. 32, № 1. — P. 1–10.
144. Smith, T. J. Stereochemical requirements for the modulation by retinoic acid of thyroid hormone activation of Ca(2+)-ATPase and binding at the human erythrocyte membrane / T. J. Smith, F. B. Davis, P. J. Davis // *Biochem. J.* — 1992. — Vol. 284, Pt. 2. — P. 583–587.
145. Sterling, K. Thyroid hormone action: effect of triiodothyronine on mitochondrial adenine nucleotide translocase in vivo and in vitro / K. Sterling, M. A. Brenner // *Metabolism.* — 1995. — Vol. 44. — P. 193–199.
146. Storm, H. Thyroid hormone — catecholamine interrelationship during exposure to cold / H. Storm, C. van Harveld, A. A. Kassenaar // *Acta Endocrinol.* — 1981. — Vol. 97. — P. 91–97.
147. Tellini, U. Funzionalità tiroidea e invecchiamento implicazioni diagnostiche / U. Tellini, R. Gasparini // *G. Gerontol.* — 2000. — Vol. 48, № 3. — P. 152–158.
148. The direct effects of 3,5,3'-triiodothyronine (T<sub>3</sub>) on myocyte contractile processes. Insights into mechanisms of action / J. D. Walker [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 1995. — Vol. 110. — P. 1369–1380.
149. The effect of thyroid status on luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) mRNA levels in the male rat / M. A. Curran [et al.] // *30<sup>th</sup> Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience.* — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 1. — P. 923.
150. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation and medical significance / D. N. Orsolya [et al.] // *Endocrine Rev.* — 2003. — Vol. 24, № 1. — P. 48–77.
151. The thyroid hormone receptor  $\alpha$  is a very potent effector / J.-L. G. Carre [et al.] // *30<sup>th</sup> Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience.* — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 2. — P. 1368.

152. Thyroid function among breastfed children with chronically excessive iodine intakes / I. Aakre [et al.] // *Nutrients*. — 2016. — Vol. 8, № 7. — P. 398.
153. Thyroid function and thyroid disorders during pregnancy: a review and care pathway / A. P. Delitala [et al.] // *Arch. Gynecol. Obstet.* — 2019. — Vol. 299, № 2. — P. 327-338.
154. Thyroid function modulates lung fluid and alveolar viscoelasticity in mechanically ventilated rat / M. S. Owji [et al.] // *Surg. Res.* — 2020. — Vol. 253. — P. 272–279.
155. Thyroid function of twin-pregnant women in early pregnancy / Jiang, Y.-X. [et al.] // *Chin. Med. J.* — 2019. — Vol. 132, № 17. — P. 2033–2038.
156. Thyroid hormone analogues potentiate the antiviral action of interferon-gamma / H.-Y. Lin [et al.] // *J. Cell. Physiol.* — 1996. — Vol. 167. — P. 269–276.
157. Thyroid hormones and the mechanisms of adaptation to cold / S. Tsubulnikov [et al.] // *Hormones (Athens)*. — 2020. — Vol. 19, № 3. — P. 329–339.
158. Thyroid hormone, gene expression, and central nervous system : where we are / G. Giannocco [et al.] // *Semin. Cell. Dev. Biol.* — 2021. — Vol. 114. — P. 47–56.
159. Thyroid hormone receptor alpha in skeletal muscle is essential for T3-mediated increase in energy expenditure / T. S. Nicolaisen [et al.] // *FASEB J.* — 2020. — Vol. 34, № 11. - P. 15480-15491.
160. Thyroid hormone treatment after coronary-artery bypass surgery / J. D. Klemperer [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 333. — P. 1522–1527.
161. Thyroid hormones are required for the day-night rhythm of fos expression in the premammillary hypothalamic (PMH) area of the ewe / G. M. Anderson [et al.] // 30<sup>th</sup> Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience. — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 2. — P. 1445.
162. Thyroid status modulates glucoxidative and lipoxidative modification of tissue proteins / R. Pamplona [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* — 1999. — Vol. 27. — P. 901–910.
163. Thyrotropin releasing hormone in the Alzheimer hippocampus / E. G. Stopa [et al.] // 30<sup>th</sup> Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience. — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 1. — P. 295.
164. Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes: a novel extranuclear action of thyroid hormone / C. A. Siegrist-Kaiser [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 5296–5302.
165. Thyroxine regulation of monolysocardiolipin acyltransferase activity in rat heart / T. Mutter [et al.] // *Biochem. J.* — 2000. — Vol. 346, № 2. — P. 403–406.
166. Transport of thyroid hormones by human erythrocytes: kinetic characterization in adults and newborns / J. Osty [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1990. — Vol. 71, № 6. — P. 1589–1595.
167. Transthyretin, thyroid hormones and catecholamines / J. A. Palha [et al.] // 30<sup>th</sup> Annual Meeting : Abstracts / Society for Neuroscience. — New Orleans, 2000. — Vol. 26, Pt. 1. — P. 1164.
168. Vashishta, N. Effect of thyroidectomy on fast and slow muscle fibres of rat gastrocnemius muscle / N. Vashishta, C. L. Talesara // *Indian. J. Exp. Biol.* — 2000. — Vol. 38, № 6. — P. 575–579.
169. Viguerie-Bascands, N. Triiodothyronine regulates in vitro energy metabolism gene expression in human adipocytes / N. Viguerie-Bascands, D. Langin // *Int. J. Obesity*. — 2000. — Vol. 24, № 1. — P. 21.
170. Wang, H.-Y. Motilin levels and electrogastroenterogram studies in hypothyroidism / H.-Y. Wang, Q. Cao, Y.-M. Li // *J. Zhejiang Univ. Sci.* — 2001. — Vol. 2, № 4. — P. 453–455.

171. Weinstein, S. P. Glucose transport stimulation by thyroid hormone in ARL 15 cells : partial role of increased GLUT1 glucose transporter gene transcription / S. P. Weinstein, R. S. Haber // *Thyroid*. — 1993. — Vol. 3. — P. 135–142.

172. White, A. The endocrine role of the thymus and its hormone, thymosine, in the regulation of the growth and maturation of host immunological competence / A. White, A. L. Goldstein // *Adv. Metab. Disord.* — 1975. — Vol. 8. — P. 359–374.

173. Zhang, Y. Thyroid hormone stimulates acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$  transcription in hepatocytes by modulating the composition of nuclear receptor complexes bound to a thyroid hormone response element / Y. Zhang, L. Yin, F. B. Hillgartner // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276, № 2. — P. 974–983.

## **THE ROLE OF THE THYROID GLAND IN THE REGULATION OF VITAL PROCESSES**

---

***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 an overview literary and proprietary data about the role of hormones thyroid gland in the regulation of vital processes in normal and pathological conditions. The processes of biosynthesis are described, secretion and catabolism iodine-containing hormones (thyroxine, triiodothyronine) and calcitonin, molecular and cellular mechanisms their actions, effects of influence on organs and tissues, physiological systems of the body normal and with various disorders of vital activity. Presented by information about the humoral, nervous and immune system regulation of functional activities thyroid gland, secretory activity of the organ in ontogenesis.*

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС С ЛИМФОСАРКОМОЙ ПЛИССА ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ ДОКСОРУБИЦИНОМ И СОЧЕТАННОМ ВВЕДЕНИИ ПАНТЕНОЛА С ЦИСТЕАМИНОМ

Семенович Д.С.<sup>1</sup>, Лукиенко Е.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научное и образовательное подразделение Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского», г. Москва, Российская Федерация

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

**Резюме.** Были исследованы показатели окислительного стресса у крыс-опухоленосителей с лимфосаркомой Плисса, которые подвергались химиотерапии доксорубицином (5 мг/кг, однократно, внутривнутрибрюшинно) и дальнейшему внутривнутрибрюшинному сочетанному введению пантенола (200 мг/кг) с цистеамином (100 мг/кг) в течение 5 дней. Содержание конечных продуктов перекисного окисления липидов и ДФА-реагирующих соединений у крыс-опухоленосителей с химиотерапией доксорубицином был на 30% выше ( $p < 0,05$ ), чем у контрольных животных без химиотерапией. Назначение крысам с лимфосаркомой доксорубина и комбинации пантенола с цистеамином сопровождалось снижением ТБК-реагирующих соединений на 28% ( $p < 0,05$ ) и повышением общей антиоксидантной активности сыворотки крови на 23% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, сочетанное введение пантенола с цистеамином крысам с лимфосаркомой на фоне химиотерапии доксорубицином приводит к нормализации антиоксидантного статуса.

**Введение.** Доксорубицин (Dox) является широко и высокоэффективно используемым не-селективным антрациклиновым антибиотиком, относящимся к препаратам первой линии в лечении опухолевых заболеваний [2]. В настоящее время известны два механизма действия Dox на опухолевые клетки: интеркаляция в ДНК и нарушение репарации топоизомеразы-II-опосредованной ДНК с образованием свободных радикалов и окислительным повреждением ими клеточных мембран, ДНК и белков [4]. Применение Dox в клинической практике ограничено из-за вызываемой им кардио- и нефротоксичности [5]. В нормальных тканях цитотоксичность доксорубина связана с генерацией активных форм кислорода в редокс-циклических реакциях с участием ионов железа, что приводит к снижению редокс-потенциала системы глутатиона в тканях и запуску апоптотической гибели клеток [2, 4, 7].

Одним из подходов к снижению цитотоксичности Dox, можно отнести введение редокс-модулирующих соединений, которые способны повышать антиоксидантный статус клеток. Перспективными редокс-модулирующими соединениями, на наш взгляд, являются некоторые производные пантотеновой кислоты и продукты ее обмена, в частности, пантенол и цистеамин. Пантенол (ПЛ) — спиртовое производное пантотеновой кислоты, обладающее мембранопротекторным действием при инициации перекисного окисления липидов *in vitro*, повышает уровень восстановленного глутатиона, активирует биосинтез кофермента А и аденозин-5'-трифос-

фата в клетках и тканях [1, 3, 9]. Цистеамин (ЦSH) — аминотиол, образующийся в клетках из пантетеина, в результате ферментативного гидролиза с участием пантетеиназы. Цистеамин способствует транспорту L-цистеина в цитоплазму клеток, который в дальнейшем может быть использован для биосинтеза глутатиона.

Целью настоящего исследования явилось изучение показателей окислительного стресса в сыворотке крови крыс при сочетанном введении пантенола с цистеамином на фоне химиотерапии доксорубицином у крыс с лимфосаркомой Плисса.

**Материалы и методы исследования.** Эксперимент выполнен на самцах крыс линии Вистар массой 150–200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Нормальным животным подкожно в паховую область вводили 0,5 мл суспензии клеток лимфосаркомы (ЛС) Плисса, приготовленную на растворе Хенкса. Суспензию опухолевых клеток получали путем ферментативной (0,5 мг/мл коллагеназы, раствор Хенкса, 30 мин, 37 °С) и механической дезагрегации ткани лимфосаркомы, изъятых от животных-опухоленосителей. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 15 % телячьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина в течение 72 ч при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли центрифугированием при 1500 об/мин, 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в растворе Хенкса и использовали полученную суспензию для подкожного введения животным. Через 7 дней животным-опухоленосителям вводили доксорубин гидрохлорид (Dox, 5 мг/кг, однократно, внутривнутрибрюшинно). Далее в течение 5 дней после инъекции доксорубина вводили композицию пантенола (ПЛ, 200 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) с цистеамин гидрохлоридом (ЦSH, 100 мг/кг, внутривнутрибрюшинно). Крысам контрольной группы вводили эквивалентное количество физиологического раствора. Животных наркотизировали диэтиловым эфиром и выводили из эксперимента путем декапитации. Кровь собирали в пробирки с активатором свертывания и разделительным гелем (МиниМед, Россия) и через 15 мин центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Сыворотку крови отбирали в микропробирки Эппендорфа и замораживали при -80 °С для проведения дальнейших биохимических исследований.

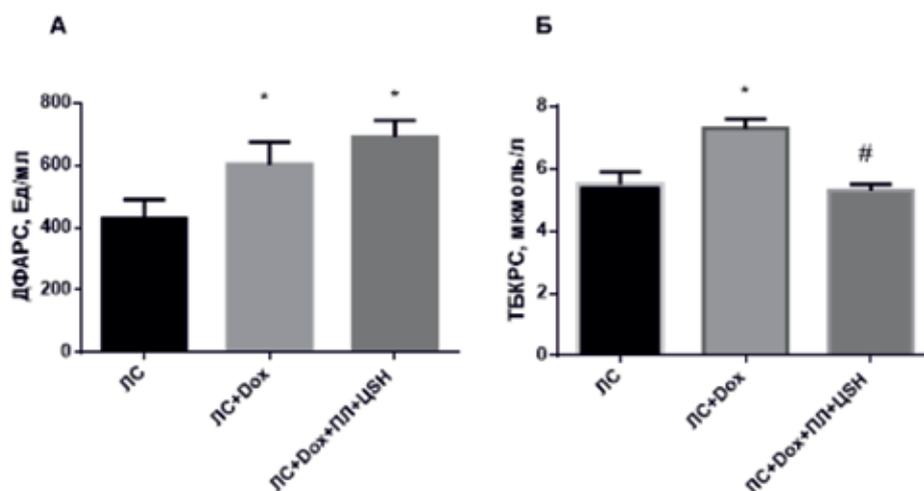
Общую оксидантную активность сыворотки крови оценивали по уровню N,N-диметил-*l*-фенилендиамин-реагирующих соединений (ДФАРС) [10], общую антиоксидантную активность (ОАА) определяли по уровню восстановления АВТС катион-радикала [6], содержание продуктов перекисного окисления липидов (ТБКРС) устанавливали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [11], уровень белковых тиолов определяли с помощью реактива Элмана [8].

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием программ Microsoft Excel 2019, GraphPad Prism 6.0. Экспериментальные данные представляли в виде  $M \pm SEM$ , где  $M$  — среднее значение,  $SEM$  — стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали с применением методов непараметрической статистики (критерий Крускала-Уолиса). Статистически значимыми считали различия при значении  $p < 0,05$  и отмечали на гистограммах символом \*.

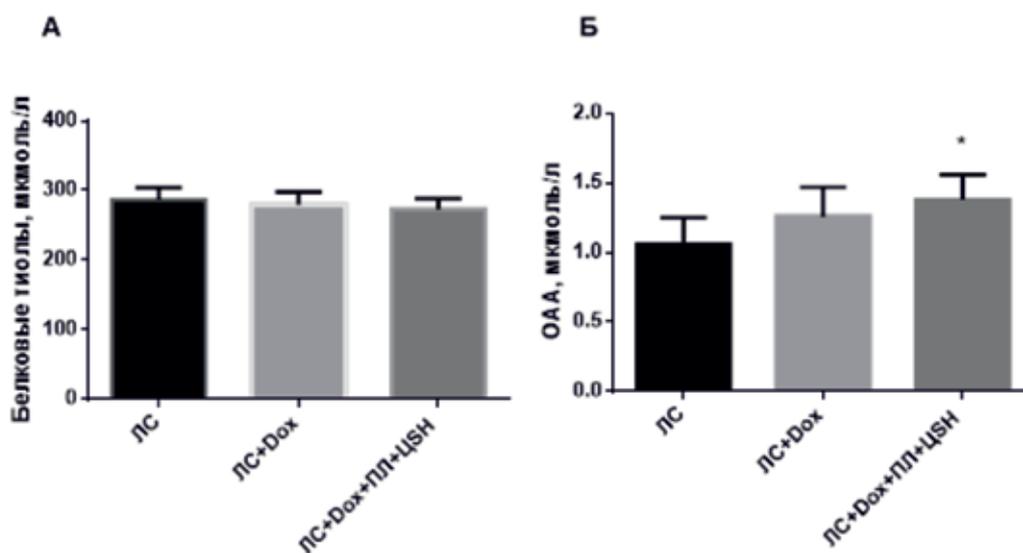
**Результаты исследования и их обсуждение.** Введение животным-опухоленосителям Dox сопровождалось активацией перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует повышение содержания ДФАРС и ТБКРС (рисунок 1). Уровень ДФАРС, отражающий уровень гидроперекисей липидов и общий оксидантный статус, был повышен на 29% ( $p < 0,05$ ) у животных-опухоленосителей, получавших химиотерапию Dox, в то время как сочетанное введение животным-опухоленосителям D-пантенола с цистеамином на фоне химиотерапии усилило оксидантную активность на 38% ( $p < 0,05$ ). Содержание ТБКРС в сыворотке крови животных

опухоленосителей, получавших химиотерапию Dox выше на 25% ( $p < 0,05$ ), по сравнению с группой животных, получавших химиотерапию с пантенолом и цистеамином, что свидетельствует о выраженном антиоксидантном действии данной композиции.

Действие Dox не привело к снижению содержания белковых тиолов и общей антиоксидантной активности сыворотки крови, однако, введение животным на фоне химиотерапии Dox с композицией D-пантенола с цистеамином способствовало увеличению общей антиоксидантной активности (ОАА) на 23% ( $p < 0,05$ ) (рисунок 2).



**Рисунок 1 — Содержание ДФАРС (А) и ТБКРС (Б) в сыворотке крови крыс с лимфосаркомой Плисса при химиотерапии доксорубицином и сочетанном введении пантенола с цистеамином**



**Рисунок 2 — Содержание белковых тиолов (А) и общая антиоксидантная активность (Б) сыворотки крови крыс с лимфосаркомой Плисса при химиотерапии доксорубицином и сочетанном введении пантенола с цистеамином**

**Заключение.** Применение химиотерапии доксорубицином у крыс с лимфосаркомой Плисса характеризуется активацией перекисного окисления липидов, что сопровождается повышением содержания в сыворотке крови карбонильных продуктов (ТБК-реагирующих

соединений) и ДФА-реагирующих соединений, отражающих общий оксидантный статус. Введение животным-опухоленосителям доксорубина не привело к снижению общей антиоксидантной активности сыворотки крови и уменьшению содержания белковых тиолов. Использование комбинации пантенола с цистеамином, на фоне химиотерапии доксорубицином у крыс с лимфосаркомой, способствовало значительному снижению содержания конечных продуктов перекисного окисления липидов и увеличению антиоксидантной активности сыворотки крови. Таким образом, композиция пантенола с цистеамином обладает выраженным антиоксидантным действием на фоне цитотоксического действия доксорубина у животных-опухоленосителей.

### Список литературы

1. Влияние D-пантенола на показатели окислительного стресса, энергетического метаболизма и тиол-дисульфидного статуса в плазме крови и больших полушариях мозга на фоне нитрита натрия / Н.П. Канунникова [и др.] // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии: сборник статей II Белорусского биохимического конгресса (г. Гродно, 17-18 мая 2018 г.) / под общ. ред. И. Н. Семенени, А. Г. Мойсеенка. — Минск: ИВЦ Минфина, 2018. — С. 527–532.
2. Ионов, С.В. Влияние метформина на доксорубин-индуцированную кардиотоксичность в эксперименте. Систематический обзор / С.В. Ионов, В.С. Орлова, Н.Ю. Кульбачевская // Вопросы онкологии. — 2021. — Т. 67, № 1. — С. 35–39.
3. Семенович, Д. С. Нейропротекторное действие D-пантенола при инициации окислительного стресса трет-бутилгидропероксидом *in vitro* [Электронный ресурс] / Д. С. Семенович // Кислород и свободные радикалы : сборник материалов международной научно-практической конференции, Гродно, 15-16 мая 2018 г. / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Учреждение образования “Гродненский государственный медицинский университет” ; редкол.: В. А. Снежицкий, С. Б. Вольф, В. В. Зинчук; под ред. В. В. Зинчука. — Гродно, 2018. — С. 166-168. — 1 эл. опт. диск.
4. Фармакологическая коррекция оксидативного стресса, индуцированного доксорубицином, в почках крыс / Ю.В. Саенко [и др.] // Нефрология. — Т.5, № 1. — С.69–74.
5. Doxorubicin-induced oxidative stress differentially regulates proteolytic signaling in cardiac and skeletal muscle / R.N. Montalvo [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2020. — Vol. 318, № 2. — P. R227–R233.
6. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation / O. Erel // *Clin. Biochem.* — 2004. -Vol. 37, № 4. — P. 277–285.
7. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity / M. Songbo [et al.] // *Toxicology Letters.* — 2019. — Vol. 307. — P. 41–48.
8. Patsoukis, N. Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators / N. Patsoukis, C.D. Georgiou // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2004. — Vol. 378, № 7. — P. 178–1792.
9. Protective effects of dexpanthenol in an experimental model of necrotizing enterocolitis / A. Karadag [et al.] // *Journal of Pediatric Surgery.* — 2015. — Vol. 50. — P. 1119–1124.
10. 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.
11. Yagi, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma / K. Yagi // *Methods Mol. Biol.* — 1998. — Vol. 108. — P. 101–106.

# CHARACTERISTICS OF OXIDATIVE STRESS INDICATORS IN BLOOD SERUM OF RATS WITH LYMPHOSARCOMA DURING CHEMOTHERAPY WITH DOXORUBICIN AND COMBINED INJECTION OF PANTENOL WITH CYSTEAMINE

---

*Semenovich D.S.<sup>1</sup>, Lukiyenko Ye.P.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Republican Scientific Research Unitary Enterprise «Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *In this study, markers of oxidative stress in the serum of rats with Pliss lymphosarcoma were studied. Rats were given chemotherapy with doxorubicin (5 mg/kg, once, intraperitoneally) and co-administration of panthenol (200 mg/kg) with cysteamine (100 mg/kg) for 5 days. The content of lipid peroxidation products and DMPD-reactive compounds in rats with doxorubicin chemotherapy was 30% higher ( $p < 0.05$ ) than in control animals without chemotherapy. Administration of doxorubicin and panthenol with cysteamine to rats with lymphosarcoma was accompanied by a 28% decrease in TBA-reactive compounds ( $p < 0.05$ ) and a 23% increase in total serum antioxidant activity ( $p < 0.05$ ). Thus, the combined administration of panthenol with cysteamine to rats with lymphosarcoma during doxorubicin chemotherapy leads to normalization of antioxidant status.*

## СОДЕРЖАНИЕ ИЗОТОПОВ КАЛИЯ-40 В ПОЧВАХ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ И ИЗМЕНЕНИЕ ЕГО СОДЕРЖАНИЯ ПРИ ВНЕСЕНИИ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ

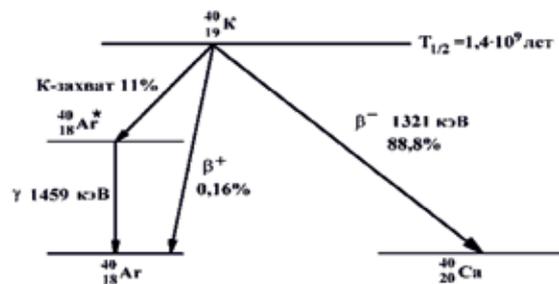
*Соколовская С.Н.*

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

**Резюме.** Радионуклид калий-40 присутствует в природных биогеоценозах и как примесь вносится с удобрениями, поэтому при внесении их в почву может повыситься суммарный уровень данного радионуклида в почве. Анализ проб различных видов показал, что наибольшее значение удельной активности на поле, при внесении удобрений. Мониторинг сельскохозяйственных угодий может способствовать наиболее рациональному подходу к внесению удобрений и поможет уменьшить вклад в радиационный фон К-40.

**Введение.** Известны три изотопа калия с массовыми числами 39, 40 и 41 (К-39, К-40 и К-41). Радиоактивным является изотоп химического элемента калия с атомным номером 19 и массовым числом 40, период полураспада которого составляет  $1,32 \cdot 10^9$  лет.

Радиоактивный калий-40, испуская бета-частицы, превращается в стабильный кальций-40. Однако он может распадаться и путем захвата электрона, превращаясь в аргон-40 (рис. 1) При этом выделяется гамма-излучение.



**Рисунок 1 — Схема распада изотопа калий-40**

Изотопная распространенность калия-40 в природе составляет 0,0117 %. Весь природный калий радиоактивен за счет распадов К-40. Радионуклид калий-40 присутствует в природных биогеоценозах и как примесь вносится с удобрениями, поэтому при внесении их в почву может повыситься суммарный уровень данного радионуклида в почве. Ионизирующие излучения, исходящие от радионуклида, могут создавать дополнительные нагрузки на живые организмы, изменить их обмен веществ, в связи с этим мониторинг накопления радионуклидов в почве является весьма актуальным [1].

Содержание калия в разных типах почв изменяется в пределах от 1 до 3,5 %, при этом радиоактивность, обусловленная К-40, может составлять 300–1000 Бк/кг (приблизительно 80–95 % от всей радиоактивности почвы). Содержание калия зависит от гранулометрического состава почвы: песчаные и супесчаные содержат 0,5–1,5 %; суглинистые — 1–3 %. Минимальными количествами отличаются торфяные почвы — 0,03–0,15 % [2].

Из разных форм нахождения в почвах калий неодинаково доступен растениям. Наиболее доступными для растений являются водорастворимые формы этого элемента. Содержание валового калия в почвах обычно во много раз превышает концентрации калия почвенного раствора и обменного К. Различают разные формы калия в почвах: калий почвенного раствора; обменный калий; труднообмениваемый калий и калий почвенных минералов [3]. Эти формы находятся в равновесии, при нарушении которого (удаление или внесение элемента) ионы  $K^+$  заново перераспределяются между указанными формами. Равновесие между растворимой и обменной формами достигается за несколько минут. Равновесие между труднообмениваемой, обменной или растворимой формами устанавливается значительно медленнее (дни, месяцы). Превращение калия минералов протекает очень медленно и зависит от природы минерала.

Усвояемый растениями калий составляет около 1–2 % от общего [3]. Однако избыточное содержание К-40 в почве может привести и к повышению его в растениях.

**Материалы и методы исследования.** Проводился анализ проб почвы различных видов на содержание в них радиоактивного К-40. Для измерения удельной активности К-40 проб почвы использовался гамма-радиометр со сцинтилляционным детектором РКТ-АТ1320. Гамма-радиометр используется для радиоэкологического мониторинга окружающей среды и для радиометрического контроля качества продукции предприятий агропромышленного комплекса. Радиометр измеряет удельную и объемную активность радионуклидов Cs-137 и К-40. Диапазон измерения для К-40  $50-2 \cdot 10^4$  Бк/кг, чувствительность  $4,54 \pm 0,68 \cdot 10^{-4}$  Бк/кг. Пробы отбирались в разных местах Гродненской области, просушивались и отчищались от органических примесей (масса проб 0,25 кг).

**Результаты исследования и их обсуждение.** На первом этапе исследований изучались пробы различных почв. В результате проведенных измерений выяснилось, что активность не зависит от гранулометрического состава почвы, однако по видам почв обнаружили некоторую закономерность. Результаты измерений приведены в табл. 1.

**Таблица 1 — Удельная активность К-40 проб почв различных видов**

Вид почвы	Удельная активность, Бк/кг
Чернозём	$436,2 \pm 38,6$
Торфяная (лес)	$757,4 \pm 44,4$
Торфяная (луг)	$845,7 \pm 43,8$
Суглинистая (лес)	$933,2 \pm 81,3$
Суглинистая (луг)	$1255,3 \pm 89,1$
Суглинистая (посевное поле)	$2115,1 \pm 108,9$
Глинистая	$1035,5 \pm 89,7$
Песчаная (лес)	$1320,4 \pm 98,5$
Песчаная (луг)	$1312,8 \pm 96,6$
Песчаная (дорога)	$1577,6 \pm 103,8$

При анализе приведенных данных хочется обратить внимание на тот факт, что наибольшее значение удельной активности для проб почвы, которые были собраны на поле, где проводились агрохимические мероприятия, вероятнее всего, вносились удобрения, в том числе и калийные.

Поэтому наиболее актуально исследовать пробы почв с полей, на которых проводились работы с внесением минеральных и других видов удобрений. Данные проведенных исследований приведены в табл. 2.

**Таблица 2 — Удельная активность К-40 проб суглинистых почв с посевных полей различных районов**

Район, присутствие удобрений	Удельная активность, Бк/кг
Без внесения удобрений. Мостовский р-н	426,9 ± 20,5
После внесения органических удобрений. Мостовский р-н	787,4 ± 41,7
После внесения минеральных удобрений. Мостовский р-н	1167,4 ± 42,1
Без внесения удобрений. Брестская область	487,7 ± 28,3
После внесения удобрений. Брестская область	910,2 ± 81,3
Без внесения удобрений. Ошмянский р-н	1153,5 ± 93,2
После внесения удобрений. Ошмянский р-н	2115,1 ± 111,7

При анализе приведенных результатов можно отметить, что при внесении удобрений, содержание изотопов К-40 повышается, как и прогнозировалось. Каждое из угодий имеет свое индивидуальное содержание изотопа, зависящее от состава почвы, времени и количества удобрений, вносимых ранее. Следует также рассматривать, как будет уменьшаться содержание изотопа с течением времени с момента внесения удобрений. Все эти факторы следует учитывать при очередном внесении удобрений и анализировать переход К-40 в растения.

Из разных форм нахождения в почвах калий неодинаково доступен растениям. Ближайший резерв обеспеченности растений калием представляют водорастворимые и обменные формы этого элемента. Содержание валового калия в почвах обычно во много раз превышает концентрации калия почвенного раствора и обменного К. Однако избыточное содержание К-40 в почве может привести и к повышению его и в растениях.

**Заключение.** Таким образом, после внесения минеральных удобрений повышается содержания К-40 в пробах почвы. Следует также учитывать исходное содержания калия в почвах и исходя из этого корректировать количество вносимых удобрений. Мониторинг сельскохозяйственных угодий может способствовать наиболее рациональному подходу к внесению удобрений и поможет уменьшить вклад в радиационный фон К-40.

### Список литературы

1. Мархоцкий, Я.Л. Безопасность жизнедеятельности человека / Я.Л. Мархоцкий. — Минск: БГУКИ, 2017. — 133 с.
2. Кидин, К.В. Агрохимия / К.В. Кидин, С.П. Торшин. — М.: Проспект, 2015. — 619 с.
3. Агрохимическое обследование и мониторинг почвенного плодородия / А.Н. Есаулко, [и др.]. — Ставрополь: АТРУС, 2012. — С. 130–135.

# CONTENTS OF ISOTOPES POTASSIUM-40 IN SOILS OF VARIOUS SPECIES AND CHANGE OF ITS CONTENTS WHEN APPLYING MINERAL FERTILIZERS

---

*Sakalouskaya S.*

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

***Summary.*** Potassium radionuclide-40 is present in natural biogeocenoses and is introduced as a fertilizer with fertilizers, after which the general level of this radionuclide in the soil can increase. The analysis of samples of various types showed that the specific activity on the field is of greatest importance when applying fertilizers. Monitoring of agricultural land can contribute to the most rational approach to fertilizer application and will help reduce the contribution to the K-40 radiation background.

## ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА В РАЗВИТИИ COVID-19

---

*Стенуро Т.Л.*

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

**Резюме.** В представленном обзоре литературы рассматриваются перспективы и значение выявления генетических маркеров, ассоциированных с тяжестью течения, осложнениями, летальностью, а также эффективностью лечения COVID-19. Автором очерчены основные проблемные моменты, с которыми и могут столкнуться исследователи в процессе поиска генов-кандидатов, ответственных за результат взаимодействия человека с SARS-CoV-2.

Актуальность изучения влияния полиморфных вариантов генов на развитие пандемии COVID-19 обусловлена необходимостью поиска ключевых патогенетических факторов данного заболевания. Выявление генетических маркеров, ассоциированных с тяжестью течения, осложнениями заболевания, летальностью, позволит разработать эффективные меры профилактики, таргетные подходы к терапии, а также обеспечит более качественную реабилитацию пациентов.

Как любое инфекционное заболевание COVID-19 обусловлен не только воздействием неблагоприятных средовых факторов, но и индивидуальными особенностями организма, его восприимчивостью к патологическому воздействию инфекционного агента. На сегодняшний день поиски генов-кандидатов, которые ассоциированы с развитием COVID-19, нацелены на системы иммунного и воспалительного ответа организма, ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС), количественную и качественную вариабельность экспрессии рецепторов на поверхности клеток хозяина и активности различных протеаз организма человека, принадлежность к определенной группе крови, носительство специфических комбинаций лейкоцитарных антигенов человека (HLA) и многие другие [2, 4, 5, 6, 8, 9].

Первыми генами, полиморфизм которых начали исследовать в связи с тяжестью протекания заболевания, оказались гены, ответственные за проникновение вируса SARS-CoV-2. Ключевую роль в интернализации вирусной РНК в клетки человека играют такие белки, как ангиотензин I-превращающий фермент 2 (ACE2) и трансмембранная сериновая протеаза 2 (TMPRSS2) [10]. ACE2 является поверхностным белком, экспрессируемым в значительном количестве клеток человека, особенно в верхних и нижних дыхательных путях, сердце, проксимальных отделах канальцев почек, в жировой ткани, ткани яичек, желудочно-кишечного тракта, преимущественно тонкого кишечника, в гладкомышечных клетках артериол, эндотелии сосудов и лимфоцитов. Этот белок является основным рецептором для шипикового белка (S), опосредующего адсорбцию вируса к клеткам-мишеням. Кроме того, расщепление этого рецепторного белка и слияние вирусной оболочки с мембраной клеток хозяина происходит с участием TMPRSS2 [10].

Значение полиморфных вариантов генов ACE2 и TMPRSS2 в развитии COVID-19 является достаточно противоречивым. В популяциях азиатов и коренных европейцев были выявлены

незначительные различия в частоте встречаемости минорных аллелей гена ACE2 [11]. Некоторые из обнаруженных миссенс мутаций приводят к изменению пространственной структуры белка [11], что потенциально может изменить связывание вируса с ACE2, повлиять на различия в экспрессии рецептора, легочное и системное повреждение через процессы регуляции вазоконстрикции, воспаления и фиброза [12].

В свою очередь в своих исследованиях Lopez Maya E.A. и соавторы не нашли существенных доказательств того, что в общей популяции северной Голландии различные варианты локусов перечисленных генов были связаны с фенотипами, сформированными на основании таких количественных признаков, как показатели гемограммы, спирограммы, электрокардиограммы, антропометрические показатели, цитокиновый профиль и т. д. [13]. Однако было показано, что однонуклеотидные полиморфизмы в гене ACE2 были связаны с применением комбинированной терапии блокаторами рецепторов ангиотензина II, в этом случае ассоциация была выражена значительно сильнее у женщин, а также с применением нестероидных противовоспалительных и противоревматических лекарственных препаратов [13].

Известно, что показатели восприимчивости, степень выраженности симптомов, летальности при COVID-19 зависят от пола. Отчасти это может быть обусловлено тем, что ген ACE2 расположен на X-хромосоме, следовательно, мужчины являются гемизиготными по данному гену. Наличие только одной копии гена предполагает, что изменения, возникающие в нем, будут проявляться в большем проценте случаев, чем у гетерозиготных носительниц той же мутации женского пола. Также необходимо учесть, что экспрессия TMPRSS2 подвержена регуляторным влияниям андрогенами и эстрогенами [1]. Результаты сравнительного изучения подтвердили, что перечисленные гены могут вносить свой вклад в течение COVID-19 и при этом обуславливать наблюдаемые гендерные различия. Например, выявленный в данном исследовании полиморфный вариант экзона (p.Val160Met) и 2 различных гаплотипа TMPRSS2 имели существенные различия в частоте встречаемости в восточноазиатской и итальянской популяциях. Редкие аллели этих гаплотипов, которые индуцируют более высокие уровни TMPRSS2, чаще встречаются у итальянцев, чем у населения Восточной Азии, при этом в одном из приведенных полиморфных вариантов результат экспрессии гена зависел от уровня андрогенов [1].

Значение полиморфных вариантов указанных генов в тяжести развития и исходе COVID-19 может реализовываться не только напрямую, посредством воздействия на уровень поражения клеток организма хозяина вирусом, но также оказывать опосредованное влияние через развитие сопутствующих коморбидных заболеваний. Анализ тяжести и уровня летальности пациентов с COVID-19 позволяет выделить следующие факторы риска, влияющее на прогноз риска: мужской пол, возраст старше 60 лет, наличие хронических заболеваний (гипертония, диабет, сердечно-сосудистые заболевания, хронические заболевания легких и почек и т. д.) [3].

Защитная роль ACE2 реализуется в подавлении РААС, чрезмерная активация которой является одним из ключевых патофизиологических механизмов гипертонии. ACE2 способствует деградации ангиотензина II, повышает уровень вазодилататорного пептида ангиотензин 1–7, который также подавляет атеросклеротическое поражение сосудов. ACE2 способно противодействовать фиброзу сердца и ремоделированию желудочков, вызванным и долгосрочными эффектами ангиотензина II. При диабетической нефропатии подавление почечного канальцевого ACE2 приводит к протеинурии и повреждению канальцев [3]. В подтверждение сказанному выше было показано, что развитие ряда сердечно-сосудистых заболеваний было ассоциировано с носительством особых полиморфных вариантов гена ACE2 [7]. Таким образом, поиск генетических детерминант предрасположенности к развитию тяжелых форм COVID-19, про-

гноза исходов, эффективности лечения лежит не только в плоскости патогенеза указанного инфекционного заболевания, но и сопряженных с ним коморбидных патологий.

В процессе поиска генов-маркеров, являющихся предикторами развития COVID-19, как любого другого мультифакторного заболевания, необходимо принимать во внимание ряд факторов. Во-первых, вклад аллелей одного и того же локуса в развитие заболевания может существенно различаться в зависимости от выбранной популяции, даже при наличии одинаковой частоты аллелей в разных популяциях их вклад в патогенез может существенно различаться. В этом случае главную роль играет не только статистическая значимость полученных результатов, но и их клиническое значение. Во-вторых, исследователям необходимо быть предельно внимательными при формировании группы, выбирать точные критерии для сохранения однородности выбранной группы. Необходимо также помнить, что вклад аллелей в развитие COVID-19 зависит от влияния средовых факторов (географическое расположение популяции, особенности социального поведения, питания и т. д.), которые могут вносить свою поправку как в распределение частот аллелей, так и регулировать активность гена через эпигенетические механизмы. Зачастую, выявленная ассоциация «локус-фенотип» может относиться не к идентифицированному гену, а к генетическому маркеру, который тесно сцеплен с обнаруженным аллелем, и продукт которого непосредственно вовлечен в патогенез заболевания. В связи с этим исследователи прибегают к изучению структуры не только самого гена и его регуляторных областей, но и прилежащих последовательностей ДНК, входящих в одну группу сцепления с ним. Наиболее перспективным подходом для решения поставленной задачи является метод полногеномного анализа ассоциаций. Необходимо также отметить, что при выявлении генов-кандидатов мультифакторного заболевания исследователю необходимо принимать во внимание также наличие взаимодействия генов (например, эпистаз), а также различной степени их пенетрантности и экспрессивности.

Создание «генетического профиля» восприимчивости человека к SARS-CoV-2 является трудоемкой задачей, полной вызовов и многообещающих решений. С этой целью была создана международная платформа «The COVID-19 Host Genetics Initiative», деятельность которой направлена на объединение сообществ генетиков для генерирования, обмена и анализа данных с целью изучения генетических детерминант восприимчивости, тяжести и исходов COVID-19 [14]. Организаторы инициативы считают, что результаты общей деятельности «могут помочь выработать гипотезы для перепрофилирования лекарств, выявить лиц с необычно высоким или низким риском и внести вклад в глобальные знания биологии инфекции и заболевания SARS-CoV-2».

### Список литературы

1. ACE2 and TMPRSS variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy / R. Asselta [et al.] // *Aging (Albany NY)*. — 2020. — Vol. 12, № 11. — P. 10087–10098.
2. Badawi, A. Hypercytokinemia and Pathogen-Host Interaction in COVID-19 / A. Badawi // *J. Inflamm. Res.* — 2020. — № 13. — P. 255–261.
3. Cheng, H. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19 / H. Cheng, Y. Wang, G.Q. Wang // *J. Medical Virology*. — 2020. — Vol. 92(7). — P. 726–730.
4. Darbani, B. The Expression and Polymorphism of Entry Machinery for COVID-19 in Human: Juxtaposing Population Groups, Gender, and Different Tissues / B. Darbani // *Int J. Environ. Res. Public Health*. — 2020. — Vol. 17, № 10. — P. 3433.
5. Delanghe, J.R. The host's angiotensin-converting enzyme polymorphism may explain epidemiological findings in COVID-19 infections / J.R. Delanghe, M.M. Speeckaert, M.L. De Buyzere // *J. Clin. Chim. Acta*. — 2020. — Vol. 505. — P. 192–193.

6. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure / D. Ellinghaus [et al.] // N. Engl., J. Med. — 2020. [published online ahead of print, 2020 Jun 17].
7. Hypertension and hypertensive left ventricular hypertrophy are associated with ACE2 genetic polymorphism / Z. Fan [et al.] // J. Life Sci. — 2019. — Vol. 225. — P. 39–45.
8. Gupta, R. COVID19 in South Asians/Asian Indians: Heterogeneity of data and implications for pathophysiology and research / R. Gupta, A. Misra // J. Diabetes Res Clin Pract. — 2020. — Vol. 165. — P. 108–267.
9. Worldwide ACE (I/D) polymorphism may affect COVID-19 recovery rate: an ecological meta-regression / N. Hatami [et al.] // J. Endocrine. — 2020. — Vol. 68, № 3. — P. 479–484.
10. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor / M. Hoffmann [et al.] // Cell. — 2020. — Vol. 181. — P. 271–280.
11. Li, Q. Genetic variability of human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) among various ethnic populations / Q. Li, Z. Cao, P. Rahman // Mol. Genet. Genomic. Med. — 2020. [published online ahead of print, 2020 Jun 18].
12. Do genetic polymorphisms in angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) gene play a role in coronavirus disease 2019 (COVID-19)? / G. Lippi [et al.] // J. Clin. Chem. Lab. Med. — 2020. [published online ahead of print, 2020 Jun 29].
13. Lack of Association Between Genetic Variants at ACE2 and TMPRSS2 Genes Involved in SARS-CoV-2 Infection and Human Quantitative Phenotypes / E.A. Lopera Maya [et al.] // Front Genet. — 2020. — Vol. 11. — P. 613.

## PECULIARITIES OF STUDYING THE ROLE OF HUMAN GENES POLYMORPHISM IN COVID-19 DEVELOPMENT

---

*Stsiapura T.L.*

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

**Summary.** *The review is focused on the discussion of the prospects and importance of identification of genetic markers associated with COVID-19 severity, complications, mortality, and effectiveness of its treatment. The author outlines the main problem points that researchers may face in the search for candidate genes responsible for the result of human interaction with SARS-CoV-2.*

## ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТА UVA ДИАПАЗОНА НА ВОДНЫЕ РАСТВОРЫ ТИОХРОМА

*Степура И.И.<sup>1</sup>, Агейко С.А.<sup>1</sup>, Степура В.И.<sup>2</sup>, Дробышевская А.А.<sup>2</sup>,  
Смирнов В.Ю.<sup>3</sup>, Янцевич А.В.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Государственное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>4</sup>Государственное предприятие «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** Изучали продукты фотолиза тиохрома, который является продуктом окисления тиаминина и используется для определения концентрации тиаминина флуориметрическим методом. После воздействия ультрафиолета UVA диапазона на водные растворы тиохрома (максимум поглощения 365 нм) в атмосфере воздуха образуется оксодигидротиохром (максимум поглощения 342 нм,  $m/z=278,0837$ ) в качестве основного продукта. Оксодигидротиохром затем окисляется под действием ультрафиолета с образованием оксотиохрома ( $m/z=276,0681$ ) и небольших количеств 2,3<sup>1</sup>-оксотиаминина  $m/z=294,0787$ . Высокие концентрации азиды полностью ингибировали образование продуктов фотолиза тиохрома. Обсуждается возможная роль синглетного кислорода в окислении тиохрома под действием ультрафиолета UVA диапазона.

**Введение.** Тиохром [2,7-диметилтиохромине-8-этанол] был впервые выделен из дрожжей (20 мг из 1,2 кг), как соединение ответственное за желтую окраску Kuhn с соавторами в 1935 г., которые и предложили название тиохром для данного соединения [5]. Тиохром также получен химическим синтезом [3,2]. Показано, что тиохром не обладает витаминной активностью [24]. Он образуется при окислении тиаминина феррицианидом, пероксидом водорода, двуокисью селена в щелочной среде [24,7]. Тиохром поглощает при 358 и 375 [24] и обладает интенсивной голубой флуоресценцией в нейтральной и щелочной средах [16]. Максимум флуоресценции тиохрома лежит при 445 нм, а максимум возбуждения при 365/370 нм [8,14]. Физико-химические свойства и важность тиохрома для биохимии как биологически активного соединения обсуждалось ранее [21].

Определение тиаминина флуоресцентным тиохромным методом было впервые предложено [4]. С тех пор тиохромный метод определения тиаминина претерпел множество модификаций и широко использовался для определения концентраций чистых его форм в водных растворах, в продуктах питания, в фармацевтических препаратах [10,9,6,13,15,11,19,20,12,1].

Тиохром окисляется под действием диоксида азота, генерируемого высокоокисленными формами гемопротеинов в присутствии нитрита и пероксидов [16,14]. И под действием синглетного кислорода с образованием флуорисцирующего соединения — оксодигидротиохрома 8-(2-hydroxyethyl)-2,7-dimethyl-5-oxo-5,6-dihydrothiazole [2,3-a]-pyrimido-[4,5-d] pyrimidine (ODTHC) (3) [22].

Хроматографические и спектральные свойства тиохрома и продуктов его окисления [8,14,22], а также химическое строение продуктов фотолиза тиамин [23] изучались методами абсорбционной и молекулярной спектроскопии, ПМР — и мсс-спектроскопии [22,23].

Показано, что тиохром под действием ультрафиолета UVA диапазона генерирует синглетный кислород. Квантовый выход синглетного кислорода при воздействии ультрафиолета UVA диапазона на водные растворы тиохрома равен 0,16 [18].

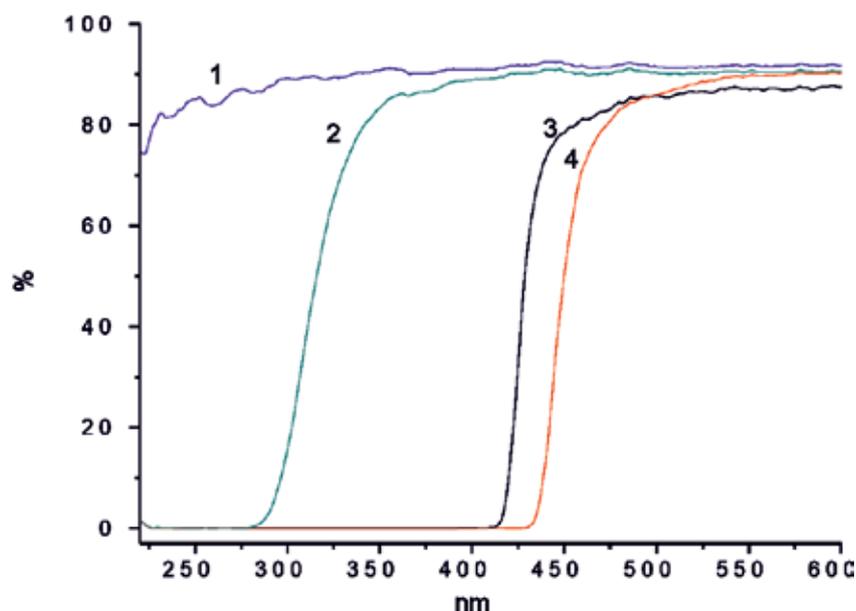
Кинетику фотолиза тиохрома в водных растворах, изучали методами флуоресценции и абсорбционной спектроскопии в районе значений pH среды 7,0-12,0 [17].

Тиохром под действием ультрафиолета образует оксодигидроотиохром, который затем окисляется с образованием нефлуоресцирующих продуктов. Скорость деградации как тиохрома, так и оксодигидроотиохрома возрастает при увеличении значения pH среды [17].

Целью данной работы было исследование химического строения продуктов фотолиза тиохрома, образованных под действием ультрафиолета UVA диапазона на его водные растворы в аэробных условиях и поглощающих в коротковолновой области спектра ( $\lambda < 340$  нм).

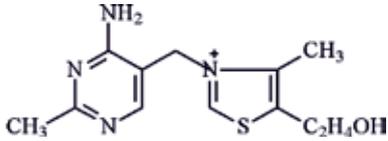
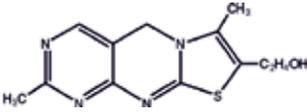
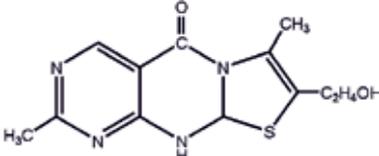
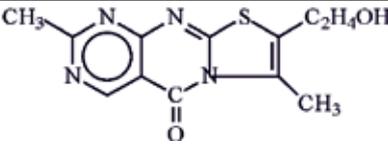
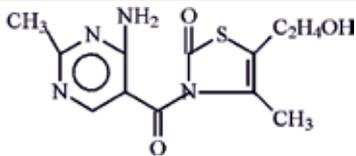
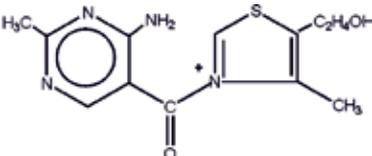
**Материалы и методы исследования.** В работе использовали тиамин (Т) и тиохром (TChr) фирмы Sigma (США), оксодигидроотиохром, полученный химическим синтезом [22]. Структурные формулы тиамин, тиохрома и продуктов фотолиза тиохрома приведены в таблице 1.

Водные растворы тиохрома (вода или фосфатный буфер) облучали светом ртутных ламп (СВД-120А или ПРК-4), а также солнечным излучением. Растворы облучали в кварцевых кюветках полным светом ламп или использовали светофильтры УФС-1 для выделения спектральной области 280–400 нм, УФС-6 — для выделения линий при 365 нм. Облучение водных растворов тиохрома проводили также в стеклянных кюветках. В этом случае стеклянные стенки кюветки служили для выделения спектральной области с длинами волн  $\lambda > 300$  нм (рисунок 1). Водные растворы тиохрома в кварцевой кюветке облучали также спектром излучения диода LED 365 с максимумом генерации излучения при 365 нм.



**Рисунок 1 — Пропускание света в % после прохождения излучения через кварцевую кюветку, заполненную водой (1), после прохождения света через стеклянную кюветку, заполненную водой (2), после прохождения света через светофильтр ЖС-11 (3), после прохождения света через светофильтр ЖС-12 (4).**

**Таблица 1 — Структурные формулы тиамин, тиохрома, продуктов фотолиза тиохрома и величины m/z их молекулярных ионов.**

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	m/z молекулярных ионов, относительная интенсивность
<p>Тиамин (Т)</p> <p>Массы изотопологов:  <math>M_0=265,1123</math> (81,8 %)  <math>M_1=266,1149</math> (12,7 %)  <math>M_2=267,1102</math> (4,7 %)</p>	 <p>(I)</p>	<p>265,1115 <math>[M_0]^+</math> (100%)                  266,1143 <math>[M_1]^+</math> (13%)                  267,1086 <math>[M_2]^+</math> (3%)</p>
<p>Тиохром (TChr)</p> <p>Массы:  <math>M_0=262,0888</math> (81,9 %)  <math>M_1=263,0914</math> (12,6 %)  <math>M_2=264,0867</math> (4,7 %)</p>	 <p>(II)</p>	<p>263,096 <math>[M_0+H]^+</math> (100%)                  264,097 <math>[M_1+H]^+</math> (15%)</p>
<p>Оксидигидроотиохром (ODTChr)</p> <p>Массы:  <math>M_0=278,0837</math> (81,7 %)  <math>M_1=279,0863</math> (12,6 %)  <math>M_2=280,0819</math> (4,9 %)</p>	 <p>(III)</p>	<p>279,091 <math>[M_0+H]^+</math> (100%)                  280,094 <math>[M_1+H]^+</math> (14%)</p>
<p>Оксотиохром (охо-TChr)</p> <p>Массы:  <math>M_0=</math> (81,7 %) 276,0681  <math>M_1=277,0707</math> (12,6 %)  <math>M_2=278,0662</math> (4,9 %)</p>	 <p>(IV)</p>	<p>277,076 <math>[M_0+H]^+</math>                  – 41893                  277,0758-1398 (100%)                  278,0839 <math>[M_0+2H]^+</math>                  6082</p>
<p>2,3<sup>1</sup>-оксотиамин (2,3<sup>1</sup>-охо-Т)</p> <p><math>M_0=</math> (81,54 %) 294,0787  <math>M_1=</math> (12,64 %) 295,0813  <math>M_2=</math> (5,06 %) 296,077</p>	 <p>(V)</p>	<p>295,0856 <math>[M_0+H]^+</math>                  3847-100%</p>
<p>3<sup>1</sup>-оксотиамин (3<sup>1</sup>-оксо-Т)</p>	 <p>(VI)</p>	<p>m/z=279,1084 <math>[M]^+</math></p>

Методом гельфильтрации на колонке заполненной сефадексом G-50 из облученного раствора выделяли фракции, содержащие тиохром и оксидигидроотиохром и смесь продукты поглощающих в коротковолновой области (менее 320 нм). Идентификацию тиохрома и оксидигидроотиохрома проводили спектрально-флуоресцентными методами [14]. Спектрально-флуоресцентные свойства тиохрома и оксидигидроотиохрома в различных растворителях приведены в таблице 2.

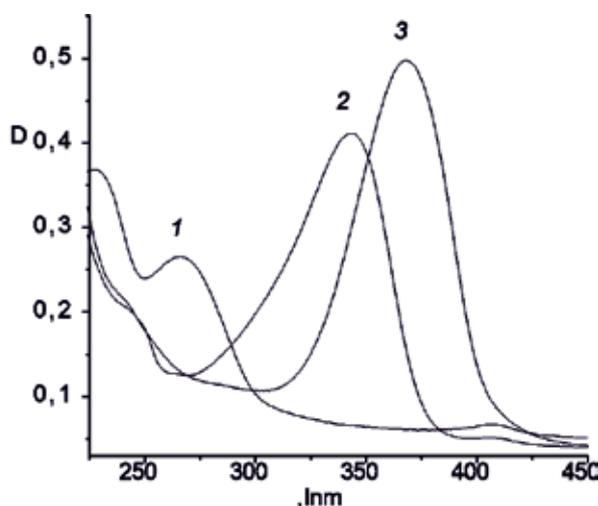
Разделение и идентификацию продуктов фотолиза тиохрома, образовавшихся после воздействия ультрафиолета на их водные растворы, проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent-1100, сорбент ZORBAX-Extend-C18 с использованием соединений стандартов (тиохром

и оксидигидротиохром). Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось с использованием квадрупольно-времяпролетного tandemного масс-спектрометрического детектора Q-TOF 6550 (Agilent) в режиме ионизации электрораспылением (ESI). Обработка хроматограмм и масс-спектров проводилась в программе Mass Hunter Qualitative Analysis (Agilent). Измерения флуоресценции TChr и ODTChr проводили на спектрофлуориметре CM 2203 (Солар, Беларусь), измерения спектров поглощения TChr и ODTChr и продуктов фотолиза TChr проводили на спектрофотометре Cary-100 (США).

**Таблица 2 — Спектрально-флуоресцентные свойства тиохрома и оксидигидротиохрома в различных растворителях [6].**

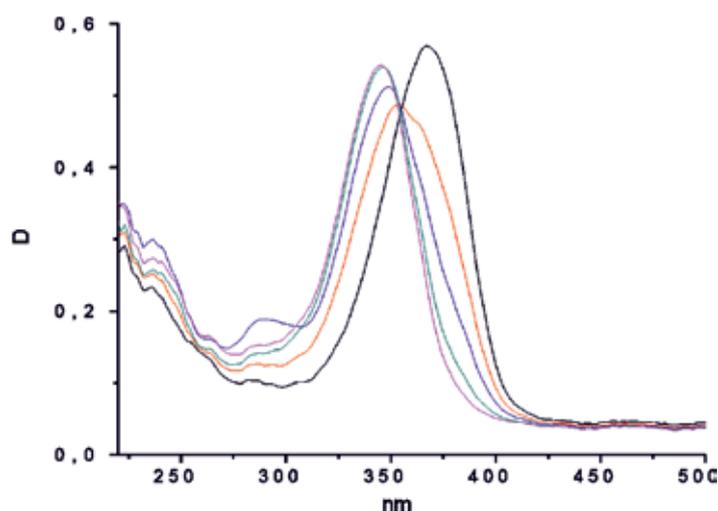
Название соединения	Растворитель	$\lambda_{abs}$ , нм	$\lambda_{fl}$ , нм	$\Phi$
ODTChr	H <sub>2</sub> O, pH 7.4	349	444	0,03
ODTChr	H <sub>2</sub> O, pH 2.1	372	425	Меньше 0,01
ODTChr	Этанол	351	415	0,3
ODTChr	Бутанол	350	412	0,26
TChr	Вода, pH 3,8 (катионная форма)	391	494	0,02
TChr	Вода, pH 7,4 (нейтральная форма)	365	445	0,28
TChr	этанол	369	430	0,75

**Результаты. Действие ультрафиолета UVA на водные растворы тиохрома.** В спектре поглощения тиохрома присутствуют три полосы с максимумами 230 нм, 260 нм и 365 нм (рисунок 2).

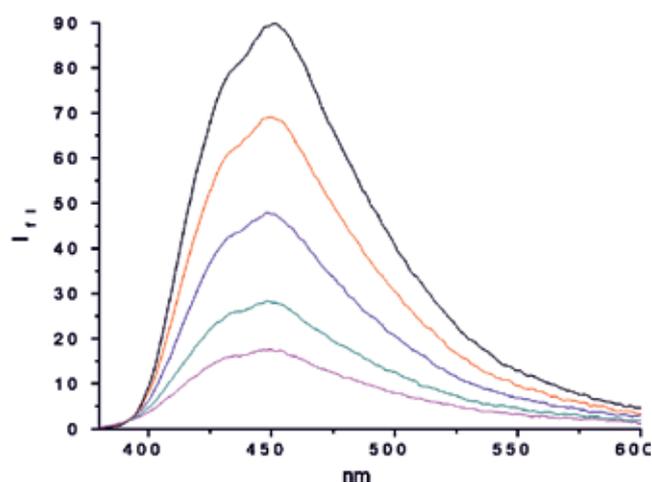


**Рисунок 2 — Спектры поглощения тиаминa (1), оксидигидротиохрома (2), тиохрома (3). Концентрация соединений 0,25 мМ, фосфатный буфер 0,05 мМ, pH=7,0.**

При воздействии ультрафиолета диапазона области UVB или на водные растворы тиохрома наблюдали образование оксидигидротиохрома. Максимум поглощения характерный для тиохрома при 365 нм сдвигался в коротковолновую область до 340 нм (рисунок 3), а интенсивность флуоресценции, характерной для тиохрома снижается и наблюдается небольшой коротковолновой сдвиг максимума флуоресценции (рисунок 4), вызванный образованием оксидигидротиохрома. В водных растворах квантовый выход флуоресценции оксидигидротиохрома низок (таблица 2).



**Рисунок 3– Изменение спектров поглощения тиохрома в зависимости от времени воздействия UVB на его водные растворы. Водные растворы тиохрома в кварцевой кювете облучали полным спектром лампы СВД-120А в течение 30 мин, 60 мин.,90 мин.,120 мин. Концентрация тиохрома 20 мкМ.**

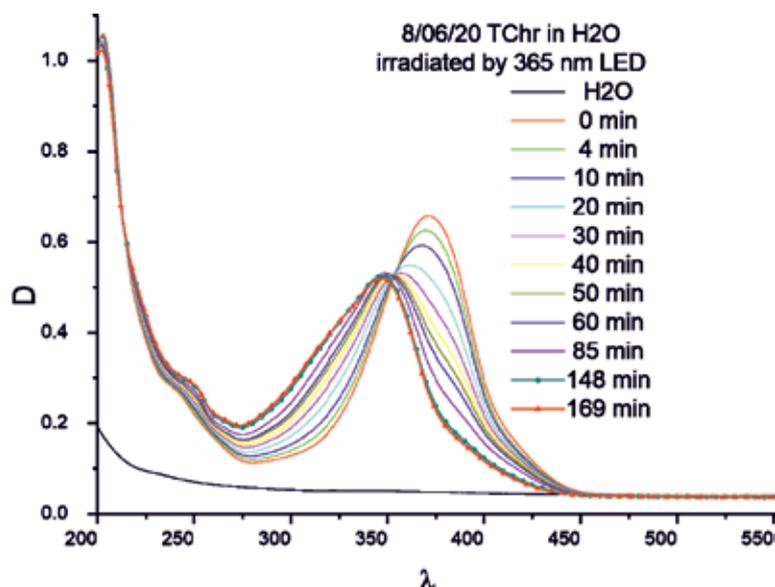


**Рисунок 4 — Изменение спектров флуоресценции тиохрома в зависимости от времени воздействия ультрафиолета UVB на его водные растворы. Водные растворы тиохрома в кварцевой кювете облучали полным спектром лампы СВД-120А в течение 30 мин, 60 мин., 90 мин., 120 мин. Концентрация тиохрома 20 мкМ. Длина волны возбуждения флуоресценции 360 нм.**

Такие же изменения спектров поглощения и флуоресценции тиохрома наблюдали при воздействии на его водные растворы излучения диода LED 365 с максимумом генерации излучения при 365 нм. Действительно, длинноволновая полоса спектра поглощения продуктов фотолиза тиохрома сдвигается в коротковолновую область (рисунок 5). Кроме того, полоса поглощения продуктов фотолиза тиохрома асимметрична и имеет небольшое плечо при 320 нм, что, вероятно, указывает на наличие продукта поглощающего в этой области.

В кислой среде тиохром устойчив к действию ультрафиолета (рисунок 6).

Облучение водных растворов тиохрома спектром ртутной лампы СВД-120А в течение продолжительных промежутков времени не приводило к изменению формы спектров поглощения тиохрома при низких значениях рН среды.



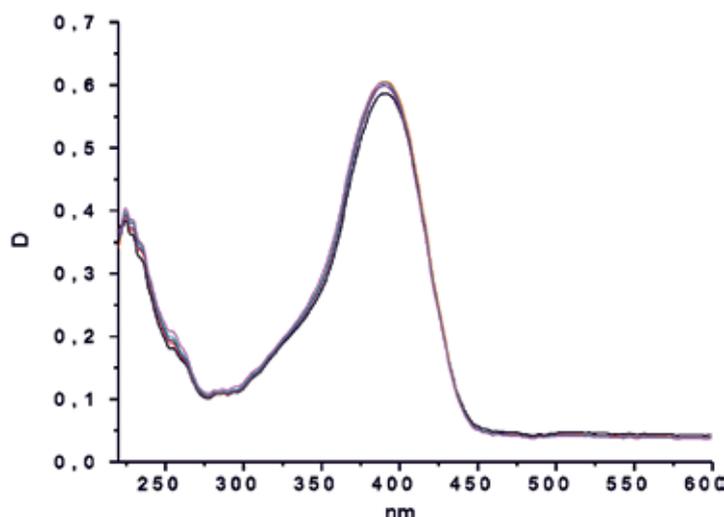
**Рисунок 5 — Изменение спектров поглощения тиохрома в зависимости от времени воздействия UVA на его водные растворы. Водные растворы тиохрома в кварцевой кювете облучали спектром излучения диода LED 365 в течение 169 мин. Концентрация тиохрома 35 мкМ.**

Обнаружено, что при низких pH в водных растворах тиохром присутствует в форме однозаряженного катиона, характеризующегося спектром поглощения с максимумом при 391 нм и низкоинтенсивной флуоресценцией в районе 493 нм (таблица 2). С увеличением pH среды протекает протолитическая реакция с образованием нейтральной формы тиохрома. При этом спектр поглощения изменяется и максимум длинноволновой полосы поглощения для нейтральной формы молекулы наблюдается при 367 нм. Нейтральная форма характеризуется интенсивной флуоресценцией с максимумом при 445 нм и квантовым выходом  $\Phi = 0.28$ . Ионное равновесие между нейтральной и катионной формами TChr характеризуется значением  $pK_a \sim 5,5$ , однако при фотовозбуждении молекулы величина  $pK_a^*$  существенно изменяется. Используя метод цикла Ферстера было оценено, что вследствие возрастания основных свойств молекулы TChr в возбужденном состоянии происходит увеличение значения  $pK_a^*$  на  $\sim 4.2$  единицы [10].

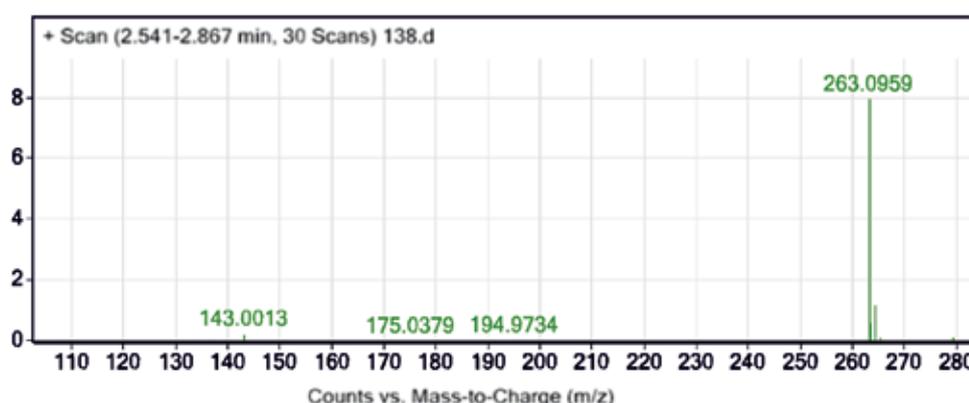
Можно ожидать, что при фотовозбуждении молекулы тиохрома в растворах при нейтральных pH в возбужденном состоянии будет эффективно протекать процесс образования катионной формы либо, по крайней мере, образования водородной связи между TChr и молекулами протонодонорных растворителей. Учитывая низкий квантовый выход флуоресценции катионной формы ( $\Phi=0,02$ ), мы полагаем, что данные процессы в возбужденном состоянии могут быть ответственны за тушение флуоресценции TChr в водных растворах. В самом деле, для растворов TChr в спиртах и апротонных растворителях наблюдалось значительное увеличение квантового выхода флуоресценции (таблица 2).

Данные масс-спектрологии свидетельствуют, что облучение тиохрома в течение небольших промежутков времени приводит к образованию оксодигидроксиохрома в качестве основного продукта (таблица 3, рисунок 7 и 8).

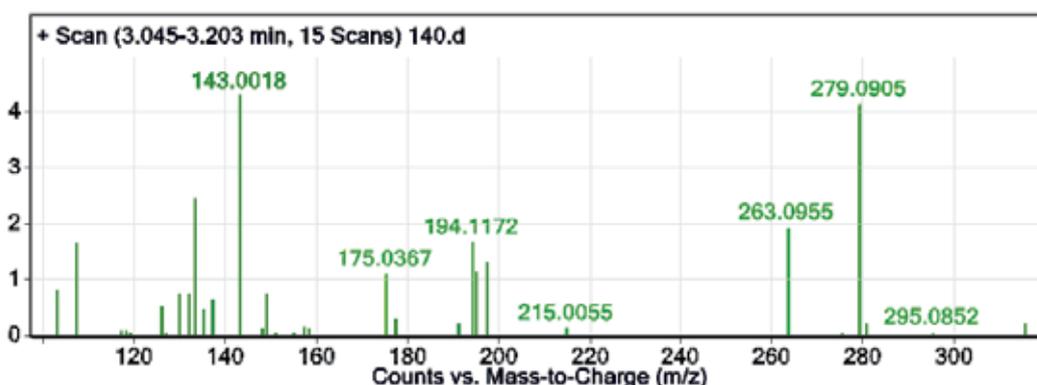
Дальнейшее облучение растворов сопровождалось снижением выхода оксодигидроксиохрома. Это свидетельствует, что оксодигидроксиохром не является конечным продуктом фотолиза тиохрома, а испытывает дальнейшее превращение (таблица 3). Среди продуктов фотолиза тиохрома обнаружены молекулярные ионы оксотиохрома  $m/z=276,0672$  (рисунок 9), а также молекулярные ионы 2,3-оксо-тиамина с  $m/z=295,0860$  (V) (рисунок 8, таблица 3).



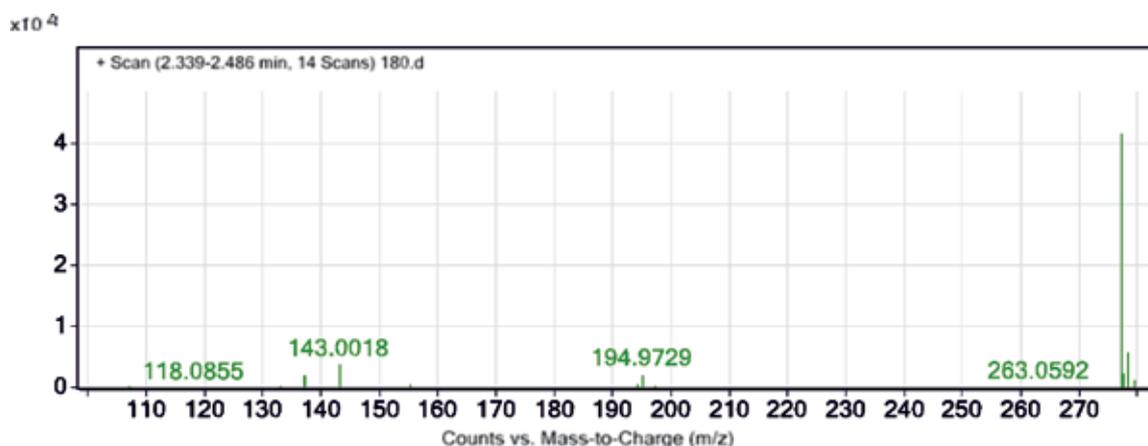
**Рисунок 6 — Изменение спектров поглощения тиохрома в зависимости от времени воздействия UVA на его водные растворы. Водные растворы тиохрома в кварцевой кювете облучали спектром излучения лампы СВД-120А. Концентрация тиохрома 30 мкМ. Значение рН растворов равно 3,0.**



**Рисунок 7 — Масс-спектр молекулярного иона тиохрома (без облучения).**



**Рисунок 8 — Масс-спектр продуктов окисления тиохрома, образовавшихся после облучения водных растворов тиохрома. Пик с  $m/z=263,0938$  принадлежит молекулярному иону тиохрома ( $[M+H]^+$ ), пик  $m/z=279,0909$  принадлежит молекулярному иону оксидигидроотиохрома ( $[M+H]^+$ ). Начальная концентрация тиохрома в растворе равна 0,05мМ. Время облучения 15 мин лампа СВД-120А, светофильтр стеклянный пропускающий излучение с длинами волн больше 300 нм.**



**Рисунок 9 — Масс-спектр продуктов окисления тиохрома, образовавшихся после облучения его водных растворов в смеси с рибофлавином. Пик с  $m/z=263,0938$  принадлежит молекулярному иону тиохрома ( $[M+H]^+$ ), пик  $m/z=277,0707$  принадлежит молекулярному иону оксотиохрома ( $[M+H]^+$ ). Начальная концентрация тиохрома в растворе равна  $0,05\text{мМ}$ . Время облучения 30 мин лампа СВД-120А, светофильтр стеклянный, пропускающий излучение с длинами волн больше 300 нм.**

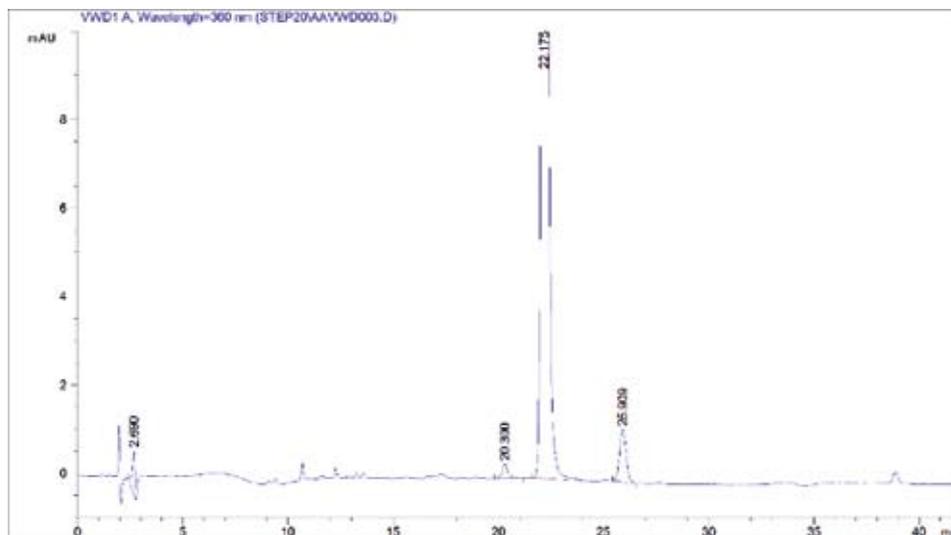
Структурные формулы этих соединений приведены в таблице 1. Как видно из представленных данных основным продуктом, в который превращается при дальнейшем облучении оксодигидротиохром, является оксотиохром (IV). Причем, образованию продуктов окисления тиохрома с  $m/z = 295,0856$  мало или отсутствует вовсе при малых концентрациях тиохрома в растворе (таблица 3).

**Таблица 3 — Окислительная трансформация тиохрома под действием ультрафиолета кварцевая кювета. Источник ультрафиолетового излучения лампа СВД-120А. Значения  $m/z$  продуктов окислительной трансформации тиохрома.**

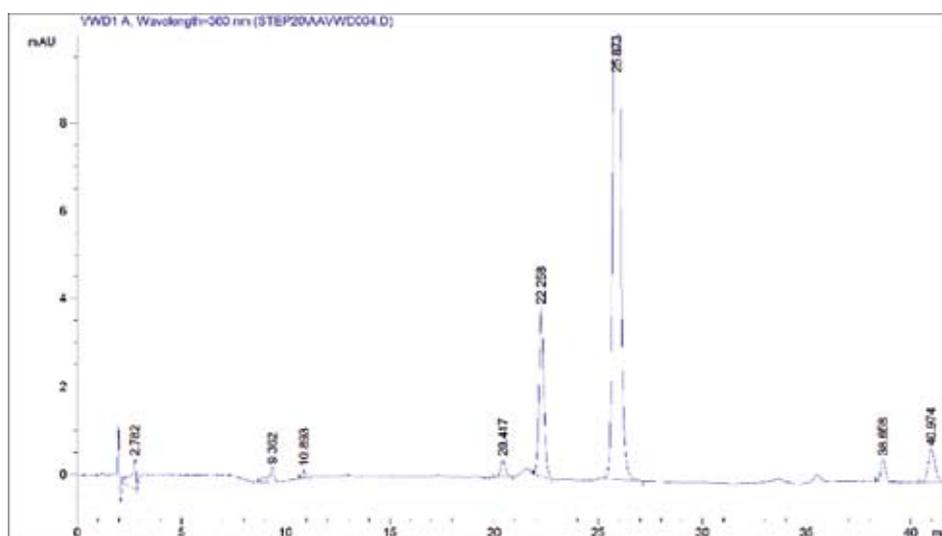
Состав раствора и время воздействия УФ	TChr $[M_0]^+$ $m/z=262,0882$ , $[M_0+H]^+$ $m/z=263,096$	ODTChr $m/z=278,812[M]^+$ $m/z=279,0885$ $[M+H]^+$	2,3-охо-Т $m/z=295,0856$	OTChr $m/z=276,0672$ $m/z=277,076$ $[M_0+H]^+$
TChr (5 мкМ)	79 910	1348	-	
TChr(5 мкМ) +УФ-15 мин	59 873	24 831		
TChr (5 мкМ) +УФ-30 мин	41 169	39 266	314	
TChr (20 мкМ)	182 111	2901	-	
TChr(20 мкМ) +УФ-15 мин	161 776	27 950		44681
TChr (20 мкМ) +УФ-30 мин	143210	35 220	820	16354
TChr (50 мкМ) +УФ-30 мин	171617	21074	3847	49 373

Данные ВЭЖХ также свидетельствуют об образовании ряда продуктов фотолиза тиохрома при воздействии ультрафиолета. На рисунке 10 и рисунке 11 приведены хроматограммы тиохрома до облучения и после воздействия ультрафиолета UVA диапазона. Длина волны, при которой проводили регистрацию продуктов фотолиза методами абсорбционной спектроскопии, была равна 360 нм. В этом случае в хроматограмме облученного водного раствора тиохрома наблюдали появление нового пика с  $Rt=25,873$  мин, который принадлежит оксодигидротиохрому. Для идентификации оксодигидротиохрома использовали химически синтезированный пре-

парат оксодигидротиохрома [22], который также имеет величину  $R_t$  равную 25,873. Как видно из спектров поглощения изомолярных концентраций тиохрома и оксодигидротиохрома, представленных на рисунке 2, при длинах волн в области 275 нм 340 нм, поглощение оксодигидротиохрома намного выше, чем поглощение тиохрома. Поэтому следует ожидать изменения соотношения интенсивности пиков для тиохрома и оксодигидротиохрома при регистрации поглощения облученного раствора тиохрома в области длин волн меньше 340 нм.



**Рисунок 10– Хроматограмма водного раствора тиохрома без облучения.  
 $R_t=22,531$  время удерживания тиохрома**

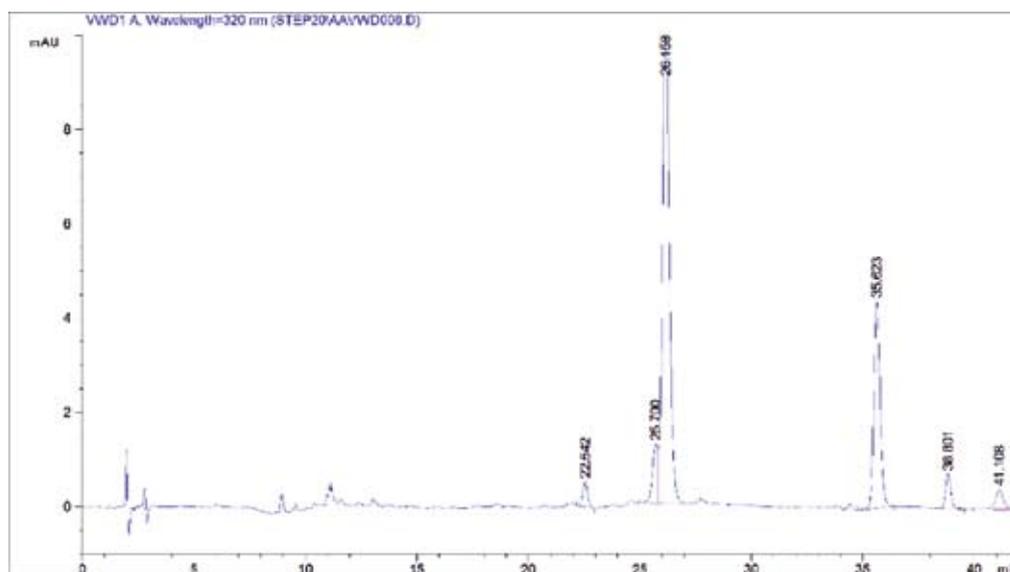


**Рисунок 11 — Хроматограмма водного раствора тиохрома после облучения светом диода LED 365 в течение 169 мин. Пик с временем удерживания принадлежит  $R_t=22,542$  принадлежит тиохрому, пик с временем удерживания  $R_t=26,158$  принадлежит оксодигидротиохрому**

Действительно, хроматограмма водного раствора тиохрома после воздействия ультрафиолета, с последующим разделением продуктов фотолиза методом ВЭЖХ и регистрацией поглощения при 320 нм, содержит интенсивный пика ODTChr с  $R_t=26,168$  мин, а интенсивность пика тиохрома с  $R_t=22,542$  сильно снижена (рисунок 12). Это вызвано тем, что коэффициент молярной экстинкции для тиохрома при длинах волн при 320 нм, примерно, на порядок меньше, нежели

для оксодигидротиохрома (сравни кривые 1 и 2 на рисунке 2). Кроме того, хроматограмм продуктов фотолиза тиохрома при регистрации поглощения на волне 320 нм содержит также интенсивный пик с  $R_t=35,623$  мин. Данные масс-спектрологии (таблица 3, рисунок 9) свидетельствуют об образовании продукта с  $m/z=276,0681$ . Значение моноизотопной массы хорошо совпадает со значением моноизотопной массы молекулярного иона с брутто-формулой.

Исходя из строения молекулярных ионов (таблица 1), спектров поглощения продукта фотолиза в области при 320 нм наиболее, вероятно, продукт фотолиза тиохрома имеет структуру (IV) с  $m/z=276,0681$ .



**Рисунок 12 — Хроматограмма водного раствора тиохрома после облучения светом диода LED 365 в течение 169 мин. Пик с временем удерживания принадлежит  $R_t=22,542$  принадлежит тиохрому, пик с временем удерживания  $R_t=26,158$  принадлежит оксидигидротиохрому, пик с временем удерживания  $35,623$  мин, вероятно, принадлежит оксотиохрому.**

Выход продуктов фотолиза тиохрома зависит от наличия растворенного в водной среде кислорода. Растворенный кислород удаляли, используя высокие концентрации сульфита, 5 мМ и выше. В анаэробных условиях окисления тиохрома не наблюдали ни под действием полного спектра лампы СВД-120. А на его водные растворы, ни под действием солнечного излучения. На рисунках 13 и 14 представлены изменения спектров поглощения и флуоресценции тиохрома в зависимости от времени воздействия полного спектра излучения лампы СВД-120А. В присутствии сульфита натрия, как видно из рисунка 13 и рисунка 14, тиохром устойчив к действию ультрафиолета в присутствии высоких концентраций сульфита.

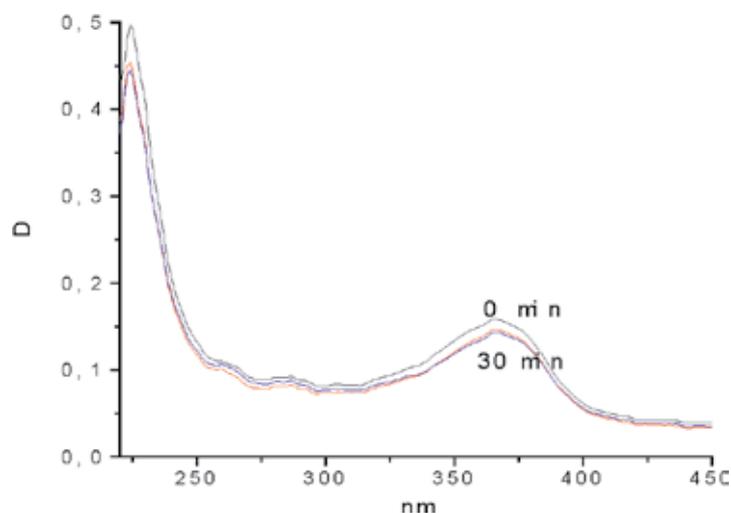
В отсутствие в растворе сульфита натрия в спектре поглощения тиохрома после облучения наблюдался коротковолновый сдвиг полосы с максимумом при 365 нм (рисунок 3 и рисунок 5) и падение интенсивности флуоресценции (рисунок 4).

Эти результаты свидетельствуют об участии кислорода в образовании продуктов фотолиза TChg. Участие кислорода в окислении TChg связано с возможным образованием активных форм кислорода — синглетного или супероксиданионов при воздействии ультрафиолета.

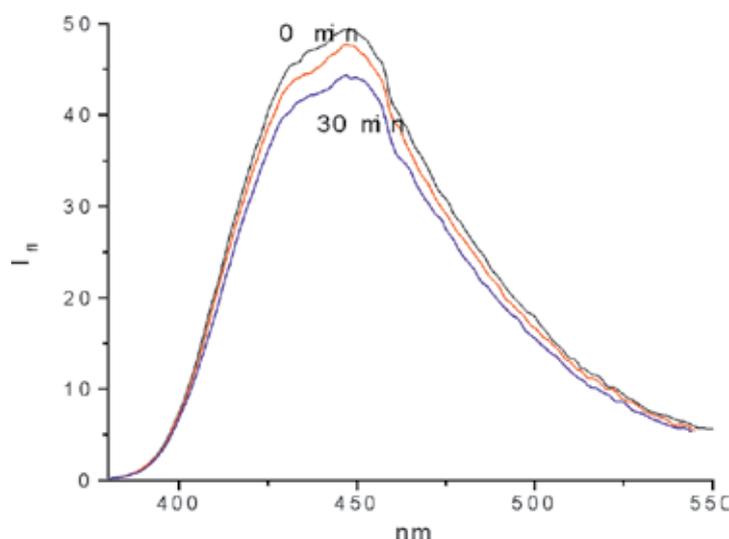
Квантовый выход генерации синглетного кислорода при воздействии ультрафиолета на молекулы тиохрома равен 0,16 [18].

После добавления азиды, (в концентрации 1мМ и выше), который является тушителем синглетного кислорода, наблюдали ингибирование выхода оксидигидротиохрома при воздей-

твии ультрафиолета на водные растворы, содержащие TChr. Эти результаты свидетельствуют, что в окислении TChr принимает участие синглетный кислород. Как известно, азид эффективно тушит синглетный кислород. Константа скорости тушения синглетного кислорода по данным литературы составляет  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .



**Рисунок 13 — Изменение спектров поглощения тиохрома в зависимости от времени воздействия UVB на его водные растворы в присутствии сульфита натрия. Водные растворы тиохрома в кварцевой кювете облучали полным спектром лампы СВД-120А в течение 15 и 30 мин. Концентрация тиохрома 20 мкМ. Концентрация сульфита натрия 5 мМ (использовать более продолжительные времена экспозиции)**



**Рисунок 14 — Изменение интенсивности флуоресценции тиохрома в зависимости от времени воздействия UVB на его водные растворы. Водные растворы тиохрома в кварцевой кювете облучали полным спектром лампы СВД-120А в течение 15 мин и 30 мин. Концентрация тиохрома 20 мкМ. Концентрация сульфита натрия 5 мМ. Длина волны возбуждения флуоресценции 360 нм**

В отсутствие в растворе азиды интенсивность флуоресценции TChr снизилась примерно в 9 раз после воздействия ультрафиолета в течение 120 мин. В присутствии азиды 1мМ интенсивность флуоресценции за тоже время облучения снизилась только на 30-35%.

**Таблица 4 — Изменение флуоресценции водных растворов TChr в зависимости от времени воздействия ультрафиолета UVA диапазона в присутствии и в отсутствие азид-да. Облучение растворов проводили в стеклянной кювете, прозрачной для длин волн  $\lambda$  больше 300 нм.**

Состав раствора и время воздействия ультрафиолета.	Уменьшение флуоресценции TChr(%)
TChr	100
TChr+ UVA (30 мин)	69,0
TChr+ UVA (60 мин)	43,0
TChr+ UVA (90 мин)	23,0
TChr+ UVA (120 мин)	11,0
TChr+N <sub>3</sub> (1мМ)	100,0
TChr+N <sub>3</sub> (1мМ) + UVA (30 мин)	89,0
TChr+N <sub>3</sub> (1мМ) + UVA (60 мин)	75,0
TChr+N <sub>3</sub> (1мМ) + UVA (90 мин)	65,0
TChr+N <sub>3</sub> (1мМ) + UVA (120 мин)	60,0

После добавление в раствор тиохрома ферри-цитохрома *c*, который является ловушкой супероксиданионов, скорость фотоокисления тиохрома уменьшалась (примерно на 10%), а количество ферри-цитохром *c* восстановленного в ферро-форму было малым.

**Заключение.** Суммируя полученные результаты, можно предположить, что окисление TChr под действием ультрафиолета UVA диапазона с образованием ODTChr в аэробных условиях, протекает в основном с участием синглетного кислорода, супероксид анионы вносят малый вклад в окисление тиохрома.

#### Список литературы

1. Березовский, В. М. Химия витаминов. — Пищепромиздат, 1973. — 620 с.
2. Миятакэ, К. Т. Ота Яп. пат. 8287 (1956), РЖХ, 1960, 58352.
3. Aneurin. Part VI. A synthesis of thiochrome and related compounds / Todd A. R. [et al.]. // J. Chem. Soc. — 1936. — P. 1601–1605.
4. A chemical determination of aneurin (vitamin B<sub>1</sub>) by the thiochrome reaction / B. C. P. Jansen [et al.]. // Rec. Travaux chimiques des Pays-Bas et de la Belgique. — 1936. — T. 55.
5. About a yellow, sulfurcontaining dye from yeast / R. Kuhn [et al.]. // J. Physiol. Chem. — 1935. — Vol. — P. 196–198.
6. An Improved Thiochrome Method for the Determination of Thiamine in Urine / V. A. Najjar [et al.]. // J. Biol. Chem. — 1944. — Vol. 152. — №. 3. — P. 579–84.
7. Barger, G., Bergel, F., Todd, A. R. A crystalline fluorescent ehydrogenation product from vitamin B<sub>1</sub> / G. Barger, F. Bergel, A. R. Todd // J. Nature. — 1935. — Vol. 136. — №. 3433. — P. 259–259.
8. Bubeshko, N. N., Stsiapura, V. I., Stepuro, I. I. Fluorescent properties of thiochrome in solvents of different polarity / N. N. Bubeshko, V. I. Stsiapura, I. I. Stepuro // J. Appl. Spectrosc. — 2011. — Vol. 78. — №. 3. — P. 337.
9. Clausen, D. F., Brown, R. E. Determination of Thiamine by Thiochrome Method Effects of Temperature and Dissolved Oxygen on Fluorescence of Quinine Standard and of Thiochrome / D. F. Clausen, R. Brown // Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition. — 1944. — Vol. 16. — №. 9. — P. 572–574.
10. Conner, R., Straub, G. Determination of thiamin by thiochrome reaction / R. Conner, G. Straub // Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition. — 1941. — Vol. 13. — №. 6. — P. 380–384.
11. Dong, M. H., Green, M. D., Sauberlich, H. E. Determination of urinary thiamin by the thiochrome method / M. H. Dong, M. D. Green, H. E. Sauberlich // J. Clin. Biochem. — 1981. — Vol. 14. — №. 1. — P. 16–18.

12. Enhanced spectrofluorimetric determination of hypochlorite based on the catalytic oxidation of thiamine to thiochrome in the presence of trace ferrocyanide / J. Zhu [et al.]. // RSC Advances. — 2014. — Vol. 4. — №. 12. — P. 5990–5994.
13. Haugen, H. N. The determination of thiamine by the thiochrome method / H. N. Haugen // J. Clin. Labor. Investig. — 1960. — Vol. 12. — №. 3. — P. 253–260.
14. 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. — 2012. — Vol. 77. — №. 1. — P. 41–55.
15. Penttinen, H. K. Differences in thiochrome fluorescence produced by thiamine and its mono-, di-, and triphosphate esters / H. K. Penttinen // Acta Chem. Scand. — 1976. — Vol. 30. — P. 659–663.
16. Peters, R. A. Vitamin B<sub>1</sub> and Blue Fluorescent Compounds / R. A. Peters // J. Nature. — 1935. — Vol. 135. — №. 3403. — P. 107.
17. Photolysis of thiochrome in aqueous solution: A kinetic study / Z. Anwar [et al.]. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. — 2020. — Vol. 203. — P. 111766.
18. Photosensitized formation of singlet oxygen by vitamins of the B group / B. M. Dzhagarov [et al.]. // J. Applied Spectrosc. — 1995. — Vol. 62. — №. 2. — P. 285–289.
19. Skurray, G. R. A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamine in foods / G. R. Skurray // J. Food Chemistry. — 1981. — Vol. 7. — №. 2. — P. 77–80.
20. Spectrofluorimetric determination of vitamin B<sub>1</sub> using horseradish peroxidase as catalyst in the presence of hydrogen peroxide / M. A. Khan [et al.]. // J. Luminescen. — 2009. — Vol. 24. — №. 2. — P. 73–78.
21. Stepuro, I. I. Thiamine and vasculopathies / I. I. Stepuro // Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. — 2005. — Vol. 72. — №. 2. — P. 115–127.
22. Structure of a thiochrome transformation product / D. A. Oparin [et al.]. // J. Chem. Natur. Comp. — 1985. — Vol. 21. — №. 5. — P. 688–689.
23. Structure of the product of photochemical oxidation of thiochrome / I. I. Stepuro [et al.]. // J. Chem. Natur. Comp. — 1989. — Vol. 25. — №. 4. — P. 503–504.
24. Thiochrome / Kuhn R. [et al.]. // Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch. — 1935. — Vol. 68. — P. 2375–2385.

## THIOCHROME OXIDATION ON EXPOSURE TO ULTRAVIOLET of UVA range

---

***Stepuro I.I.<sup>1</sup>, Ageiko S.A.<sup>1</sup>, Stsiapura V.I.<sup>2</sup>, Drobyshevskaya A.A.<sup>2</sup>, Smirnov V.Yu.<sup>3</sup>, Yantsevich A.V.<sup>4</sup>***

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds  
of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus*

<sup>2</sup>*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus*

<sup>3</sup>*Grodno State Medical University, Grodno, Belarus*

<sup>4</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus;*

***Summary.*** The formation of photolysis products of thiochrome on exposure of its aqueous solutions to ultraviolet of UVA range was studied. The products of thiochrome photolysis were identified by spectral and fluorescent methods, as well as by HPLC and mass spectroscopy. Oxodihydrothiochrome production was observed on exposure of the aqueous thiochrome solutions to ultraviolet UVA. The absorption maximum at 365 nm, that was characteristic of thiochrome, shifted to the short wave region to 340 nm, accompanied by a decrease of the thiochrome fluorescence intensity at 450 nm. Mass spectroscopy methods showed that under the action of ultraviolet oxodihydrothiochrome ( $m/z=278.0837$ ) was subsequently oxidized to form oxothiochrome ( $m/z=276.0681$ ) and small amounts of 2,3'-oxothiamine ( $m/z=294.0787$ ). In the absence of oxygen, thiochrome was not further oxidized on exposure to ultraviolet of UVA range.

## МЕТАБОЛОНИКА ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ И ИХ РОЛЬ В КЛЕТОЧНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ

*Степура И.И.<sup>1</sup>, Агейко С.А.<sup>1</sup>, Степура В.И.<sup>2</sup>, Смирнов В.Ю.<sup>3</sup>, Янецвич А.В.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Государственное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>4</sup>Государственное предприятие «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** В данной работе проведено исследование и анализ метаболитов витаминов группы В, продуктов их окислительной трансформации и деградации.

В результате проведенных исследований показано, что витамины, их метаболиты, окисленные производные витаминов и коферментов, а также фрагменты молекул витаминов имеют биохимические свойства, которые не связаны с коферментной функцией. Это антиоксидантные свойства тиамин, а также продуктов его окисления — тиохрома и оксодигидротиохрома, антиоксидантные свойства витамин В<sub>6</sub>, сигнальная функция молекул тиамин, связанная с высвобождением монооксида азота из физиологических депо организма под действием тиольной формы тиамин.

В процессе фотолиза тиамин или тиаминдифосфата под действием ультрафиолета UVB диапазона, либо под действием оксоферрильных форм гемопротеинов на водные растворы тиамин, образуются производные тиамин или производные кофермента, содержащие карбонильную группу на 2-ом углероде тиазолового компонента.

Данные карбонилсодержащие производные тиамин и тиаминдифосфата обладают свойствами антикоферментов, вызывают ингибирование тиаминзависимых процессов и участвуют в регуляции клеточного метаболизма в качестве сигнальных молекул в процессах генерации супероксидов. Показано, что тиамин ингибирует дитиозинозные сшивки в кристаллинах хрусталика глаза, вызванных синглетным кислородом, а также обсуждается возможное участие рибофлавин и окисленных форм тиамин в регуляции циркадных ритмов и зрительном процессе. Доказано спектрально-флуоресцентными методами, методами молекулярной спектроскопии, а также методами ВЭЖХ и масс-спектропии, что под действием видимого света в присутствии рибофлавин происходит окисление тиамин с образованием тиохрома и карбонилсодержащих продуктов — оксодигидротиохрома, оксотиохрома, 2,3-оксотиамина. Показано, что эти продукты трансформации тиамин устойчивы к воздействию излучения UVA диапазона, поглощают в той же спектральной области, что и кинуренин и, вероятно, могут играть роль ультрафиолетового фильтра в сетчатке и хрусталике глаза. Установлено, что модификация аминокислотной группы N-конца полипептидной β-цепи гемоглобина пиридоксаль-Р увеличивает средс-

тво к кислороду, повышая значение полунасыщения кислородом P50 для гемоглобина, и, вероятно, пиридоксаль-Р способен играть роль в регуляции насыщенности тканей организма кислородом. Показано, что выживаемость животных при гипоксической гипоксии возрастает после введения пиридоксаль-Р.

**Введение.** Более ранние биохимические исследования позволили сформулировать представление о том, что метаболизм веществ в организме определяется ферментными системами. Постулировалось, что реакции, катализируемые ферментами, протекают со 100% выходами и не сопровождаются образованием побочных продуктов. Образовавшиеся продукты вследствие протекания ферментативных реакций в физиологических условиях спонтанно не образуются. Следовательно, каждому продукту, полученному вследствие процессов метаболизма в биологических системах, соответствует свой фермент [8]. За последние 30-50 лет был достигнут очень высокий уровень развития аналитических методов в химических и биохимических исследованиях. Наиболее существенное повышение чувствительности аналитических методов было связано с внедрением высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

Основными направлениями научных исследований лаборатории молекулярной биофизика Института биохимии, 80-90 годы являлось изучение структуры и функции гемопротейнов; изучение посттрансляционной неэнзиматической модификация белков и ферментов под действием активных форм азота и кислорода при окислительном, нитрозильном и карбонильном стрессе, исследовались антиоксидантные свойства производных и метаболитов витаминов группы В. Изучалась также роль белков крови и водорастворимых витаминов в модуляции сигналов оксида азота при окислительном стрессе, а также другие некоферментные свойства витаминов группы В [25,29,11,19,22].

За это время было показано, что модификация гемоглобина карбонильными соединениями, в том числе витаминами В<sub>6</sub> изменяет сродство кислорода к гемоглобину [47]. Пиридоксаль, алифатические альдегиды, связываясь с первичными аминогруппами, уменьшают значение P50, усиливают сродство кислорода к гемоглобину.

Установлено, что модификация аминогруппы N-конца полипептидной β-цепи гемоглобина пиридоксаль-Р, напротив, повышает значение полунасыщения кислородом P<sub>50</sub> мм рт. ст. для гемоглобина, и, вероятно, повышает насыщенность тканей организма кислородом [46]. Показано, что выживаемость животных при гипоксической гипоксии возрастает после введения пиридоксаль-Р.

Показано, что ускорение кровотока после воздействия ультразвука связано с образованием оксида азота или доноров оксида азота (S-нитрозосоединений) в ультразвуковом поле [23]. Выявлена связь уровня гликозилированных аминокислот и белков при сахарном диабете с эффективностью генерации пероксинитрита, который вызывает повреждение сосудов [64].

Показано, что тройные комплексы между сывороточным альбумином человека, аминокислотами и карбонилсодержащими соединениями весьма чувствительны к модификации белковой макромолекулы активными формами азота и кислорода и являются индикатором уровня окислительного и нитрозильного стресса за промежуток времени, равный времени жизни белка. На основании полученных результатов по формированию тройных комплексов разработан высокочувствительный тест для определения связывающей способности сывороточного альбумина при сепсисе и эндогенной интоксикации с использованием тиазолидин-фосфата.

Проведенные в лаборатории молекулярной биофизики исследования, обосновывают применение новых природных антиоксидантов на основе метаболитов тиамина, способных рас-

творяться в гидрофобных компонентах клеточных мембран и проникать в гидрофобные области белков, для защиты нейронов и клеток сердечно-сосудистой системы от повреждающего действия пероксинитрита, диоксида азота и алкил-пероксидных радикалов.

**Исследования по молекулярной биофизике в Институте биохимии НАН Беларуси.** Изучение механизмов действия витаминов, исследование их участия в регуляции клеточного метаболизма, в первую очередь тиамин, в лаборатории биофизики Института биохимии начали проводиться с середины 80-х XX столетия, с момента создания лаборатории.

Исследования были сфокусированы на изучении физико-химических свойств собственно молекул витаминов (главным образом тиамин и витаминов группы В) и их свойств в составе комплексов молекул кофермента с апоферментами и механизмов протекающих реакций как специфических, катализируемых холоферментами, так и неспецифических, неферментативных, протекающих с участием молекул витаминов и коферментов в отсутствие апо-белка. Начиная с середины 80-х годов фактически на стыке биохимии, химии и физики возникло новое научное направление биофизической витаминологии. Академиком Островским Ю.М. была сформулирована гипотеза о наличии специфических функций отдельных атомов или группировок в составе молекулы тиамин. Наиболее подробно эти представления были изложены в монографии «Активные центры и группировки в молекуле тиамин» [15].

Предполагалось, что применение высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, методами ЯМР- и ЭПР-спектроскопии позволит выявить роль отдельных атомов и групп молекулы тиамин в реализации ферментативных процессов, катализируемых тиамин-зависимыми ферментами, а также выяснить механизмы и вклад в физиологические процессы иных реакций, например, определяющих реализацию антиоксидантных, сигнальных свойств метаболитов тиамин в регуляции клеточных процессов, а также в системах транспорта ионов натрия через мембрану нейронов [65,66,24,60].

Действительно, новые аналитические методы позволили регистрировать малые, практически, следовые количества для целого ряда низкомолекулярных веществ в биологических системах, а также, изучать их взаимодействие с белками (в том числе с белками крови) [62,31,50].

Исследования такого рода позволят лучше понимать физико-химические свойства молекул витаминов, в том числе и свойств, ответственных за коферментные функции. Например, разрушение молекулы витамина В<sub>1</sub> до тиазолового и пиримидинового компонентов может быть получено как в результате действия тиаминазы в активном центре фермента [58,16,37], так и в ходе фотохимической реакции (при облучении ультрафиолетом UVA диапазона) [71] или чисто химического процесса (в присутствии сульфита). Подобный химический процесс с распадом молекулы тиамин по метиленовому мостику с формированием аминопиримидинового и тиазолового компонентов протекает и при инкубации тиамин в смеси с пероксидом водорода и метмиоглобином [26].

Это свидетельствует о том, что часто условия и микроокружение витаминов в составе активного центра фермента могут быть смоделированы в более простых системах, где проще контролировать экспериментальные условия [17]. Предполагалось, что во всех этих случаях достигаются разными способами одинаковые или хотя бы конгруэнтные конформации и конгруэнтное распределение электронной плотности на атомах молекулы тиамин.

Имеющийся экспериментальный материал позволил предположить, во-первых, что витамины, их метаболиты, окисленные производные витаминов и коферментов, а также фрагменты молекул витаминов имеют собственные биохимические свойства, которые не связаны с кофер-

ментной функцией, во-вторых метаболиты тиамин и кофермента, их окисленные формы образуются не только в реакциях, катализируемых ферментами, но также образуются без участия ферментов. В настоящее время, с использованием современных аналитических приборов при одновременном использовании квантово-химических методов расчета проводится характеристика метаболитов тиамин и его окисленных форм [65].

Например, было показано, что эндогенный ацетальдегид, который присутствует в организме в крайне низких концентрациях, но все же связан с функционированием ферментов, можно регистрировать не только методами газовой хроматографии, но и флуоресцентными методами. Флуоресцентный метод измерения концентрации ацетальдегида основан на регистрации интенсивности флуоресценции аддуктов аминопиримидинового компонента тиамин с альдегидами.

Был также разработан CRDS-спектрометр для регистрации концентрации NO и S-нитрозотиолов на основе лазерной спектроскопии внутрирезонаторного затухания (cavity ringdown spectroscopy) с участием сотрудников ГрГУ им Я Купалы, что позволило надежно детектировать в модельных условиях сигнальную молекулу монооксид азота, медиатор межклеточных взаимодействий, в концентрации 0,001 мкМ [35].

Новые аналитические методы позволили выделить сигнальную молекулу монооксид азота, медиатор межклеточных взаимодействий, эндогенный этанол и эндогенный ацетальдегид, которые присутствуют в организме в крайне низких концентрациях, но все же связаны с функционированием ферментов.

Эти результаты не противоречили классическим биохимическим исследованиям, которые постулируют, что метаболизм веществ в организме определяется ферментными системами и что реакции, катализируемые ферментами, протекают со 100% выходами и не сопровождаются образованием побочных продуктов [8]. Однако новые аналитические методы позволили выделить и идентифицировать целый ряд низкомолекулярных соединений, которые образуются в организме без участия ферментов.

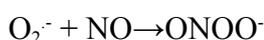
И хотя часто они образуются в ничтожных количествах, но они постоянно образуются в организме, и они не только не нужны организму, но даже наносят прямой вред организму. Эти продукты накапливаются в тех биополимерах скорость обмена которых низка, модифицируют долгоживущие биополимеры, например, белки хрусталика глаза [34,38].

Свободнорадикальные реакции с участием кислорода наиболее широко известные процессы, протекающие в организме [34,7].

Например, супероксид анионы обладают низкой реакционной способностью и являются одними из наиболее стабильных радикалов из найденных в биологических системах, исключая аскорбиловые [68,48].

Предполагается, что противоречие между низкой реакционной способностью супероксиданионов и высокой токсичностью их в биологических системах устраняется гипотезой об трансформации супероксиданионов в очень реакционные гидроксильные радикалы.

Известно, что между супероксиданионом и монооксидом азота протекает реакция взаимодействия с необычно высокой скоростью с образованием пероксинитрита. Константа скорости этой реакции равна  $6,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [43].

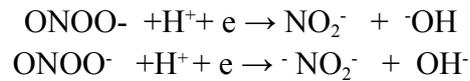


Образовавшийся пероксинитрит стабилен в щелочной среде, но при протонировании (pK=6,8) изомеризуется в нитрат в течение 1 сек. при pH=7,0 [60].

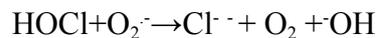


В присутствии субстратов выход нитратов уменьшается, но зато увеличивается выход гидроксильных радикалов и диоксида азота.

В растворе в зависимости от свойств доноров электронов образуются диоксид азота или гидроксильные радикалы [48].



Образование пероксинитрита в реакции между монооксидом азота и супероксиданионом фактически вызывает конверсию относительно слабо-реакционного супероксиданиона в значительно более реакционные соединения — гидроксильные радикалы и диоксид азота. Другими вероятными механизмами трансформации супероксиданионов, в гидроксильные радикалы является реакция Габера-Вайса, сопряженная с реакцией Фентона (Fe(II) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [41,13]. Реакция супероксиданионов с гипохлорной кислотой также приводит к образованию гидроксильных радикалов:



Эта реакция гипохлорной кислоты с супероксид анионом фактически является аналогом реакции Габера-Вайса, но отличается тем, что не требуются для катализа ионы металлов. Процесс протекает спонтанно с высоким значением константы скорости реакции  $7,5 \cdot 10^6$ .

Реакции модификации аминокислотных остатков белков активными формами азота и кислорода наиболее известные процессы. Тиамин и его гидрофобные метаболиты ингибирует образование дитиозина, нитротиозина и межбелковых сшивок при воздействии пероксинитрита и (или) диоксида азота на водные растворы белков [64,55,66,32,70,44,60].

Другим процессом, который принципиально отличается от процессов, описываемых классической биохимией, заключается в том, что некоторые соединения обладают таутомерией, являются полиморфными. Например, глюкоза в водном растворе при физиологических условиях в равновесии находится в основном в закрытой форме, а на линейную карбонильную форму приходится менее 0,001% [69]. Однако, даже данной концентрации альдегидной формы достаточно, чтобы спонтанно образовывались основания Шиффа с первичными аминогруппами белков ( $\epsilon$ -аминогруппы остатков лизина и  $\alpha$ -аминогруппы остатков N-конца полипептидной цепи) [72].

Эти обратимые Шиффовы основания претерпевают внутримолекулярную перегруппировку Амандори и образуют стабильные продукты неэнзиматического гликозилирования, принимающие участие в развитии возрастных проявлений при диабете, атеросклерозе [73].

В лаборатории биофизики было показано, что неэнзиматически гликозилированные аминокислоты и белки, восстанавливают метгемоглобин и феррицитохром *c* с образованием соответствующих ферро-форм протеинов [1], генерируют супероксид анионы, восстанавливают нитрит до монооксида азота [11], в атмосфере воздуха в присутствии нитрита способны образовывать пероксинитрит [64].

Полученные результаты позволили предположить, что благоприятное действие тиамина при васкулопатиях, вызванных сахарным диабетом, может быть связано с разрушением пероксинитрита молекулами тиамина и его окисленными формами — тиохромом и оксодигидротихромом.

В опытах *in vitro* высокие концентрации тиамина ингибировали протекание реакций неэнзиматического гликозилирования белков и аминокислот [64].

Важными источниками свободных радикалов в организме являются оксоферрильные формы гемопротеинов, образованные в присутствии пероксидов. Показано, что при взаимодей-

твии пероксида водорода с гемопротеинами, в том числе с цитохромом *c*, гемоглобином и миоглобином формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопротеинов, которые окисляют многие биологически важные молекулы и инициируют перекисное окисление липидов [42,36,55].

Пероксид водорода 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 пероксид водорода макрофаги, клетки эндотелия [52]. Перекисное окисление липидов сопровождается образованием органических пероксидов [7].

Следует отметить, что оксоферрильные формы гемопротеинов могут образовываться не только в реакциях с пероксидами, но и при взаимодействии с пероксинитритом [39].

Стационарная концентрация пероксида водорода в крови при нормальных условиях вследствие разрушения каталазой и глутатионпероксидазой не превышает 0,2 нМ [39].

Однако, даже под действием этой низкой концентрации пероксида водорода метгемоглобин (или гемоглобин) постоянно окисляется с образованием оксоферрильной формы гемоглобина с радикалом, локализованным на белковой глобуле. Обе оксоферрильные формы гемоглобина — соединение I и соединение II были обнаружены в крови при физиологических условиях [6969].

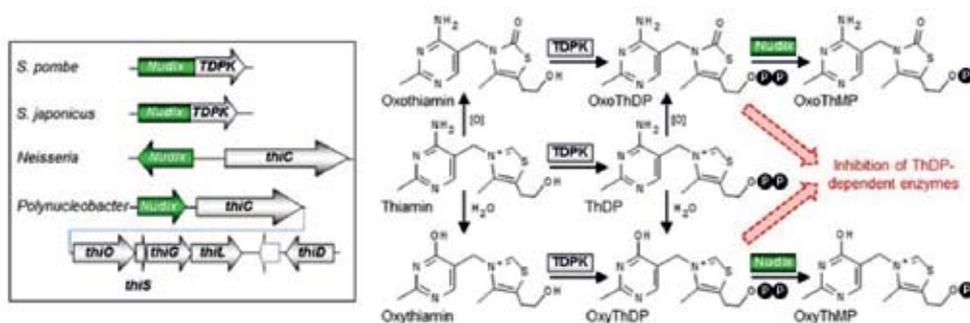
Концентрация пероксида водорода в крови и тканях сильно возрастает при патологических состояниях, например, при ишемии-реперфузии и может достигать 10 мкМ и выше в сердечной мышце при ишемии.

В лаборатории биофизики спектрально-флуоресцентными методами, а также методами ВЭЖХ и масс-спектропии показано, что после инкубации тиамин с миоглобином и пероксидом водорода в водном растворе образуются тиохром, оксодигидротиохром и тиаминдисульфид [12,55,14].

Кроме того, после инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода образуются молекулярные ионы продуктов с  $m/z=280,099$  и  $m/z=279,11$ , которые соответствуют тиамин-тиазолону и оксо-тиамину. Для этих соединений с точностью до 0,001 дальтона проведено измерение значения, что позволило определить их брутто-формулы [55,14].

Следовательно, в процессе пероксидазной реакции, катализируемой миоглобином в присутствии пероксида водорода, образуются окисленные производные тиамин содержащие в своем составе карбонильные группы. Структурные формулы этих соединений приведены в таблице 3.

Мы предполагаем, что фосфорилированные карбонильные продукты окисления тиамин, образованные в процессе протекания пероксидазной реакции, в особенности тиазолон-тиамин — аналог тиамин, содержащий карбонильную группу на 2-ом углероде тиазолового компонента, могут вызывать конкурентное ингибирование важнейших тиамин-зависимых ферментов энергетического метаболизма, что приводит к нарушению их физиологически-нормального функционирования. Ранее показано, что тиамин-тиазолон-пирофосфат (или 2-охо-ТРП) является аналогом промежуточного переходного состояния активного центра пируватдегидрогеназы [53,40]. Серусодержащее кольцо этого аналога не несет заряда и, следовательно, он очень сходен с промежуточным состоянием нормального кофермента в реакциях, катализируемых тиамин. Это структурное соответствие тиамин тиазолон дифосфата вызывает сильное конкурентное ингибирование тиаминзависимых ферментов. Например, показано, что тиазолон-тиамин-дифосфат — связывается с пируватдегидрогеназой примерно в 20 000 раз сильнее, чем ТРП и конкурентно ингибирует данный фермент [53,40].



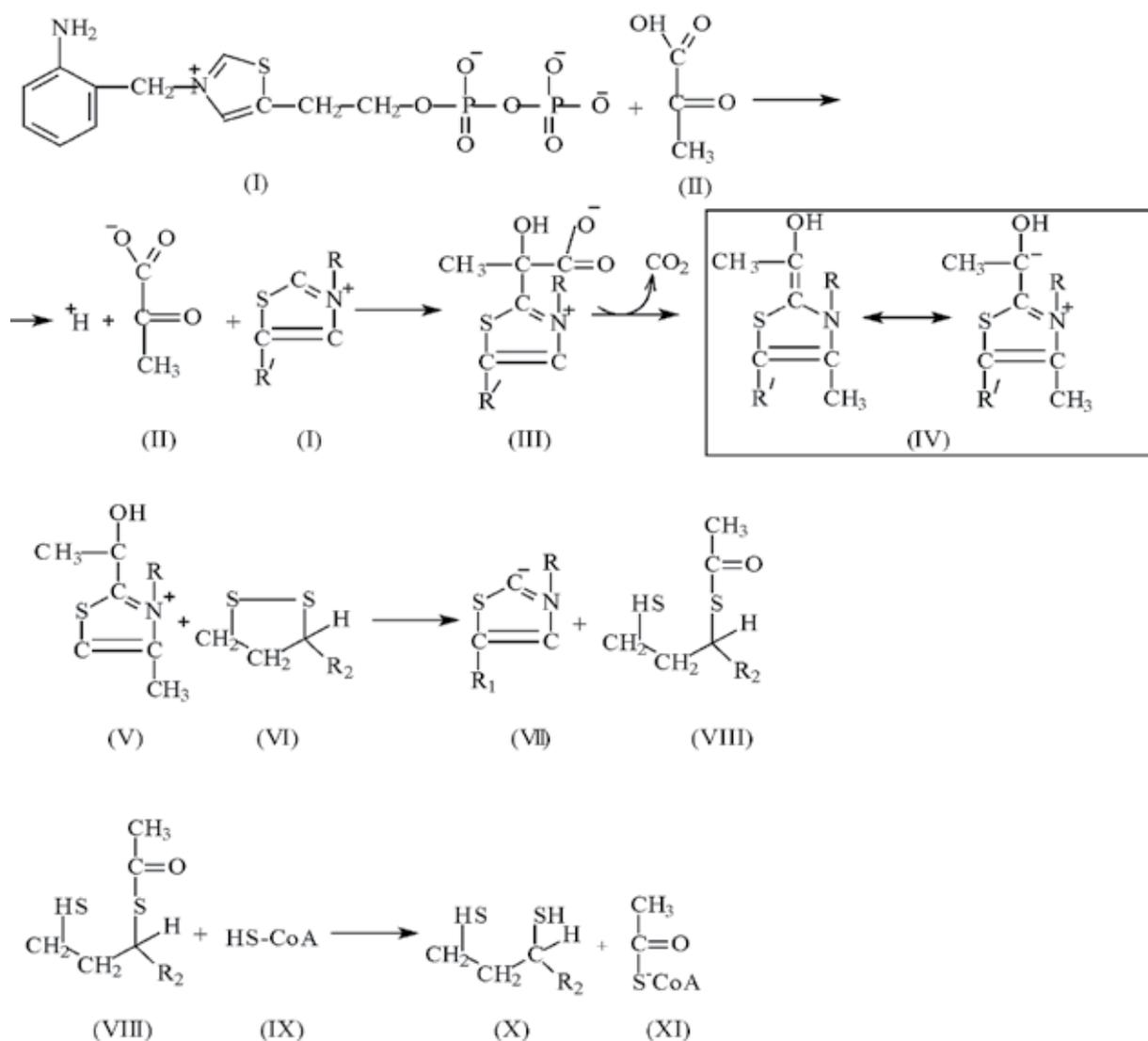
**Рисунок 1 — Реакции повреждения, которые переводят тиамин или тиаминдифосфат (ThDP) в оксо- и окси-производные, и дифосфорилирование тиамина, оксотиамина и окситиамина тиамин-дифосфат киназой (TDPK). Прямоугольником указано слияние гена Nudix в TDPK из *Schizosaccharomyces*, и расположение гена Nudix и генов белков, регулирующих метаболизм тиамина, (thi) в хромосоме бактерий. Оксо- и окси-производные TDP ингибируют TDP-зависимые энзимы, но Nudix энзим предотвращает это, преобразуя их в неингибирующие монофосфаты [53,40].**

Важнейшим источником супероксиданионов в организме (а, следовательно, и пероксида водорода) является метаболизм ряда ксенобиотиков, а также лейкоциты, которые для создания бактерицидного действия, для деградации интернализированных бактерий или других патогенов используют «респираторный взрыв», который сопровождается повышением потребления кислорода за счет возрастания активности NADPH-оксидазы. NADPH является ключевым субстратом NADPH-оксидазы. Образование NADPH происходит через петозофосфатный шунт с участием тиаминзависимого фермента-транскетолазы [52]. Повышение содержания пероксида в крови вызовет образование высокоокисленных форм гемоглобина в крови и, как следствие, образование не только тиохрома и оксидигидроксиохрома [55], но и тиазолонтиамин [14,57,5] и его фосфорилированной формы, которая является ингибитором пируватдегидрогеназы [53].

Так как структура активного центра тиаминзависимых ферментов сходна [16,52], то следует ожидать также ингибирования транскетолазы ключевого фермента ПФШ. Все реакции, катализируемые тиаминдифосфатом, протекают по единому механизму, связанному с расщеплением и образованием связанного с тиаминем активного альдегида [52]. Атом углерода, находящийся между атомами азота и серы тиазолового кольца, легко ионизируется и присоединяется к карбонильной группе пирувата. Положительно заряженный азот в кольце принимает на себя электроны и вызывает декарбоксилирование пирувата, связанного со вторым углеродом тиазолового компонента, что приводит к образованию гидроксиэтил — TPP (рисунок 2, формула (III)). Гидроксиэтил — TPP в ионизованной форме находится в равновесии с резонансной формой (IV), которая не несет заряда. Тиаминтиазолонпирофосфат (или 2-охо-TPP), как уже указывалось ранее, является аналогом промежуточного переходного состояния активного центра тиаминзависимых ферментов и является сильным ингибитором (рисунок 1).

Суммируя полученные результаты можно заключить, что метмиоглобин, метмиоглобин в присутствии пероксида водорода катализируют окисление тиамин с образованием тиохрома, оксидигидроксиохрома, а также тиазолонтиамин, который может затем фосфорилироваться тиаминкиназой с образованием тиазолон-дифосфата.

Мы предполагаем, что тиазолон-тиаминдифосфат выступает сигнальной молекулой и может регулировать бактерицидное действие лейкоцитов, оказывать тормозящее действие на «респираторный взрыв» вследствие ингибирования активности транскетолазы, а, следовательно, ингибирования генерации NADPH.



**Рисунок 2** — Схема декарбонирования пирувата в пируватдегидрогеназной реакции с участием тиаминдифосфата (ТРР), (I) — карбанион-ТРР, (II) — пируват, (III) — промежуточный продукт, (IV) — резонансные формы гидроксиэтил-ТРР, (V) — гидроксиэтил-ТРР, (VI) — липоамид, (VII) — карбанион -ТРР, (VIII) — ацетиллипоамид, (IX) — CoA, (X) — дигидролипоамид, (XI) — ацетил-CoA [16,52].

В лаборатории биофизики исследовались воздействие неблагоприятных физико-химических факторов внешней среды: ультрафиолета, ультразвука, ионизирующего излучения. В качестве маркеров свободно-радикальных реакций, протекающих при окислительном стрессе, а также при воздействии физико-химических факторов использовали продукты окислительной трансформации тиамин [64,55,20].

Как известно, воздействие солнечного излучения, а также ионизирующее излучение вызывают образование в живых организмах активных форм азота и кислорода.

Ионизирующее и ультрафиолетовое излучение вызывает повреждение или гибель клеток вследствие, как прямого воздействия на структуру ДНК и структуру белков, так и генерации активных форм кислорода и активных карбонильных соединений [33,34].

Тиамин в водных растворах претерпевает фотолиз под действием электромагнитного излучения с длинами волн короче 300 нм и устойчив к действию ультрафиолета области UVA и видимого света. Показано, что после воздействия ультрафиолета UVB диапазона на водные

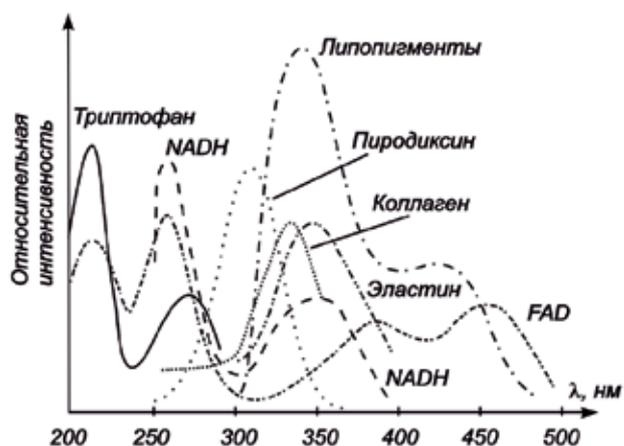
растворы тиамин в нейтральной и кислой средах основными продуктами фотолиза является 2-метил-4-амино-5-аминометил-пиримидин ( $m/z=138,090$ ) и тиазолон тиамин ( $m/z=280,09$ ), содержащий карбонильную группу на углероде C2, а также фрагменты тиазолового компонента молекулы тиамин. Для изучения структуры молекул образовавшихся вследствие фотолиза тиамин и его производных, а также для идентификации продуктов фотолиза тиамин применялись спектрально-флуоресцентные методы, методы ВЭЖХ и масс-спектропии и молекулярной спектроскопии [4].

Кожа и органы зрения человека в наибольшей степени подвержены воздействию солнечного ультрафиолетового излучения. Наиболее злокачественные заболевания этих органов, такие как рак и катаракта, развиваются примерно у половины населения земного шара, перешагнувшего рубеж 65 лет [67,74].

Ткани кожи и органов зрения обладают различным белковым составом, однако большая часть белков содержит аминокислоту триптофан, который является основным хромофором белковых молекул в UVB диапазоне.

Учитывая высокое внутриклеточное содержание белков и высокие значения коэффициентов молярной экстинкции для остатков триптофана и тирозина можно считать, что они полностью поглощают электромагнитное излучение UVB диапазона и поэтому поглощение тиамином ультрафиолета с длинами волн короче 300 нм в живых организмах невозможно.

Однако, в организме присутствует целый ряд хромофоров и простетических групп, входящих в состав ферментов и белков, способных генерировать синглетный кислород под действием видимого света (рисунок 3). Это рибофлавин, витаминеры B<sub>6</sub>, белки, содержащие ковалентно связанные фосфопиридоксильные остатки с первичными аминогруппами (аминогруппами остатков лизина, α-аминогруппами N-конца полипептидной цепи белковой макромолекулы) [27], конечные продукты неэнзиматического гликозилирования белков [54]. Как известно, собственно белки, не содержащие простетические группы (рибофлавин, NADH, витаминеры B<sub>6</sub>) поглощают в области 200-300 нм [52].



**Рисунок 3 — Спектры поглощения важнейших флуоресцирующих пигментов организма, способных генерировать синглетный кислород.**

Показано, что лейко-форма рибофлавина, образовавшаяся под действием видимого света на окисленный рибофлавин в присутствии доноров электронов, восстанавливает низкомолекулярные S-нитрозотиолы (S-нитрозоглутатион и S-нитрозоцистеин), а также S-нитрозотиолы цистеиновых остатков белков до соответствующих тиолов и этот процесс сопровождается высвобождением монооксида азота. Предполагается, что рибофлавин и интенсивный видимый

свет будут вызывать высвобождение монооксида азота, а также релаксацию сосудов и усиление кровотока в кровеносной системе глаза.

Установлено, что при воздействии видимого излучения ( $\lambda > 400$  нм) на рибофлавин генерируется синглетный кислород, который окисляет трициклическую форму тиамин с образованием тиохрома ( $m/z=262,0882$ ) и оксодигидротиохрома ( $m/z=278,0896$ ) [28].

Полученные результаты позволяют предположить, что совместное применение тиамин, рибофлавина при одновременном воздействии интенсивного видимого света вызовет усиления кровотока и ускорения заживления ран вследствие высвобождения монооксида азота [21,10].

Эти данные будут использованы для создания новой медицинской физиотерапевтической технологии ускорения локального кровотока при комплексном использовании видимого света и витаминов  $B_2$  и  $B_1$ .

После воздействия ультрафиолета UVB диапазона, ионизирующего излучения на водные растворы тиамин образуется тиамин-тиазолон, который является структурным аналогом промежуточного переходного состояния молекулы кофермента в реакциях, катализируемых тиаминзависимыми ферментами [57,5,3].

Как указывалось ранее, у поглощения тиамин ультрафиолета с длин волн короче 300 нм в живых организмах невозможно, вследствие высокого содержания белков в клетках кожи, поглощающих в той же области спектра.

Однако при воздействии рентгеновского, гамма-излучения на живой организм в тканях органов, внутри клеток происходит радиолиз воды образуются пероксиды белков, происходит ионизация аминокислотных остатков белков [6].

Ионизирующее излучение создает в тканях в процессе диссипации энергии процессы, сопровождающиеся образованием возбужденных состояний тиамин, аналогичных образовавшихся при воздействии на его водные растворы ультрафиолета UVB. В процессе фотолиза тиамин, вызванных действием ионизирующей радиации образуется производное тиамин — тиамин-тиазолон. После фосфорилирования тиазолона тиамин образуется аналог тиамин-дифосфата с карбонильной группой в 2-положении тиазолового цикла или 2-оксо-тиаминдифосфат, который является структурным аналогом промежуточного переходного состоянием нормального кофермента в реакциях, катализируемых тиамин. Образовавшиеся карбонильные производные тиаминдифосфата, а именно, тиазолонтиамин-дифосфаты, являются антикоферментами и, вызывают ингибирование тиаминзависимых ферментов. [40,53]

Поэтому образовавшийся в тканях организма под действием ионизирующей радиации тиазолон-Р выступает как повреждающий фактор, избирательно ингибируя активность тиаминзависимых ферментов.

Действительно, в крови ликвидаторов, устранявших последствия аварии на Чернобыльской АЭС содержались окисленные формы ТРР, и их уровень возрастал с увеличением полученной дозы ионизирующего излучения [29].

Ингибирование активности тиаминзависимых ферментов тиаминтиазолон-РР может быть причиной повреждения мышечной ткани сердца. Поэтому предполагается весьма важным провести дальнейшие исследования не только в модельных опытах *in vitro*, но и в опытах на животных, в результате которых будут идентифицированы основные продукты окисления и метаболиты тиамин в тканях организма после воздействия ионизирующего излучения.

Ожидается, что в результате проведенных исследований удастся проанализировать и сопоставить строение и выход продуктов окисления тиамин с конкретными типами активных

форм азота или кислорода вызвавшими их образование. Предполагается, что совместное определение тиамин и его метаболитов и их концентраций будет иметь важное диагностическое значение заболеваний, вызванных окислительным стрессом. Образовавшиеся продукты окисления тиамин будут служить маркером свободно-радикальных процессов, определять тип протекающих свободно –радикальных реакций. Уже известно, что феноксильные свободные радикалы окисляют тиамин только до тиохрома. Диоксид азота окисляет тиамин с образованием оксодигидротиохрома, гидроксильные радикалы окисляют тиамин с образованием оксодигидротиохрома и дикарбонильного соединения 2,3-оксотиамина. Гипохлорная кислота окисляет тиамин с образованием тиаминовой кислоты. Полученные результаты позволяют по-новому оценить гипотезу Островского Ю.М. о наличии специфических функций отдельных атомов или группировок в составе молекулы тиамин. Эти активные центры и группировки в реакциях с активными формами азота и кислорода дают начало независимым процессам окисления, которые образуют целый ряд производных и метаболитов тиамин, служащих маркерами типов свободных радикалов, участвующих в реакциях. Это связано с тем, что фактически тиамин присутствует в организме при физиологических условиях в виде равновесной смеси трех форм тиольной, трициклической, и формы тиамин с закрытым тиазоловым циклом, которые при взаимодействии с свободными радикалами, активными формами азота и кислорода, дают свои характерные продукты окисления.

## **2. Примеры некоферментных свойств витаминов группы В, а также их метаболитов, продуктов их окислительной трансформации:**

1. Установлено, что кристаллины, которые являются основными белками хрусталика глаза, под действием синглетного кислорода, а также при прямом воздействии ультрафиолета UVB диапазона, образуют феноксильные и триптофанильные пероксидные радикалы, которые окисляют тиамин с образованием тиохрома. Показано, что тиамин выступает в качестве ловушки синглетного кислорода, восстанавливает свободные радикалы, центрированные на атомах углерода тирозина или тирозильных остатков белка, и ингибирует образование дитирозиновых сшивок в водных растворах кристаллинов или водных растворов тирозина.

2. Показано, что лейко-форма рибофлавин, образовавшаяся под действием видимого света, на окисленный рибофлавин в присутствии доноров электронов, восстанавливает низкомолекулярные S-нитрозотиолы (S-нитрозоглутатион и S-нитрозоцистеин), а также S-нитрозотиолы цистеиновых остатков белков до соответствующих тиолов и этот процесс сопровождается высвобождением оксида азота. Предполагается, что рибофлавин и интенсивный видимый свет будут вызывать высвобождение оксида азота, а также релаксацию сосудов и усиление кровотока в кровеносной системе глаза.

3. Установлено, что под действием тиольной формы тиамин происходит высвобождение монооксида азота из состава S-нитрозоглутатиона в процессе инкубации тиамин с S-нитрозоглутатионом. Между S-нитрозоглутатионом и тиольной формой тиамин протекает реакция транснаитрозилирования с образованием в качестве промежуточного соединения тиолнитрозильной формы тиамин TSNO, которая распадается с образованием монооксида азота и дисульфида тиамин.

4. Окисленные производные тиамин — тиохром и оксодигидротиохром — растворимы в гидрофобных растворителях и окисляются протонированным пероксинитритом с образованием 2,3-оксотиамина. Предполагается, что тиохром и оксодигидротиохром могут разрушать пероксинитрит в липидной фракции клеточных мембранах и выполнять функции антиоксидантов.

5. Установлено, что при воздействии видимого излучения ( $\lambda > 400$  нм) на рибофлавин генерируется синглетный кислород, который окисляет трициклическую форму тиамин с образованием тиохрома ( $m/z=262,0882$ ) и оксодигидротиохрома ( $m/z=278,0896$ ). При воздействии ультрафиолета UVA диапазона (область длин волн  $\lambda=315-400$  нм) на водные растворы витаминов В<sub>6</sub> (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксаль-Р) в присутствии тиамин происходит также образование тиохрома и оксодигидротиохрома. Основания Шиффа, образованные пиридоксальем и пиридоксаль-Р с аминокислотами, не генерируют синглетный кислород под действием видимого света или ультрафиолета UVA диапазона и не окисляют тиамин.

6. После воздействия ультрафиолета UVB диапазона, ионизирующего излучения на водные растворы тиамин образуется продукты трансформации и деградаци тиамин-тиазолон, который является структурным аналогом промежуточного переходного состояния молекулы кофермента в реакциях, катализируемых тиамин-зависимыми ферментами.

Это структурное соответствие позволяет фосфорилированным карбонильным производным тиамин связываться с высоким сродством в 10 000-20 000 раз превышающим равновесные константы связывания собственно тиаминдифосфата и эффективно ингибировать активность тиаминзависимых ферментов [40,53]. В то время как негативный эффект снижения уровня тиамин в тканях может легко корректироваться приемом лишь повышенных концентраций тиамин, влияние ингибиторов, которые являются структурными аналогами переходного состояния нормального кофермента, скорректировать значительно труднее. Мы предполагаем, что полученные нами результаты будут способствовать проведению дальнейших исследований для обоснования применение высоких доз тиамин и тиаминдифосфата для лиц, подвергающихся хроническому облучению от радиоактивных веществ, попадающих внутрь организма с продуктами питания, водой при воздействии ультрафиолета, ионизирующего излучения от внешних источников.

7. Показано, что под действием ультрафиолета (UVB-диапазон,  $\lambda$  280-315 нм) на водные растворы тиамин в нейтральной и кислой средах основными продуктами фотолиза является 2-метил-4-амино-5-аминометил-пиримидин ( $m/z=138,090$ , максимумы поглощения в абсорбционном спектре 233 нм и 272 нм), тиазолон тиамин ( $m/z=280,09$ ), содержащий карбонильную группу на втором углероде, а также фрагменты тиазолового компонента молекулы тиамин. После воздействия ультрафиолета UVB диапазона на тиольную форму тиамин или водные растворы дисульфидов тиамин симметричных и асимметричных образуется в качестве основного фотопродукта формилпиримидин ( $m/z=167,0929$ ).

8. Показано, что метмиоглобин, метгемоглобин в присутствии пероксида водорода катализируют окисление тиамин с образованием тиохрома, оксодигидротиохрома, а также тиазолон-тиамин, который может затем фосфорилироваться тиаминфосфокиназой с образованием тиамин-тиазолондифосфата, который является структурным аналогом промежуточного переходного состояния молекулы кофермента в реакциях, катализируемых тиамин-зависимыми ферментами.

Важнейшим источником супероксиданионов в организме (а, следовательно, и пероксида водорода) является метаболизм ряда ксенобиотиков, а также лейкоциты, которые для создания бактерицидного действия, для деградаци интернализированных бактерий или других патогенов используют «респираторный взрыв», который сопровождается повышением потребления кислорода за счет возрастания активности NADPH-оксидазы. NADPH является ключевым субстратом NADPH-оксидазы. Образование NADPH происходит через пентозофосфатный шунт с участием тиаминзависимого фермента-транскетолазы [52]. Предполагается, что повышение

содержания пероксидов в крови вызовет образование высокоокисленных форм гемоглобина в крови и как следствие образование не только тиохрома и оксодигидротиохрома [55], но и тиазолон-тиамина [14,57].

Мы предполагаем, что тиазолон-тиаминдифосфат в данной ситуации выступает сигнальной молекулой и может регулировать бактерицидное действие лейкоцитов, оказывать тормозящее действие на «респираторный взрыв» вследствие ингибирования образования NADPH.

9. При воздействии видимого света на водные растворы тиамина в присутствии рибофлавина образуются такие продукты трансформации тиамина как тиохром ( $m/z=262,0882$ ) оксодигидротиохром ( $m/z=278,0839$ ), оксотиохром ( $m/z=276,0672$ ), 2,3-оксотиамин ( $m/z=295,0856$ ). Показано, что эти продукты трансформации тиамина устойчивы к воздействию излучения UVA диапазона и обладают низким квантовым выходом флуоресценции, поглощают в той же области, что и кинуренин и вероятно, могут играть роль ультрафиолетового фильтра в сетчатке и хрусталике глаза.

10. Показано с помощью спектрально-флуоресцентных методов, а также методов ВЭЖХ и масс-спектропии, что после инкубации тиамина с гемопротейнами и пероксидазами (метмиоглобин и цитохром *c* из сердца лошади, гемоглобин человека, лактопероксидаза коровьего молока и пероксидаза хрена, пероксидаза редиса, пероксидаза имбиря, пероксидаза чеснока) в присутствии пероксида водорода образуется тиохром ( $m/z=262,0882$ ), тиаминдисульфид, оксодигидротиохром ( $m/z=278,0839$ ), а также небольшие количества тиаминтиазолон. Кроме того, тиамин после инкубации с пероксидазами растений в присутствии пероксида водорода, расщепляется по углероду метиленового мостика с образованием аминопиримидинового компонента и тиазолового компонента тиамина в виде отдельных молекул. (2-метил-4-амино-5-метилпиримидин и 4-метил-5-β-гидроксиэтил-тиазол. соответственно).

11. Проведенные исследования позволяют предположить, что витамины группы В участвуют в регуляции и синхронизации циркадных ритмов организма. Показано в модельных условиях, что тиамин ингибирует разрушение мелатонина, которое происходит под действием ультрафиолета UVA-диапазона. Свободные радикалы мелатонина окисляют тиамин с образованием тиохрома и дисульфида тиамина, а сами восстанавливаются до молекул мелатонина.

При воздействии видимого света на водные растворы мелатонина в присутствии рибофлавина усиливалось разрушение мелатонина, как под действием синглетного кислорода, так и под действием триплетных уровней фотосенсибилизатора. Определены продукты окислительной трансформации тиамина методами масс-спектропии, молекулярной и абсорбционной спектроскопии. Высказано предположение, что интенсивный видимый свет области 380-410 нм и видимый свет области длин волн 440-480 нм, воздействуя на мишени, локализованные в белках роговицы, в белках стенок кровеносных сосудов глаза (тиохром дифосфат, рибофлавин), кроме подавления секреции мелатонина, генерируют синглетный кислород, который разрушает мелатонин с образованием предположительно 2-гидроксимелатонина и 2,3-гидроксимелатонина.

## **Приложение**

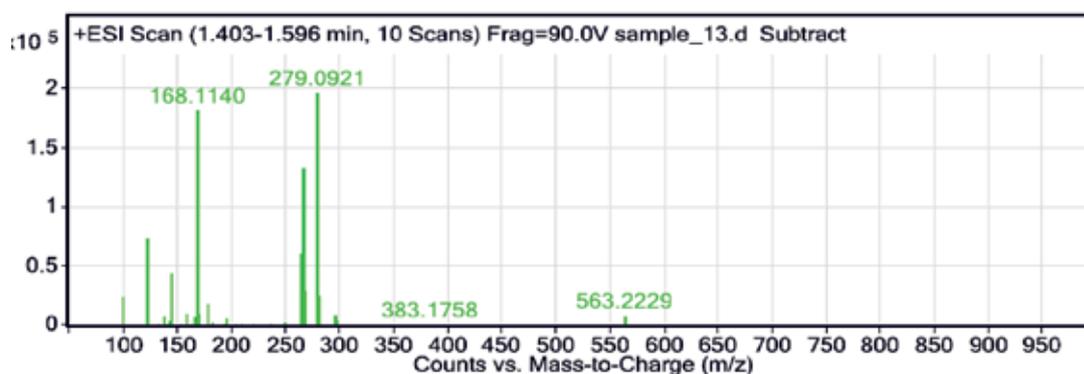
**4. Метаболиты тиамина как возможные маркеры свободно-радикальных реакций, протекающих при окислительном стрессе, а также при воздействии физико-химических факторов внешней среды.**

**4.1. Продукты окисления тиамина, образовавшиеся после инкубации с метмиоглобином в присутствии пероксида водорода.**

После инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода масс-спектр растворов содержит кроме молекулярного иона тиамин ( $m/z=265,11$ ) также молекулярные ионы тioxрома ( $m/z=262,088$ ), оксодигидротioxрома ( $m/z=278,086$ ) и тиаминдисульфида ( $m/z=562,216$ ).

Кроме того, после инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода образуются молекулярные ионы продуктов с  $m/z=280,099$  и  $m/z=279,11$ , которые предположительно соответствуют тиамин-тиазолону и оксотиамину. Для этих соединений с точностью до 0,001 дальтона проведено измерение значения, что позволило определить их брутто-формулы. Структурные формулы данных соединений приведены в таблице 1. Строение продуктов окисления тиамин оксоферрильными формами миоглобина доказано методами ВЭЖХ и абсорбционной и масс-спектроскопии.

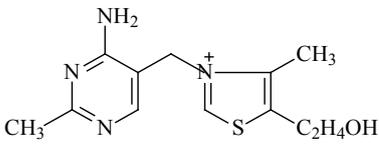
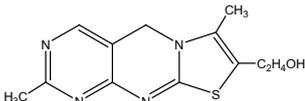
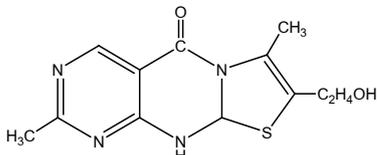
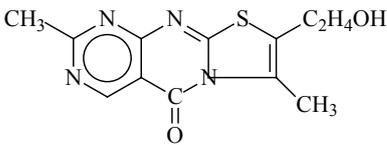
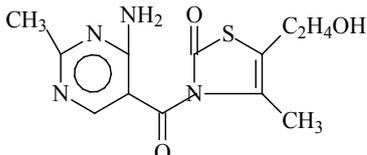
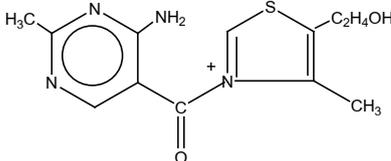
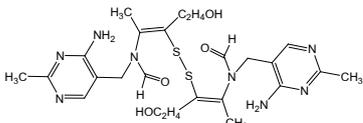
Масс-спектр после инкубации растворов, содержащих метмиоглобин тиамин, пероксид водорода, представлен на рисунке 4. Кроме указанных пиков молекулярных ионов масс-спектр содержит пики продуктов распада тиамин по метиленовому мостику — 2-метил-4-амино-5-гидроксиметилпиримидин ( $m/z=139,09$ ) и 4-метил-5- $\beta$ -оксиэтилтиазол ( $m/z=143,00$ ). Причем 2-метил-4-амино-5-гидроксиметилпиримидин ( $m/z=139,09$ ) образуется только после инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода. В данном случае происходит расщепление молекулы тиамин по метиленовому мостику и к атому углерода метиленового мостика присоединяется гидроксил.

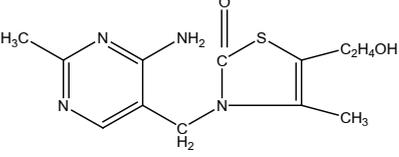
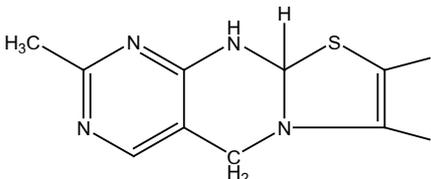
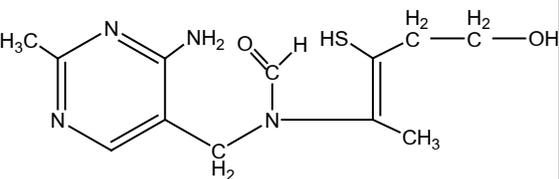
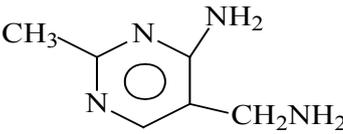
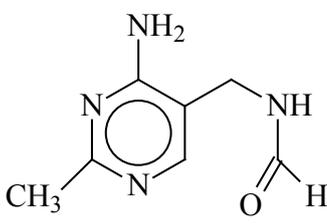


m/z	z	Abund	Название молекулярного иона
122,0718		74085,23	*AP <sup>+</sup>
144,0484		44762,43	TZ (M+ H) <sup>+</sup>
167,0935		44762,43	TZ(M+Na) <sup>+</sup>
168,114	1	182083,64	TZ(M+Na) <sup>+</sup>
262,0972	1	60807,13	Тioxром (M) <sup>+</sup>
265,1128	1	133506,58	Тиамин(M+H) <sup>+</sup>
265,1296		40562,3	Тиамин(M+H) <sup>+</sup>
267,1461		29782,29	Тиамин(M+2H) <sup>+</sup>
279,0921	1	197000,39	Оксодигидротioxром(M+ H) <sup>+</sup>
280,0951	1	25458,57	Тиамин тiazолон (M) <sup>+</sup>
563,2229		7450	Тиамин дисульфид(M+H) <sup>+</sup>

**Рисунок 4 — Масс-спектр продуктов окисления тиамин, полученный после инкубации растворов, содержащих смесь метмиоглобина, тиамин и пероксида водорода. Концентрация метмиоглобина 10 мкМ, концентрация тиамин 5,0 мМ, концентрация пероксида водорода (1,0 мМ).**

**Таблица 1 — Структурные формулы тиамин, продуктов окислительной трансформации тиамин и величины m/z их молекулярных ионов.**

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	m/z молекулярных ионов, относительная интенсивность
<p>Тиамин (Т)</p> <p>Массы изотопологов:  <math>M_0=265,1123</math> (81,8 %)  <math>M_1=266,1149</math> (12,7 %)  <math>M_2=267,1102</math> (4,7 %)</p>	 <p>(I)  <math>C_{12}H_{17}N_4OS</math></p>	<p>265,1115 <math>[M_0]^+</math> (100%)                  266,1143 <math>[M_1]^+</math> (13%)                  267,1086 <math>[M_2]^+</math> (3%)</p>
<p>Тиохром (TChr)</p> <p>Массы:  <math>M_0=262,0888</math> (81,9 %)  <math>M_1=263,0914</math> (12,6 %)  <math>M_2=264,0867</math> (4,7 %)</p>	 <p>(II)  <math>C_{12}H_{14}N_4OS</math></p>	<p>263,096 <math>[M_0+H]^+</math> (100%)                  264,097 <math>[M_1+H]^+</math> (15%)</p>
<p>Оксодигидроотиохром (ODTChr)</p> <p>Массы:  <math>M_0=278,0837</math> (81,7 %)  <math>M_1=279,0863</math> (12,6 %)  <math>M_2=280,0819</math> (4,9 %)</p>	 <p>(III)  <math>C_{12}H_{14}N_4O_2S</math></p>	<p>279,091 <math>[M_0+H]^+</math> (100%)                  280,094 <math>[M_1+H]^+</math> (14%)</p>
<p>Оксотиохром (охо-TChr)</p> <p>Массы:  <math>M_0=</math> (81,7 %) 276,0681  <math>M_1=277,0707</math> (12,6 %)  <math>M_2=278,0662</math> (4,9 %)</p>	 <p>(IV)</p>	<p>277,076 <math>[M_0+H]^+</math>                  278,0777 <math>[M_1+H]^+</math></p>
<p>2,3-оксотиамин (2,3-охо-Т)</p> <p>Массы:  <math>M_0=</math> (81,54 %) 294,0787  <math>M_1=</math> (12,64 %) 295,0813  <math>M_2=</math> (5,06 %) 296,077</p>	 <p>(V)</p>	<p>295,0856 <math>[M_0+H]^+</math> (100%)</p>
<p>3-оксотиамин (3-оксо-Т)</p>	 <p>(VI)</p>	<p>m/z=279,1084 <math>[M]^+</math></p>
<p>Тиаминдисульфид (TSST)</p> <p>Массы:  <math>M_0=562,2144</math> (66,8 %)  <math>M_1=563,2170</math> (20,7 %)  <math>M_2=564,2137</math> (9,6 %)</p>	 <p>(VII)  <math>C_{24}H_{34}N_8O_4S_2</math></p>	<p>563,219 <math>[M_0+H]^+</math> (100%)                  564,2226 <math>[M_1+H]^+</math> (23%)</p>

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	m/z молекулярных ионов, относительная интенсивность
Тиамин-тиазолон M <sub>0</sub> = (81,78 %) 280,0994 M <sub>1</sub> =(12,64 %) 281,1020 M <sub>2</sub> =(5,06 %) 282,0974	 <p>(VIII) C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S</p>	m/z=280,09926 [M <sub>0</sub> ] <sup>+</sup> m/z=281,106 [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup>
Трициклическая форма тиамин (3-CT)		
Тиольная форма тиамин (TSH)		
Массы изотопологов: M <sub>0</sub> =138,0905 (92,2856%) M <sub>1</sub> =139,0928 (7,4435%) M <sub>2</sub> =140,0949 (0,26%)	 <p>C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub></p>	m/z=139,0973 [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup> 100%
Массы изотопологов: M <sub>0</sub> =167,0933 (91,065%) M <sub>1</sub> =168,0957 (8,37%) M <sub>2</sub> =169,0978 (0,53%)	 <p>C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O</p>	m/z=167,0933 [M <sub>0</sub> ] <sup>+</sup> (100%) m/z=168,0961 [M <sub>1</sub> ] <sup>+</sup>

## 1.2. Продукты окисления тиамин, образовавшиеся после воздействия ультрафиолета UVB диапазона на водные растворы тиамин в нейтральной, щелочной и кислой среде соответственно.

После воздействия ультрафиолета UVB -диапазона на водные растворы тиамин в растворе образуются продукты фотолиза. Продукты фотолиза молекулы тиамин выходят в виде отдельной фракции с R<sub>T</sub>=0,914 мин. Наиболее интенсивный пик в данной фракции принадлежит иону (M+H) с m/z=139,09 и брутто-формулой C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub> и идентифицирован как 2-метил-4-амино-5-аминометил пиримидин (таблица 2).

После воздействия ультрафиолета на водные растворы тиамин в нейтральной среде образуется 2-метил-4-амино-5-аминометил-пиримидин, и фрагменты тиазолового компонента молекулы тиамин (рисунок 4).

Среди продуктов фотолиза тиамин в нейтральной среде нами обнаружено соединение с молекулярным весом 280,09 и брутто-формулой  $C_{12}H_{16}N_4O_2S$ , что позволяет однозначно приписать данному иону структурную формулу тиазолон тиамин. Масс-спектр фракции с временем удерживания  $RT=3,18-3,33$  содержащей продукт фотолиза со значением  $m/z=281(M+H)$  приведен на рисунке 4.

Кроме того, в нейтральной среде при воздействии ультрафиолета на водные растворы тиамин в атмосфере воздуха образуются в небольших количествах тиохром, оксидигидротиохром (таблица 2).

**Таблица 2 — Интенсивность пиков молекулярных ионов продуктов фотолиза тиамин и значения  $m/z$  продуктов окислительной трансформации тиамин, образовавшиеся под действием ультрафиолета UVB диапазона на водные растворы тиамин в нейтральной среде. Концентрация тиамин 0,1 мМ, pH=7,0 фосфатный буфер 0,05 М.**

Состав раствора и время воздействия ультрафиолета	n-число ионов						
	T $m/z=265,11$ $M_0$ $M_1$ $M_2=$	AP-NH <sub>2</sub> $m/z=138,09$	TFT 167.0927	TChr $m/z=262,088$ $M_0$ 263.096 [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup> (100%)	ODTChr $m/z=278,086$	TT $m/z=280,09926$ [M] <sup>+</sup> $m/z=281,106$ [M+H] <sup>+</sup>	TSST $m/z=563,223$
T	98 207						
T (время воздействия ультрафиолета 5 мин.)	57651	13 668	1534-	-			4233
T (время воздействия ультрафиолета 30мин)	54672	29 000	2301-	324	23	975	1964

Структурные формулы, значения  $m/z$  молекулярных ионов продуктов, образовавшихся вследствие фотолиза, приведены в таблице 1

Тиохром, оксидигидротиохром и тиазолон тиамин не образуются при фотолизе тиамин в кислой среде (таблица 4).

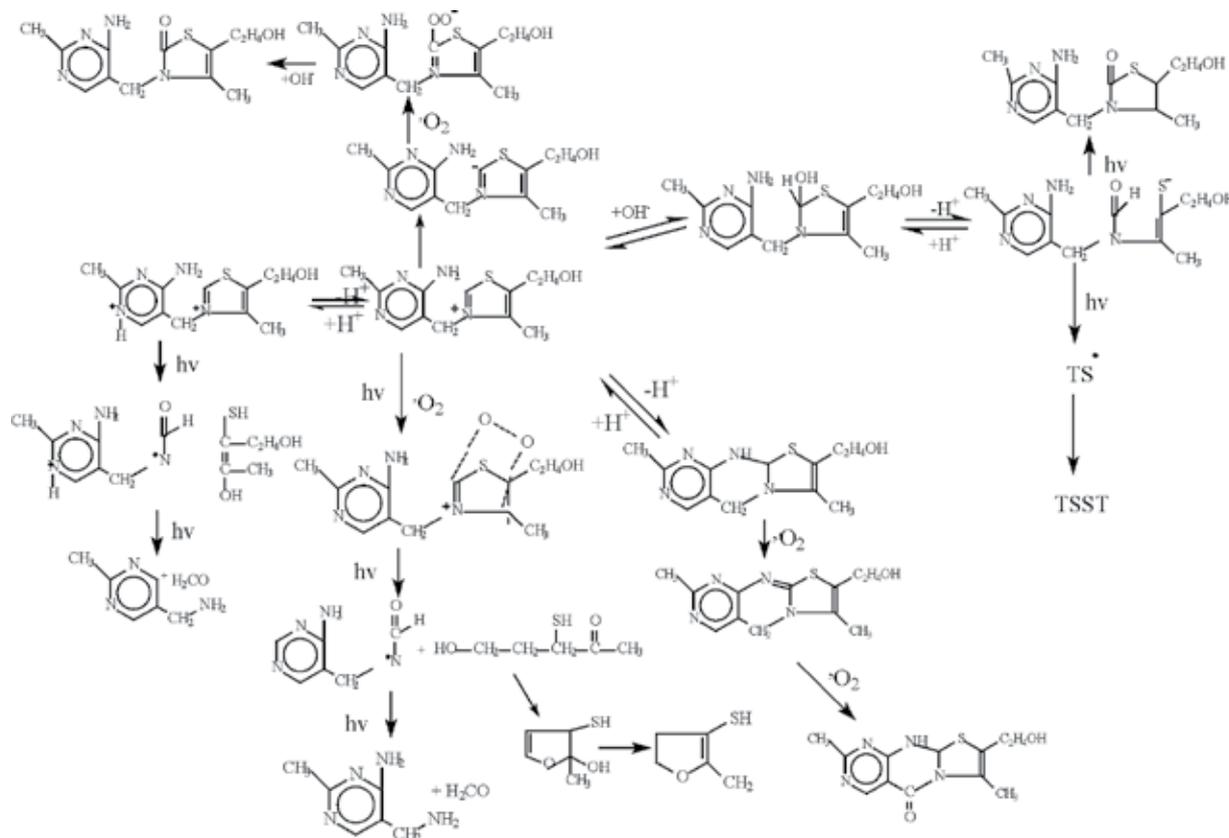
**Таблица 3 — Интенсивность пиков молекулярных ионов продуктов фотолиза тиамин и значения  $m/z$  продуктов окислительной трансформации тиамин в щелочной среде под действием ультрафиолета UVB диапазона. Величина pH среды равна 10,0, концентрация тиамин в водном растворе 0,1мМ.**

Состав раствора и время воздействия ультрафиолета	n-число ионов						
	T $m/z=265,11$ $M_0$ $M_1$ $M_2=$	TSH $m/z=281.105.$	AP-NH <sub>2</sub> $m/z=138,09$	TFT $m/z=167,0933$ [M <sub>0</sub> ] <sup>+</sup> (100%) $m/z=168,0961$ [M <sub>1</sub> ] <sup>+</sup>	TChr $m/z=262,088$ $M_0$ 263.096 [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup> (100%)	TT $m/z=280,09926$ [M] <sup>+</sup> $m/z=281,106$ [M+H] <sup>+</sup>	TSST $m/z=563,223$
T	9720						
T (время воздействия ультрафиолета 5 мин)	7960		1290	26353		1599	127432
T (время воздействия ультрафиолета 30мин)	3079		7985	25 293		1780	84 770

После продолжительного воздействия ультрафиолета в кислой среде тиамин практически полностью превращается в продукт с молекулярным весом 138,09. В электронном абсорбционном спектре продуктов фотолиза тиамин регистрируется двухполосный спектр поглощения с максимумами 235 нм и 270 нм характерными для аминопиримидина. Тиохром, оксидигидротиохром и тиазолон тиамин не образуются при фотолизе тиамин в кислой среде (таблица 4).

**Таблица 4 –Интенсивность пиков молекулярных ионов продуктов фотолиза тиамин и значения m/z продуктов окислительной трансформации тиамин, образовавшихся под действием ультрафиолета UVB диапазона на водные растворы тиамин в кислой среде. Концентрация тиамин в водном растворе 0,1мМ, значение рН среды равно 3,0.**

Состав раствора и время воздействия ультрафиолета	n-число ионов						
	T m/z= 265,111	TFT	AP-NH <sub>2</sub> m/z= 138,090	TChr m/z= 262,0882	ODTChr m/z= 278,086	TSST m/z= 563,223	TT m/z= 280,099
T (время воздействия ультрафиолета 5 мин)	90711		7859	-	-	-	-
T (время воздействия ультрафиолета 10 мин)	111042		11717	-	-	-	-
T(время воздействия ультрафиолета 20 мин)	86501	79569	16615	-	-	-	-



**Рисунок 5 — Предполагаемая схема трансформации тиамин под действием ультрафиолета UVB -диапазона в атмосфере воздуха в кислой, нейтральной и щелочной среде.**

## Список литературы

1. Восстановление метгемоглобина и ферри-цитохрома с гликозилированными аминокислотами и альбумином / И.И. Степура [и др.]. // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — №. 9 — С. 1130–1136.
2. Восстановление нитрита гликозилированными аминокислотами и гликозилированным альбумином / И.И. Степура [и др.]. // Биохимия. — 1999. — Т. 64. — №. 1. — С. 106–110.
3. Действие ультрафиолетового излучения на дисульфиды тиамин / С.А. Агейко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. — 2021. — Т. 66, № 1. — С. 000–
4. Действие ультрафиолетового излучения на тиамин и дисульфиды тиамин / С. Агейко [и др.] // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. — 2021. — Vol. 57. — №. 1. — Р. 70–86.
5. Ингибирование тиаминотрансферазы тирозина, триптофана, тирозинильных и триптофанильных остатков белков под действием ультрафиолета / И.И. Степура [и др.]. // Материалы Белорусско-Польско-Литовского конгресса «Биохимия и молекулярная биология» сборник научных статей, выпуск 1, «Посттрансляционная модификация белков», Гродно. — 2017. — С. 68–88.
6. Каюшин, Л.П., Пулатова, М.К., Кривенко, В.Г. Свободные радикалы и их превращения в облученных белках / Л.П. Каюшин, М.К. Пулатова, В.Г. Кривенко М. — Атомиздат. 1976. — 269 с.
7. Кудряшов, Ю.Б., Мазурик, В.А., Ломанов, М.Ф. Радиационная биофизика (Ионизирующие излучения) / Ю.Б. Кудряшов, В.А. Мазурик, М.Ф. Ломанов. — М.: Физматлит, 2004. — 448 с.
8. Ленинджер, А. Биохимия: Молекулярные основы структуры и функции клетки: Пер. с англ. — Из-во: «Мир», Москва 1976, 958 с.
9. Нарушение обмена тиамин в крови больных лучевой патологией и возможная связь этого нарушения с поражением нервной системы / Ю.М. Пархоменко [и др.]. // ДАН Украины. — 1995. — №. 2. —Р. 112–114.
10. Образование NO и других активных форм азота при воздействии УФ и видимого излучения на S-нитрозотиолы / И.И. Степура [и др.]. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междун. науч. конф.; 7 съезд БООФиБ, Минск, 21–23 июня 2006 г.: Сборник статей / Волотовский И. и др., 2006. — С. 24–26.
11. Образование NO при взаимодействии нитрита с гликозилированными аминокислотами и альбумином / И.И. Степура [и др.]. // Биохимия. — 1999. — Т. 64. — №. 1. — С. 106–110.
12. Окисленные производные тиамин: образование, свойства, биологическая роль / Ю. М. Пархоменко [и др.]. // Украинский биохимический журнал. — 2012. — Т. 84. — №. 6. — С. 5–24.
13. Окислительная трансформация тиамин, катализируемая ионами меди и аскорбиновой кислотой / И.И. Степура [и др.]. // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — №. 12. — С. 1648–1654.
14. Оксоферрильные формы миоглобина и гемоглобина в присутствии фенолсодержащих соединений катализируют окислительную трансформацию тиамин и его производных / С. А. Лабор [и др.]. // Известия НАН Беларуси, серия биологических наук. — 2017. — №. 2. — С. 55–65.
15. Островский, Ю.М. Активные центры и группировки в молекуле тиамин // Минск: Наука и техника. — 1975. — 300 с.

16. Островский, Ю.М. Тиамин // Минск: Наука и техника. — 1971.
17. Островский, Ю.М., Степура И.И., Мосолов Н.Н. Электронные спектры молекулы тиамин и свойства в гидрофобном окружении / Ю.М. Островский, И.И. Степура, Н.Н. Мосолов // Биохимия. — 1971. — Т.36. — №. 6. — С. 1222–1228.
18. Свободные радикалы и их превращения в облученных белках / Л.П. Каюшин, М. К. Пулатова, В.Г. Кривенко М. — Атомиздат. 1976. — 269 с.
19. Степура, А.И., Пилецкая, Т.П., Степура, И.И. Роль тиольной формы тиамин в обмене оксида азота / А.И. Степура, Т.П. Пилецкая, И.И. Степура // Биохимия. — 2005. — Т. 70. — №. 3. — С. 416–429.
20. Степура, А., Адамчук, Р., Степура В. Исследование кислотно-щелочных превращений оксидгидрохрома методом ИК-спектроскопии // Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и при патологии. Материалы междунар. симп. в 2 ч. / Под ред. Степура И., Заводник И. — Т. 2. — Гродно. — 2006. — С. 131–138.
21. Степура, В., Степура, А. Взаимодействие тиамин с феррицитохромом с и комплексом феррицитохрома с с оксидом азота / В. Степура, А. Степура. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междун. науч. конф.; 6 съезд Белор. обществ. Объедин. Фотобиологов и биофизиков, Минск, : Сборник статей в 2 -х частях. Часть I / Под ред. Волотовский И. и др. — Т. 1 — Минск, 2004. — С. 275–277.
22. Степура, И.И. Антиоксидантные свойства витаминов и их комплексов с белками крови / И.И. Степура // Вопросы мед. химии. — 1992. — Т. 38. — №.4. — С. 26–33.
23. Степура, И.И., Адамчук, Р.И., Степура, В.И. Образование оксида азота при воздействии ультразвука на воду и водные растворы / И.И. Степура, Р.И. Адамчук, В.И. Степура // Биофизика. — 2004. — Т. 49. — С. 773–780.
24. Степура, И.И., Степура, В.И. Окислительная трансформация тиамин и его производных гемопротеинами по пероксидазному механизму, под редакцией А.П. Солодкова и А. А. Чиркина, . 2010, УО «ВГУ им. П.М. Машерова»: Витебск. р. 28-58. катализируемая фенол-содержащими соединениями, в кн. Современные проблемы биохимии.
25. Тиамин ингибирует образование дитиозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина / И.И.Степура [и др.]. // Биохимия. — 2008. — Т. 73. — №.9. — С. 1281–1293.
26. Тиаминная активность оксоферрильных форм миоглобина / И.И. Степура [и др.]. // Известия НАН Беларуси, серия биологических наук. 2018. — Т. 63. — №. 2. — С.176–187.
27. Фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода витаминами группы В / Б.М. Джагаров [и др.]. // Прикладной спектроскопия. — 1995. — Т. 62. — №. 2. — С. 285–289.
28. Фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиамин в водных растворах при воздействии ультрафиолета и видимого излучения / И.И. Степура [и др.]. // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. — 2020. — Vol. 65.– №. 2. — P. 199–211.
29. Чайковская, Н.А., Степура, И.И. Образование NO при взаимодействии нитрита с гликозилированными аминокислотами и альбумином / Н.А. Чайковская, И.И. Степура // Биохимия. — 1999. — Т. 64. — №. 1. — С. 106–110.
30. NO при взаимодействии нитрита с гемоглобином / И.И. Степура [и др.]. // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — №. 9. — С. 1122–1129.
31. Acceleration of transformation of thiol radicals to disulfides by methemoglobin. Antioxidant function of methemoglobin / I.I. Stepuro [et al.] // J. Current. Topics. Biophys. — 1994. — Vol. 18. — №. 2. — P. 189–193.
32. Bubeshko N., Stsiapura V., Stepuro I. Fluorescent properties of thiochrome in solvents of different polarity / N. Bubeshko, V. Stsiapura, I. Stepuro // J. Appl. Spectrosc. — 2011. — Vol. 78. — №. 3. — P. 337–343.

33. Davies, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I General aspects / K. J. A. Davies // *J. Biol. Chem.* — 1987. — Vol. 262. — P. 9895–9901.
34. Davies, M. J., Truscott, J. W. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis / M. J. Davies, J. W. Truscott // *J. Photochem. Photobiol.* — 2001. — Vol. — 63, — №. 1–3. — P. 114–125. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00208-1](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00208-1).
35. Detection of S-Nitroso Compounds by Use of Midinfrared Cavity Ring-Down Spectroscopy / V. I. Stsiapura [et al.] // *J. Anal. Chem.* — 2015. — Vol. — 87.— №. 6. — P. 3345–3353.
36. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type Intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, Ascorbate, and dichloofluorescein by Cytochrome c/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / A. Lawrence [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278. — №.32. — P.29410–29419.
37. Fujita, A., Nose, Y., Kuratani, K. The second type of bacterial thiaminase / A. Fujita, Y. Nose, K. Kuratani // *J. Vitaminol.* — 1954. — Vol. 1. — №. 1. — P. 1–7.
38. García-Castineiras, S., Dillon J., Spector A. Detection of bityrosine in cataractous human lens protein / S. García-Castineiras, J. Dillon, A. Spector // *J. Science.* — 1978. — Vol. 199. — P. 897–899.
39. Giulivi, C., Davies, J. A. Hydrogen peroxide mediated ferrilhemoglobin generation in vitro and in red blood cells / C. Giulivi, J. Davies // *Methods Enzymol.* — 1994. — Vol. 231. — P. 490–496.
40. Gutowski, J.A., Lienhard, G.E. Transition state analogs for thiamin pyrophosphate-dependent enzymes / J.A. Gutowski, G.E. Lienhard // *J. Biol. Chem.* — 1976. — Vol. 251. — P. 2863–2866.
41. Haber, F., Willstatter R. The Haber-Weiss cycle — 70 years later / F. Haber, R. Willstatter // *J. Deutsh. Chem. Ges.* — 1931. — Vol. 64. — P. 2844–2856.
42. Herold, S., Rehman F-J.K. 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.
43. Huie ,R.E., Padmaja S. Free Radical Res Commun 18: 195-199 pmid: 8396550 // Blough, NV, Zafiriu, OC (1985) *Inorg. Chem.* — 1993. — Vol. 24. — P. 3504–3505.
44. 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.
45. Interaction of ethanol with blood proteins / YuM O. [et al.] // *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement.* — 1987. — Vol. 1. — C. 283–287.
46. Kinetic studies of oxygenation of a- and b-subunits within pyridoxal-5'-phosphate derivatives of human hemoglobin / N.V. Dzhagarov [et al.] // *J. Molec. Structur.* — 2005. — P. 307–313.
47. Konovalova, N., Solodunov, A., Tyshchenko, A. Non-enzymatic covalent modification of Human Hemoglobin by pyridoxal-P under the action of visible light / N. Konovalova, A. Solodunov, A. Tyshchenko // *J. Molec. Biology.* — 1993. — Vol. 27. — №. 4. — P. 483–487.
48. Koppenol, W.H. A thermodynamic appraisal of the radical sink hypothesis / W.H. Koppenol // *J. Free Radical Biolog. Med.* — 1993. — T. 14. — №. 1. — P. 91–94.
49. Kozyrev, D., Slutsky, V. Antioxidant properties of thiamine and its hydrophobic metabolites, in *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects* / D. Kozyrev, V. Slutsky // Editors. Nova Sci. Publish. — 2010. P. 319–376.
50. Laser kinetic spectroscopy studies of the reaction of human hemoglobin with molecular oxygen / B.M. Dzhagarov [et al.] // *5th International Conference on Laser Applications in Life Sciences.* — International Society for Optics and Photonics. — 1995. — Vol. 2370. — P. 232–241.
51. Lepeshkevich, S. V. Kinetic studies of oxygenation of a- and b-subunits within pyridoxal-5'-phosphate derivatives of human hemoglobin / Lepeshkevich S. V. [et al.] // *J. Molec. Structur.* — 2005. — Vol. 735. — P. 307–313.

52. Metzler, D.E. *Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells* // N.Y.: Acad. Press. — 1977. — Vol. 2.
53. Nothing of chemistry disappears in biology': the Top 30 damage-prone endogenous metabolites / C. Lerma-Ortiz [et al.] // *J. Biochem. Soc.* — 2016. — Vol. 44. — P. 981–971.
54. Optimizing the energy status at skin cells during solar radiation / E.L. Jacobson [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* — 2001. — Vol. 63. — P. 141–147.
55. 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.
56. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide / Koppelman W. H. [et al.] // *J. Chem. Res. Toxicol.* — 1992. — Vol. 5. — №. 6. — P. 834–842.
57. Photolysis of thiamine by UV light / I.I. Stepuro [et al.] // VI International Conference. — 2018. — P. 63–65.
58. Reddi, K.K, Giri, K.V. *Enzymologia.* — 1948. — Vol. 13. — P. 281.
59. Sites of non-enzymatic glycosylation of human hemoglobin A / R. Shapiro [et al.] // *J. Brit. Chem.* — 1980. — Vol. 255. — P.3120–3127.
60. S-Nitrosoglutathione formation at gastric pH is augmented by ascorbic acid and by the antioxidant vitamin complex, Resiston / V.I. Stsiapura [et al.] // *J. Pharm. Biol.* — 2018. — Vol. 56. — №. 1. — P. 86–93.
61. Stepuro, A. I., Piletskaya, T. P., Stepuro, I. I. Role of thiamine thiol form in nitric oxide metabolism / A. I. Stepuro, T. P. Piletskaya, I.I. Stepuro // *J. Biochem.* — 2005. — Vol. 70. — №. 3. — P. 339–349.
62. Stepuro, I.I. Interaction of ethanol with blood proteins “Alcohol and Alcoholism”. Suppl.1. Pergamon / I.I. Stepuro // *J. Biomed. Alcohol Res.* Pergamon Press. — 1987.
63. Stepuro, I.I. Non-enzymatic covalent modification of Human Hemoglobin by pyridoxal-P under the action of visible light / I.I. Stepuro [et al.] // *J. Molecul. Biology.* — 1993. — Vol. 27. — №.4. — P. 483–487.
64. Stepuro, I.I. Thiamine and vasculopathie / I.I. Stepuro // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* — 2005. — Vol. 72. — №. 2. — P. 115–127.
65. Stepuro, I.I., Stepuro, V.I. Oxidized thiamine derivatives / I.I. Stepuro, V.I. Stepuro // LAP LAMBERT Academic Publishing. — 2014. — 280 p.
66. Stsiapura, V.I., Stepuro, I.I. Antioxidant properties of thiamine and its hydrophobic metabolites In *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects* /Eds. D. Kozyrev, V. Slutsky Nova Science Publishers. — 2010. — P. 319–376.
67. Sun Protection” National cancer institute’s cancer trends progress report, 2007 Update // [www.cancer.org](http://www.cancer.org) (2008-04-15).
68. Tan, K. H. *Soil sampling, preparation, and analysis* / K.H. Tan // CRC press. — 1995.
69. The globin-based free 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.
70. Thiamine inhibits formation of dityrosine, a specific marker of oxidative injury, in reactions catalyzed by oxoferryl forms of hemoglobin / A.I. Stepuro [et al.] // *J. Biochem. (Mosc).* — 2008. — Vol. 73. — №9. — P.1281–1293.
71. Van Dort, H.M., van Linde L.M., Rijke D. Identification and synthesis of new odor compounds from photolysis of thiamine / H.M. Van Dort, L.M. Van Linde, D. Rijke // *J. Agric. Food Chem.* — 1981. — Vol. 29. — P.183–185.
72. Vlassara, H. Advanced Non-enzymatic glycosylation of proteins role in late complications of aging and diabetes / H. Vlassara // *J. Cell. Biochem.* — 1989. Suppl 13C. — P.148.
73. Vlassara, H., Cerami, B. A non-enzymatic glycosylation role in the pathogenesis of diabetic complications / H. Vlassara, B. Cerami // *J. Clin. Chem.*—1986. — Vol. 32. — №.10. — P. 37–41.
74. World Health Organization. Global initiative for the prevention of avoidable blindness — Geneva: World Health Organization, 2000. — №. WHO/PBL/97.61 Rev. 2.

**Публикации сотрудников лаборатории биофизики по теме статьи  
«Витаболоника. Биохимические свойства продуктов окислительной трансформации  
витаминов и коферментов и их роль в клеточном метаболизме».**

1. Адамчук, Р.И., Коновалова, Н.В., Степуро, А.И. Окислительные превращения глутатиона и цистеина под действием ультразвука в водном и водно-спиртовых растворах / Р. И. Адамчук, Н.В. Коновалова, А.И. Степуро // Весник ГрГУ им Я. Купалы. Серия 2. — 2007. — Т. 52. — №. 2. — С. 86–93.
2. Адамчук, Р.И., Степуро, В.И. Образование оксида азота и ионов нитрозония в воде и в водных растворах под действием ультразвука / Р.И. Адамчук, В.И. Степуро // Вестник Гродненского Государственного университета. — 2003. — №. 4. — С. 205–211.
3. Адамчук, Р.И., Степуро, В.И. Образование редокс-форм оксида азота и S-нитрозотиолов в ультразвуковом поле / Р.И. Адамчук, В.И. Степуро // Вестник Гродненского Государственного Университета имени Я. Купалы. — 2005. — Т. 31. — №. 1. — С. 190–195.
4. Адамчук, Р.И., Степуро, А.И. Взаимодействие рибофлавина и гемопротеинов со свободными радикалами и супероксиданионом генерируемыми в ультразвуковом поле / Р. И. Адамчук, А.И. Степуро // Биофизика. — 2002. — Т. 47. — №. 6. — С. 903–913.
5. Адамчук, Р.И., Чайковская, Н.А., Соколовская, С.Н. Механизм физиологического действия ультрафиолета и видимого света. Роль оксида азота / Р.И. Адамчук, Н.А. Чайковская, С. Н. Соколовская // Роль нейромедиаторов и регуляторных пептидов в процессах жизнедеятельности», посвященная 150-летию со дня рождения И. П. Павлова. — 1999. — С. С. 209–211.
6. Аддукты гликозилированного сывороточного альбумина с аминокислотами / Т.П. Пилецкая [и др.]. // Укр. биохим. Журнал. — 1986. — Т. 58. — №. 4. — С. 3–9.
7. Антиоксидантные свойства тиамин и его окисленных форм / В.М. Завадская [и др.]. // Материалы Международной научно-практической конференции, Белорусские лекарства. — 2014. — С.72–75.
8. Антиоксидантные свойства тиамин, ингибирование тиамин нитрования тирозина и тирозильных остатков белков, катализируемое метмиоглобином / И.И. Степуро [и др.]. // Материалы II Белорусского биохимического конгресса. — 2018. — С. 562–571.
9. Антиоксидантные свойства тиамин. Тиамин — эффективная ловушка синглетного кислорода / С.А. Лабор [и др.]. // Материалы Международной научной-практической конференции «Кислород и свободные радикалы». — 2016. — С. 99–102.
10. Арцукевич, А.Н., Островский, Ю.М. Изменение конформации сывороточных альбуминов под действием ультрафиолета / А.Н. Арцукевич, Ю.М. Островский // Биофизика. — 1981. — Т. 26. — №. 5. — С. 777–781.
11. Арцукевич, А.Н., Солодунов, А.А. Комплексы  $\text{Cu}^{2+}$  с пиридоксаль-5-фосфатом и СА человека и быка / А.Н. Арцукевич, А.А. Солодунов // Молек. Биология. — 1984. — Т. 19. — №. 3. — С. 813–820.
12. Бубешко, Н.Н., Степуро, В.И. Флуоресцентные свойства тиохрома в растворителях разной полярности / Н.Н. Бубешко, В.И. Степуро // Журнал прикладной спектроскопии. — 2011. — Т. 78. — №. 3. — С. 354–360.
13. Буко, В.У. Взаимодействие простагландина E420 с сывороточным альбумином человека / В.У. Буко // Биохимия. — 1987. — Т. 52. — №. 6. — С. 891–895.
14. Взаимодействие с альдегидами 2-метил-4-амино-5-аминометил-пиримидина, образованного при фотолизе тиамин и его дисульфидных производных / С.А. Лабор [и др.]. // Международная научно-практическая конференция. — 2014. — С.110–112.

15. Виноградов, В.В. Витамин С и окислительный стресс — роль в обмене оксида азота, в кн. «Стресс и витамины» / В.В. Виноградов // Издательский отдел Гродненского медицинского университета. — 254 с.
16. Влияние мелатонина на окисление тиамин и его фосфорных эфиров оксоферрильными формами миоглобина / Лабор [и др.]. // материалы республиканской конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения В.А. Бандарина. — 2019. Т. 2. — С. 20–21.
17. Влияние тиамин и пиридоксальфосфата на антирадикальное действие липоевой кислоты при окислительном стрессе / В.В. Виноградов [и др.]. // Новости медико-биологических наук, научно-практический и научно-теоретический журнал. — 2015. — Т. 11. — №. 1. — С. 26–32.
18. Воздействие свободных радикалов на сывороточный альбумин в кн «Альбумин сыворотки крови в клинической медицине» под ред. Ю.А. Грызунова, Г.Е. Добрецова. М.: ГЭОТАР, 1998. — С. 187–201.
19. Гайко, Т.П., Островский, Ю.М. Распределение и некоторые характеристики лизиновых и аргининовых остатков дрожжевой пируват декарбоксилазы / Т.П. Гайко, Ю.М. Островский // Известия АН БССР, серия биол. — 1980. — №. 1. — С. 99–106.
20. Действие ультразвука на ферро-гемоглобин человека / В.А. Игнатенко [и др.]. // Журнал физической химии. — 1988. — Т. 62. — №. 9. — С. 24568–24576.
21. Действие ультрафиолета на дисульфиды тиамин / И.И. Степура [и др.]. // Материалы Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». — 2018. — С. 39.
22. Действие ультрафиолета солнечного излучения на дисульфиды тиамин / Лабор [и др.]. // Материалы II Белорусского биохимического конгресса. — 2018. — С. 320–328.
23. Действие ультрафиолетового излучения на тиамин и дисульфиды тиамин / С. А. Агейко [и др.]. // Известия. Серия химических наук. — 2021. — Т. 57. — №. 1. — С. 70–86.
24. Завадская, В.М., Лабор, С.А., Степура, И.И. Антиоксидантный потенциал тиамин и его окисленных форм / В.М. Завадская, С.А. Лабор, И.И. Степура // Материалы I Международного симпозиума, Метаболический синдром: эксперимент, клиника, терапия. — 2013. — С. 185–191.
25. Завадская, В.М., Лабор, С.А., Степура, И.И. Сопряженное окисление катехоламинов и тиамин в пероксидазных реакциях, катализируемых ферри-формами гемоглобина или миоглобина / В.М. Завадская, С.А. Лабор, И.И. Степура // Материалы Международной научной конференции, Фундаментальные науки — медицине. — 2013. — С. 272–275.
26. Заводник, И.Б. Изучение флуоресценции пиридоксаль-5- фосфата и пиридоксамина, ковалентно-связанных с сывороточным альбумином / И.Б. Заводник // Известия АН СССР. — 1981. — №. 4. — С. 542–545.
27. Заводник, И.Б. Некоторые ферментативные и неферментативные пути превращения ацетальдегида / И.Б. Заводник // Укр. биохимич. журн. — 1988. — Т. 60. — №. 4. — С. 51–57.
28. Заводник, И.Б. Состояние и спектральные свойства пировиноградной кислоты в органических растворителях / Заводник И.Б. // Физическая химия. — 1988. — Т. 62. — №. 11. — С. 3038–3043.
29. Заводник, И.Б., Лапшина, Е.А. Термостабильность эритроцитарных мембран в присутствии этанола // И.Б. Заводник, Е.А. Лапшина // Биофизика. — 1994. — Т. 39. — С. 470–474.

30. Заводник, И.Б., Островский, Ю.М. Взаимодействие ацетальдегида с сывороточным альбумином / И.Б. Заводник, Ю.М. Островский // Укр. биохим. Журнал. — 1982. — Т. 54. — №. 2. — С. 123–128.
31. Заводник, И.Б., Пилецкая, Т.П. Антиоксидантные свойства витаминов и их комплексов с белками крови / И.Б. Заводник, Т.П. Пилецкая // Вопросы мед. химии. — 1992. — №. 1. — С. 36–43.
32. Заводник, И.Б., Пилецкая, Т.П. Аутоокисление и окисление гемоглобина человека / И.Б. Заводник, Т.П. Пилецкая // Молекул. биол. — 1992. — Т. 26. — №. 2. — С. 82–88.
33. Заводник, И.Б., Пилецкая, Т.П. Лизис эритроцитов человека, индуцируемый жирными кислотами / И.Б. Заводник, Т.П. Пилецкая // Известия АН БССР. — 1990. — №. 4. — С. 68–72.
34. Заводник, И.Б., Пилецкая, Т.П. Механический лизис эритроцитов человека. Стабилизация мембран белками плазмы / И.Б. Заводник, Т.П. Пилецкая // Укр. биохим. Журнал. — 1991. — Т. 63. — №. 6. — С. 72–78.
35. Заводник, И.Б., Пилецкая, Т.П. Осмотический и механический лизис эритроцитов человека / И.Б. Заводник, Т.П. Пилецкая // Биологические мембраны. — 1995. — Т. 12. — №. 5. — С. 400–407.
36. Заводник, И.Б., Солодунов, А.А. Состояние и спектральные свойства пировиноградной кислоты в органических растворах / И.Б. Заводник, А.А. Солодунов // Журнал физич. Химии. — 1988. — Т. 62. — №. 5. — С. 1266–1271.
37. Игнатенко, В.А. Коновалова Н.В. Действие ультразвука на водные и водно-спиртовые растворы метНв / В.А. Игнатенко, Н.В. Коновалова // Журнал физич. Химии. — 1988. — Т. 12. — №. 2.
38. Игнатенко, В.А., Опарин, Д.А. Образование альдегидов из спиртов под действием пероксидной формы Нв и гидроксильных радикалов, генерируемых ионами Cu (II), Fe(III) в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / В.А. Игнатенко, Д.А. Опарин // Физическая химия. — 1990. — Т. 64. — №. 7. — С. 1774–1782.
39. Изменение связывающих свойств сывороточного альбумина у пациентов с сепсисом при проведении экстракорпоральной детоксикации / В.В. Виноградов [и др.]. // Новости хирургии. — 2009. — №. 2. — С. 83–90.
40. Изучение действия ультрафиолетового излучения и ультразвука на сывороточный альбумин / А.Н. Арцукевич [и др.]. // Физич. Химия. — 1986. — №. 10. — С. 2535–2539.
41. Изучение рН-зависимости кинетических параметров функционирования пируваткиназы коры надпочечников быка / В.В. Виноградов [и др.]. // Биохимия. — 1990. — Т. 55. — №. 2. — С. 352–360.
42. Ингибирование тиамином образования дитирозина в фотохимических реакциях / С. А. Лабор [и др.]. // IV Международная конференция, Химия, структура, и функция биомолекул. — 2012. — С. 205–206.
43. Ингибирование тиамином фотолиза тирозина, триптофана, тирозинильных и триптофанильных остатков белков под действием ультрафиолета / И.И. Степура [и др.]. // Материалы Белорусско-Польско-Литовского конгресса «Биохимия и молекулярная биология» сборник научных статей, выпуск 1, «Посттрансляционная модификация белков». — 2017. — С. 68–88.
44. Исследование антиоксидантных свойств липоевой кислоты и тирозина в модели окислительной модификации метмиоглобина *in vitro* / Л.И. Надольник [и др.]. // Материалы Международной научной-практической конференции «Белорусские лекарства». — 2016. — С. 176–179.

45. Исследование взаимодействия ПАЛФ с САЧ в присутствии ионов меди методом кругового дихроизма / А.А. Солодунов [и др.]. // Молекул. биол. — 1985. — Т. 19. — №. 5. — С. 1332–1337.
46. Катализ парацетамолом и тирозином окисления тиамин, протекающего под действием метмиоглобина или метгемоглобина и пероксида водорода / С.А. Лабор [и др.]. // Международная научная конференция, Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. — 2012. — С. 45–48.
47. Кашко, М.Ф. Стабилизация гемоглобина альдегидами в реакциях аутоокисления в метгемоглобин / М.Ф. Кашко // Биохимия. — 1989. — Т. 54. — №. 2. — С. 244–249.
48. Кукреш, М.И. Активация гистидином превращений дисульфидных производных тиамин под действием УФ излучения / М.И. Кукреш // Биофизика. — 1979. — №. 1. — С. 360–363.
49. Кукреш, М.И., Островский, Ю.М. Изучение взаимодействия тиамин и тиаминдифосфата с цистеином в основном состоянии фотохимическим методом / М.И. Кукреш, Ю.М. Островский // Физическая. Химия. — 1978. — Т. 11. — №. 12. — С. 3151–3154.
50. Лабор, С.А., Завадская, В.М., Степура, И.И. Сопряженное окисление тиамин с окислением парацетамола и других монофенолов в пероксидазных реакциях, катализируемых цитохромом *c* и миоглобином / С.А. Лабор, В.М. Завадская, И.И. Степура // Материалы Республиканской научно-практической конференции, Кислород и свободные радикалы. — 2014. — С. 126–128.
51. Лабор, С.А., Степура, В.И., Степура, И.И. Новые механизмы физиологического действия тиамин в норме и при патологии / С.А. Лабор, В.И. Степура, И.И. Степура // Материалы Международной конференции, Фундаментальные науки и современная медицина. — 2012. — С.163–166.
52. Лабор, С.А., Степура, В.И., Степура, И.И. Перспективы использования окисленных форм тиамин в создании лекарственных препаратов / С.А. Лабор, В.И. Степура, И.И. Степура // Материалы Международной научно-практической конференции, Белорусские лекарства. — 2012. — С. 225–230.
53. Лабор, С.А. Тиамин ингибирует образование дитиозина и межбелковых дитиозино-вых сшивок, вызванных действием ультрафиолета солнечного излучения на тирозин и белки / С.А. Лабор // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Ю.Г. Бойко. — 2015. — С. 326–327.
54. Лабор, С.А. Фотоокисление тиамин и тиаминдифосфата синглетным кислородом в модельных системах и в составе холофермента / С.А. Лабор // Сборник материалов конференции молодых ученых-биохимиков с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения академика Ю.М.Островского, Современные проблемы биохимии. — 2015. — С. 75–76.
55. Лизис эритроцитов человека, индуцируемый алифатическими альдегидами / А.Н. Арцукевич [и др.]. // Биологические мембраны. — 1990. — Т. 7. — №. 7. — С. 742–748.
56. Механизм окисления тиамин и его фосфорных эфиров в псевдопероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином, в присутствии парацетамола / С.А. Лабор [и др.]. // Материалы Международной научной-практической конференции «Белорусские лекарства». — 2016. — С. 116–123.
57. Механизмы некоферментного действия компонентов нейровазотропина при оксидативном стрессе и разработка антистрессорных тиаминсодержащих препаратов / В.В. Виноградов [и др.]. // Доклады Национальной академии наук. — 2015. — Т. 59. — №. 3. — С.67–71.
58. Механизмы прооксидантного действия  $\alpha$ -липоевой кислоты (тиоктовой) кислоты / В. В. Виноградов [и др.]. // Новости медико-биологических наук. — 2013. — Т. 7. — №. 2. — С. 151–158.

59. Митянок, Н.В. Механизмы взаимодействия пиридоксаль-5-фосфата и ацетальдегида с апо-гемоглобином. Конкуренция за места связывания с гемином / Н.В. Митянок // Биохимия. — 1983. — Т. 48. — №. 3. — С. 342–400.
60. Мороз, А.Р. Взаимодействие пиридоксаль-5-фосфата с сывороточным альбумином человека и панкреатической рибонуклеазой / А.Р. Мороз // Биохимия. — 1987. — Т. 52. — №. 4. — С. 550–552.
61. Мороз, А.Р. Катализ дейтерообмена метильной группы пирувата сывороточным альбумином / А.Р. Мороз // Биохимия. — 1986. — Т. 51. — №. 5. — С. 773–778.
62. Мосолов, Н.П., Островский, Ю.М. Каталитическая полярографическая активность сульфидной серы тиазолового компонента тиамин и его производных / Н.П. Мосолов, Ю. М. Островский // Биохимия. — 1972. — Т. 37. — №. 76. — С. 1266–1275.
63. Новый витаминсодержащий антимергемоглобинообразователь / Д.А. Опарин [и др.]. // Медицинские новости. — 1996. — №. 3. — С. 47.
64. Образование NO в процессе окисления ферроформ гемоглобина нитритом / Степура И. И. [и др.]. // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — №. 9. — С. 1122–1129.
65. Образование оксида азота при воздействии ультразвука на воду и водные растворы / Р.И. Адамчук [и др.]. // Биофизика. — 2004. — Т. 49. — С. 773–780.
66. Окисление тиамин и его производных под действием синглетного кислорода / С. А. Лабор [и др.]. // Материалы Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». — 2016. — С. 107–110.
67. Окисление тиамин под действием диоксида азота, генерируемого ферри-формами миоглобина и гемоглобина в присутствии нитрита и пероксида водорода / А.Ю. Опарин [и др.]. // Биохимия. — 2012. — Т. 77. — №. 1. — С. 53–70.
68. Окисление тиамин, катализируемое метмиоглобином и пероксидом водорода, в присутствии парацетамола / С.А. Лабор [и др.]. // Материалы Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». — 2016. — С. 110–113.
69. Окисление тиохрома под действием ультрафиолета UVA диапазона / И.И. Степура [и др.]. // Материалы международной научной конференции «Современные проблемы радиобиологии». — 2021.
70. Окисленные производные тиамин: образование, свойства, биологическая роль / Ю. М. Пархоменко [и др.]. // Укр.биохим. журн. — 2012. — Т. 84. — №. 6. — С. 5–24.
71. Окислительная трансформация тиамин и его метаболитов под действием нитрита и оксоферрильных форм миоглобина / А.Ю. Опарин [и др.]. // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2009. — Т. 26. — №. 2. — С. 138–141.
72. Окислительная трансформация тиамин, катализируемая ионами меди и аскорбиновой кислотой / Т.П. Пилецкая [и др.]. // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — №. 12. — С. 1648–1654.
73. Оксоферрильные формы миоглобина и гемоглобина в присутствии фенолсодержащих соединений катализируют окислительную трансформацию тиамин и его производных / С. А. Лабор [и др.]. // журнал Известия НАН Беларуси, серия биологических наук. — 2017. — №. 2. — С. 55–65.
74. Опарин, Д.А., Мороз, А.Р., Забродская, С.В. Спектрофотометрическое определение оксидигидро тиохрома в присутствии тиохрома / Д.А. Опарин, А.Р. Мороз, С.В. Забродская // Вести АН РБ. Серия хим. наук. — 1992. — №. 1.
75. Особенности ингибирования тиаминдифосфат-зависимых ферментов оксидигидро тиохромом и его фосфорилированными производными / Т.И. Зиматкина [и др.]. // Укр. Биохим. журн. — 1991. — Т. 63. — №. 2. — С. 59–65.
76. Островский, Ю.М. К вопросу об образовании тиамином П-комплексов с новокаином и кокаином / Ю.М. Островский // Известия АН БССР, сер. биол. — 1979. — №. 2. — С. 67–69.
77. Островский, Ю.М. Механизм связывания гексенала и виадрилла сывороточным альбумином / Ю.М. Островский // Биорганич. Химия. — 1979. — Т. 5. — С. 1161–1170.

78. Островский, Ю.М. Распределение и некоторые характеристики триптофана и тирозина в дрожжевой пируватдекарбоксилазе / Ю.М. Островский // *Биоорганическая. Химия.* — 1975. — Т. 1. — №. 6. — С. 821–827.
79. Островский, Ю.М. Электронные спектры молекулы тиамин и свойства в гидрофобном окружении / Ю.М. Островский // *Биохимия.* — 1971. — Т. 36. — №. 6. — С. 1222–1228.
80. Парамагнитные продукты фотолиза пировиноградной кислоты / А.Н. Арцукевич [и др.]. // *Известия АН БССР, серия биол. наук.* — 1985. — №. 2. — С. 51–54.
81. Продукты окислительной трансформации тиамин и его фосфорных эфиров в реакциях, катализируемых метмиоглобином в присутствии пероксида водорода / Лабор [и др.]. // *Материалы Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем».* — 2018. — С. 27.
82. Распределение пиридоксаль-5-фосфата между белками и низкомолекулярными компонентами плазмы крови / Ю.М. Островский [и др.]. // *Укр. биохим. Журнал.* — 1988. — Т. 60. — №. 60. — С. 34–41.
83. Соколовская, С.Н. Окисление глутатиона и цистеина под действием свободных радикалов, генерируемых ультразвуком / С.Н. Соколовская // *Биофизика.* — 1995. — Т. 40. — №. 6. — С. 1158–1164.
84. Солодунов, А.А. Изучение взаимодействия пиримидинового компонента тиамин ацетальдегидом методами молекулярной спектроскопии / А.А. Солодунов // *Известия АН БССР, серия биол. наук.* — 1979. — №. 3. — С. 103–105.
85. Солодунов, А.А. Механизм взаимодействия пиридоксаль-5-*i* фосфата с сывороточным альбумином человека / А.А. Солодунов // *Укр. биохим. Журнал.* — 1983. — Т. 55. — №. 2. — С. 123–128.
86. Солодунов, А.А., Гайко, Т.П. Спектрофотометрический метод определения содержания аминокрупп в белке с помощью пиридоксаль-Ф / А.А. Солодунов, Т.П. Гайко // *Лаборат. Дело.* — 1983. — №. 3. — С. 21–24.
87. Солодунов, А.А., Нефедов, Л.И. Фотосенсибилизированное видимым светом связывание пиридоксаль-5-фосфата с бычьим сывороточным альбумином / А.А. Солодунов, Л. И. Нефедов // *Молекулярная биология.* — 1982. — Т. 16. — №. 6. — С. 1284–1293.
88. Солодунов, А.А., Островский, С.Ю. Изучение взаимодействия пиридоксаль-5-фосфата с белками / А.А. Солодунов, С.Ю. Островский // *Известия АН БССР.* — 1981. — №. 1. — С. 57–80.
89. Солодунов, А.А., Островский Ю.М. Гетерогенный характер взаимодействия 1,8-анилинонафталин сульфоната с сывороточным альбумином / А.А. Солодунов, Ю.М. Островский // *Известия АН БССР, серия биол.* — 1979. — №. 6. — С. 98–101.
90. Солодунов, А.А., Ярошевич, Н.А. Взаимодействие билирубина с гликозилированным сывороточным альбумином / А.А. Солодунов, Н.А. Ярошевич // *Вопросы мед. химии.* — 1986. — №. 6. — С. 46–48.
91. Степура, И.И., Степура, В.И. Окисленные производные тиамин. Механизмы образования под действием активных форм азота, кислорода и в реакциях, катализируемых гемопротейнами // *LAP LAMBERT Academic Publishing.* — 2014. — С. 280.
92. Степура, А.И., Пилецкая, Т.П. Роль тиольной формы тиамин в обмене оксида азота / А.И. Степура, Т.П. Пилецкая // *Биохимия.* — 2005. — Т. 70. — №. 3. — С. 416–429.
93. Степура, А.И., Адамчук, Р.И., Опарин, А.Ю. Тиамин ингибирует образование дитиозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина / А.И. Степура, Р.И. Адамчук, А.Ю. Опарин // *Биохимия.* — 2008. — Т. 73. — №. 9. — С. 1281–1293.
94. Степура, В.И. Окислительная трансформация тиамин и его производных гемопротейнами по пероксидазному механизму, катализируемая фенол-содержащими соединениями, в

- кн. Современные проблемы биохимии / В.И. Степуро // под редакцией А.П. Солодкова и А. А. Чиркина, . 2010, УО «ВГУ им. П.М. Машерова»: Витебск. р. 28–58.
95. Степуро, И.И. Антиоксидантные свойства витаминов и их комплексов с белками крови / И.И. Степуро // Вопросы медицинской химии. — 1992. — Т. 38. — №. 3. — С. 26–33.
96. Степуро, И.И. Воздействие свободных радикалов на сывороточный альбумин / И. И. Степуро // Альбумин сыворотки крови в клинической медицине/под ред. ЮА Грызунова и ГЕ Добрецова. — М.: ГЭОТАР. — 1998. — С. 187–201.
97. Степуро, И.И. Образование карбонильных производных тиамин в реакциях, катализируемых миоглобином, в присутствии пероксида водорода / И.И. Степуро, С.А. Лабор, В. И. Степуро // сборник материалов научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию кафедры нормальной физиологии ГрГМУ «Актуальные вопросы физиологии». — 2019. — С.232–235.
98. Строение продукта трансформации тиохрома / Д.А. Опарин [и др.]. // Химия природных соединений. — 1985. — №. 5.
99. Строение продукта фотохимического окисления тиохрома / Д.А. Опарин [и др.]. // Химия природных соединений. — 1989. — №. 4. — С. 585–596.
100. Структура и люминесцентные свойства пировиноградной кислоты в водных растворах / И.Б. Заводник [и др.]. // Журнал физ. химии. — 1984. — Т. 8. — №. 4. — С. 929–932.
101. Тиамин — эффективная ловушка синглетного кислорода и ингибитор образования дитиозинового межбелкового сшивков / С.А. Лабор [и др.]. // Материалы I Беллорусского Биохимического Конгресса. — 2016. — Т. 2. — С. 206–213.
102. Тиамин ингибирует образование пероксидов триптофана и пероксидов триптофанильных остатков белков, вызванных действием ультрафиолета на триптофан и белки / И. И. Степуро [и др.]. // материалы республиканской конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения В.А. Бандарина. — 2019. — Т. 2. — С.100–102.
103. Тиамин ингибирует образования дитиозина и межбелковых дитиозинового сшивков, вызванных действием ультрафиолета солнечного излучения на тирозин и белки / С.А. Лабор [и др.]. // Республиканская научно-практическая конференция, Актуальные проблемы медицины. — 2014. — Т. 2.
104. Тиаминная активность оксоферрильных форм миоглобина / И.И. Степуро [и др.]. // журнал Известия НАН Беларуси, серия биологических наук. —2018. — Т. 63. — №. 2. — С. 176–187.
105. Тиаминная активность оксоферрильных форм миоглобина / С.А. Лабор [и др.]. // Известия НАН Беларуси, серия биологических наук. — 2018. — Т. 63. — №. 2. — С. 176–187.
106. Титов, В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. Определение нитрита и нитрозосоединений в биосистемах каталазным методом / В.Ю. Титов, Ю.М. Петренко, А.Ф. Ванин // Биофизика. — 2010. — №. 1. — С. 95–106.
107. Фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода витаминами группы В / А.А. Солодунов [и др.]. // Журн. прикл. спектроскопии. — 1995. — Т. 7. — №. 6. — С. 122–127.
108. Фотосенсибилизированное окисление пиридоксаль-5-фосфата / Т.П. Гайко [и др.]. // Доклады АН БССР. — 1981. — Т. 21. — №. 6. — С. 565–567.
109. Фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиамин в водных растворах при воздействии ультрафиолета и видимого излучения / С.А. Лабор [и др.]. // Известия НАН Беларуси, серия биологических наук. — 2020. — Т. 65. — №. 2. — С. 199–211.
110. Чайковская, Н.А. Восстановление метгемоглобина и ферри-цитохрома с гликозилированными аминокислотами и альбумином / Н.А. Чайковская // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — №. 9. — С. 1130–1136.
111. Чайковская, Н.А. Образование NO при взаимодействии нитрита с гликозилированными аминокислотами и альбумином / Н.А. Чайковская // Биохимия. — 1999. — Т. 64. — №. 1. — С. 106–110.
112. Чайковская, Н.А., Водоевич, В.П., Виноградов, В.В. Восстановление нитрита гликозилированными аминокислотами и гликозилированным сывороточным альбумином / Н.А. Чайковская, В.П. Водоевич, В.В. Виноградов // Биохимия. — 1999. — Т. 64. — С. 106–110.

113. Яковлева, Ф.М., Гайко, Т.П. Изучение роли ароматических аминокислот в активности дрожжевой пируватдекарбоксилазы / Ф.М. Яковлева, Т.П. Гайко // Известия АН БССР, серия биол. — 1979. — №. 1. — С. 75–79.

114. Ярошевич, Н.А., Янчуревич А.С. Роль  $\epsilon$ -аминогруппы остатков лизина сывороточного альбумина человека в процессах тепловой денатурации белка. Повышение стабильности гликозилированного и алкилированного альбумина к нагреванию / Н.А. Ярошевич, А.С. Янчуревич // Молекул. Биология. — 1988. — Т. 22. — №. 2. — С. 466–472.

115. Acceleration of transformation of thyl radicals to disulfides by methemoglobin. Antioxidant function of methemoglobin / I. Stepuro [et al.] // J. Current. Topics Biophys. — 1994. — Vol. 18. — №. 2.

116. Detection of nitrite and nitroso compounds in chemical systems and biological liquids by the calorimetric method / V.Y. Titov [et al.] // J. Biophys. — 2010. — Vol. 55. — №. 1. — P. 77–86.

117. Fluorescent and photochemical properties of stable adducts of pyridoxal phosphate and other carbonyl compounds with haemoglobin and human serum albumin / Solodunov A.A. [et al.] // J. Current Topics in Biophys. (supplement). — 1996. — Vol. 20. — P. 125–132.

118. Formation of NO under action of UV and visible light on S-nitroso compounds / I. Stepuro [et al.] // J. Light Optic. Biomed. — International Society for Optics and Photonics. — 2001. — Vol. 4515. — P. 54–58.

119. Generation of NO during oxidation of hemoglobin ferroforms by nitrite / I.I. Stepuro [et al.] // J. Biochem. — 1997. — Vol. 62. — №. 9. — P. 960–966.

120. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin / I. Stepuro [et al.] // J. Pharmacol. — 1994. — Vol. 46. — №. 6. — P. 601–607.

121. Interaction of ethanol with blood proteins / Yu.M. O. [et al.] // Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement. — 1987. — Vol. 1. — P. 283–287.

122. Kinetic studies of oxygenation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits within pyridoxal 5'-phosphate derivatives of human hemoglobin / S.V. Lepeshkevich [et al.] // J. Molecul. Structur. — 2005. — Vol. 735. — P. 307–313.

123. Konovalova, N., Solodunov, A., Tyshchenko, A. Non-enzymatic covalent modification of Human Hemoglobin by pyridoxal-P under the action of visible light / N. Konovalova, A. Solodunov, A. Tyshchenko // J. Molecul. Biology. — 1993. — Vol. 27. — №. 4. — P. 483–487.

124. Laser kinetic spectroscopy studies of the reaction of human hemoglobin with molecular oxygen / B.M. Dzhabarov [et al.] // 5th International Conference on Laser Applications in Life Sciences. — International Society for Optics and Photonics. — 1995. — Vol. 2370. — P. 232–241.

125. Mechanism of Oxidation of Thiamine and its Phosphate Esters in Pseudoperoxidase Reaction Catalyzed by Metmyoglobin in the Presence of Paracetamol and Tyrosine / S.A. Labor [et al.] // International Conference «Smart Bio». — 2017. — P. 118.

126. Molecular oxygen binding with  $\alpha$  and  $\beta$  subunits within the R quaternary state of human hemoglobin in solutions and porous sol-gel matrices / S.V. Lepeshkevich [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. — 2009. — Vol. 1794. — №. 12. — P. 1823–1830.

127. Molecular oxygen binding with  $\alpha$  and  $\beta$  subunits within the R quaternary state of human hemoglobin in solutions and porous sol-gel matrices / S.V. Lepeshkevich [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. — 2009. — Vol. 1794. — №. 12. — P. 1823–1830.

128. 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.

129. Oxidized derivatives of thiamine: formation, properties, biological role / I. Parkhomenko [et al.]. // UBJ. — 1999. — Vol. 84. — №. 6. — P. 5–24.
130. Photolysis of thiamine by UV light / I. Stepuro [et al.] // VI International conference «chemistry, structure and function of biomolecules». — 2018. — P. 63–65.
131. Reduction of methemoglobin and ferricytochrome c by glycosylated amino acids and albumin / I.I. Stepuro [et al.]. // J. Biochem. — 1997. — Vol. 62. — №. 9. — P. 967–972.
132. S-Nitrosoglutathione formation at gastric pH is augmented by ascorbic acid and by the antioxidant vitamin complex, Resiston / V.I. Stsiapura [et al.] // Pharmaceutical biology. — 2018. — Vol. 56. — №. 1. — P. 86–93.
133. Stepuro, I.I. Thiamine and vasculopathies / I.I. Stepuro // Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. — 2005. — Vol. — 72. — №. 2. — P. 115–127.
134. Stepuro, I.I., Stepuro, V.I., Chaukovskaya, N.S. Schiff bases of S-nitrosocysteine and other S-nitrosocompounds as nitric oxide (NO) donors / I.I. Stepuro, V.I. Stepuro, N.S. Chaukovskaya // Emerging Therapeutic Targets. — 1998. — Vol. 2. — №. 2. — P. 261–264.

**Список научных сотрудников, работающих/работавших в составе лаборатории биофизики:**

1. Степуро И.И. (заведующий сектором молекулярной биофизики), Агейко С.А. (научный сотрудник); Адамчук Р.И., Алексеева С.Ф., Арцукевич А.Н., Барановская Е.А., Весалович Н., Заводник И.Б., Игнатенко В.А., Кашко М.Ф., Кондаков В.И., Коновалова Н.В., Козловская Л.М., Лапшина Е.А., Мороз А.Р., Михно Т.Л., Наумов А.В., Опарин А.Ю., Пилецкая Т.П., Силяневич И.С., Соколовская С.И., Солодунов А.А., Степуро А.И., Чайковская Н.А., Яковлева Н.Ф., Янчуревич А.С.

**VITABOLONICS. BIOCHEMICAL PROPERTIES OF OXIDATIVE TRANSFORMATION PRODUCTS OF VITAMINS AND COENZYMES AND THEIR ROLE IN CELL METABOLISM**

---

*Stepuro I.I.<sup>1</sup>, Ageiko S.A.<sup>1</sup>, Stepuro V.I.<sup>2</sup>, Smirnov V.Yu.<sup>3</sup> Yantsevich A.V.<sup>4</sup>*

*<sup>1</sup>Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus*

*<sup>2</sup>Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus*

*<sup>3</sup>Grodno State Medical University, Grodno, Belarus*

*<sup>4</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *This work deals with research and analysis of noncoenzyme properties of B group vitamins and their metabolites, as well as products of their oxidative transformation and degradation.*

*The experimental results showed that vitamins, their metabolites, oxidized derivatives of vitamins and coenzymes, as well as fragments of vitamin molecules had biochemical properties unrelated to the coenzyme function. These are the antioxidant properties of thiamine and its oxidation products, thiochrome and oxodihydrothiochrome, as well as the antioxidant properties of B6 vitamins, the signal function of thiamine molecules that is associated with release of nitrogen monoxide from physiologic depositions of the organism under the action of the thiol form of thiamine. Our research suggested that carbonyl-containing derivatives formed during photolysis of thiamine diphosphate exposed either to UVB region ultraviolet or affected by the oxoferryl forms of hemoproteins had*

*properties of anticonzymes, induced inhibition of thiamine-dependent processes and, in fact, participated in regulation of cell metabolism as signal molecules in processes of superoxide generation. It was shown that thiamine inhibited singlet oxygen-induced dityrosin cross-links in crystallines of the eye. Possible involvement of riboflavin and oxidized forms of thiamine in regulation of circadian rhythms and the visual process is also discussed. Fluorescence spectral methods of molecular spectroscopy, HPLC and mass spectroscopy were used to prove that in the presence of riboflavin, thiamine was oxidized by visible light to yield carbonyl-containing products, oxodihydrothiochrome, oxothiochrome and 2,3 oxothiamine. It was shown that these products of thiamine transformation were stable to UVA radiation, absorbed in the same spectral region as kynurenin and could probably play a role of an ultraviolet filter in the eye retina and lens. It was established that modification by pyridoxal-P of the amino group of the N-end of the polypeptide hemoglobin  $\beta$ -chain increased the P value by 50% and probably enhanced oxygen saturation of body tissues.*

*It was also shown that survival of animals increased after administration of pyridoxal-P.*

## ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИТОХРОМА С И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ И В ОТСУТСТВИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

*Степура И.И.,<sup>1</sup> Завадская В.М.<sup>1</sup>, Агейко С.А.<sup>1</sup>, Степура В.И.,<sup>2</sup> Янецвич А.В.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Государственное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», г. Гродно, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Государственное предприятие «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** Тиамин в присутствии цитохрома с и  $H_2O_2$  окисляется в последовательных реакциях до тиохрома ( $m/z=262,0882$ ), оксодигидротиохрома ( $m/z=278,0839$ ), оксотиохрома ( $m/z=276,0672$ ) и 2,3-оксотиамина ( $m/z=295,0856$ ). Кроме того, в небольших количествах образуется тиаминдисульфид. Мы предполагаем, что в гемовом кармане оксоферрильной формы цитохрома с (соединение 1) молекула тиамин окисляется в тиохром вследствие протекания двухэлектронной реакции с участием двух окислительных центров — оксоферрильного комплекса гема  $Fe(IV=O)$  и  $\pi$ -катион радикала порфирина. Образовавшийся тиохром, затем окисляется другой макромолекулой цитохрома с, которая находится в оксоферрильной форме (соединение 1) в оксодигидротиохром, также вследствие протекания реакций взаимосвязанного двухэлектронного переноса. Тиохром, в отличие от тиамин, обладает планарной структурой и легко проникает в гемовый карман оксоферрильной формы цитохрома с. Скорость окисления тиохрома в оксодигидротиохром почти на два порядка выше нежели скорость окисления тиамин в тиохром. Оксодигидротиохром испытывает дальнейшие превращения под действием оксоферрильных форм цитохрома с. После длительной инкубации тиамин в смеси с цитохромом с и пероксида водорода, оксодигидротиохром, оксотиохрома ( $m/z=276,0672$ ) и 2,3-оксотиамина ( $m/z=295,0856$ ) были основными продуктами окисления тиамин, а тиохром присутствовал в небольших количествах. Имидазол связываясь в гемовом кармане блокирует доступность железа оксоферрильного комплекса гема. В присутствии имидазола окисление тиамин в тиохром, а тиохрома в оксодигидротиохром, вследствие протекания двухэлектронных реакций, не происходит. Протекания двухэлектронных реакций, характерных для тиамин не наблюдали для его фосфорных эфиров. Ни ТМФ, ни ТДФ не окислялись оксоферрильной формой цитохрома с в соответствующие тиохром-фосфаты или оксодигидротиохром-фосфаты.

Показано, что окисление тиамин и его фосфорных эфиров в тиохром и соответствующие тиохром-фосфаты сопряжено с окислением фенолов в пероксидазной реакции, катализируемой цитохромом с. Парацетамол и другие монофенольные соединения увеличивали выход тиохрома и тиохром фосфатов на 1-2 порядка.

Увеличение выхода тиохрома и ингибирование образования оксодигидротиохрома фенольными соединениями в пероксидазной реакции, катализируемой цитохромом с, сопровождалось уменьшением образования димеров тирозина или димеров других монофенольных соединений.

Полученные результаты позволяют предположить, что окисление тиохрома в оксодигидротиохром, 2,3-оксотиамина в последовательных двух электронных реакциях, а также псевдо-

пероксидазное окисление тиамин, сопряженное с окислением парацетамола, тирозина может выступать в качестве фактора, препятствующих накоплению токсичной оксоферрильной формы  $\text{Cyt}c^{+}\text{Fe}(\text{IV}=\text{O})$ , способствовать элиминации пероксида водорода и восстанавливать функцию ЭТЦ в условиях гипоксии. В то же время процесс восстановления оксоферрильной формы цитохрома *c*, вероятно, будет сопровождаться уменьшением содержания свободного тиамин в тканях. В этих условиях тиамин выступает в качестве «жертвенного» антиоксиданта.

**Введение.** Цитохром *c* — это глобулярный гемопроtein (13 кДа), который локализован на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий и участвует в дыхании, перенося электроны от комплекса III электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) на цитохромоксидазу, что сопровождается изменением его степени окисления [3]. Выход цитохрома *c* из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму запускает процесс апоптоза, активируя цитоплазматические сериновые протеазы, что и приводит клетку к гибели [4].

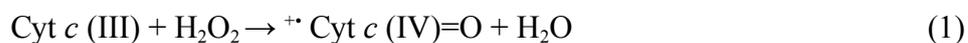
Цитохром *c* не реагирует с кислородом, окисью углерода, например, не взаимодействует с нитритом в нейтральной среде и имеет спектры поглощения типичные для ферри- и ферропорфириновых комплексов, пятое и шестое координационное положение которых занято лигандами сильного поля [5]. В ходе рентгеноструктурных исследований было показано, что железо связано с атомом серы тиозэфирной группы метионина - 80, расположенного с одной стороны плоскости гема и имидазольной группой гистидина-18, расположенного по другую сторону плоскости гемового комплекса [5,6].

В то же время, если координационная связь между ионом железа и атомом серы тиозэфирной группы метионина ослабевает или разрушается, например, вследствие окисления остатка метионина [7,8] или вследствие взаимодействия цитохрома *c* с анионными фосфолипидами [9], то может образоваться пентакоординационная структура. Если атом железа в цитохроме *c* имеет пентакоординационную структуру и шестое координационное положение не занято лигандом, то происходит восстановление нитрита до монооксида азота. В этом случае цитохром *c* с пентакоординационной структурой атома железа функционирует как нитритредуктаза [10].

Цитохром *c* в присутствии пероксида водорода обладает псевдопероксидазной активностью и окисляет органические молекулы [11].

Цитохром *c* в присутствии пероксида водорода способен окислять глутатион, аскорбат и НАДН, инициирует в митохондриях процессы перекисного окисления липидов [12].

В реакции между ферри-цитохромом *c* и пероксидом водорода в результате двух электронного окисления образуется  $^{+}\text{Cyt}c\text{Fe}(\text{IV}=\text{O})$  (соединение I) с радикалом, локализованным на порфириновом цикле и молекула воды.

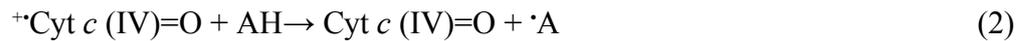


Один эквивалент окислителя расходуется на образование оксоферрильной формы гема  $\text{Fe}(\text{IV}=\text{O})$ , а другой эквивалент окислителя расходуется на образование порфиринового катиона  $\pi$ -радикала [11].

В отсутствие легкоокисляющихся субстратов АН, являющихся донорами электронов, происходит быстрый перенос электронов с аминокислотных остатков тирозина на порфирин-радикал с образованием короткоживущих тирозильных радикалов, которые аутоокисляются в долгоживущие орто-семихиноновые радикалы тирозина [13,14].

Следовательно, под действием низкомолекулярных доноров АН или вследствие переноса электрона с аминокислотных остатков белка на порфириновый цикл происходит образование

соответственно  $\text{Cyt } c(\text{IV})=\text{O}$  (соединение II) или  $\text{Cyt } c(\text{IV})=\text{O}^*$  оксоферрильной формы с радикалом локализованным на белковой глобуле:



Гидроксильные радикалы не образуются при взаимодействии пероксида водорода с цитохромом *c* [11,13,12].

Свободные радикалы, локализованные на аминокислотных остатках белковой глобулы, могут окислять молекулы веществ, для которых, из-за стерических причин невозможно непосредственное взаимодействие с ионом железа гема или порфириновым радикалом.

Оксоферрильная форма с радикалом, локализованным на белковой глобуле  $\text{Cyt } c(\text{IV})=\text{O}^*$ , является фактически промежуточной формой между соединением I и соединением II.

При образовании оксоферрильной формы цитохрома *c* происходит потеря связи катиона железа гема с метионином-80, в результате чего нарушается транспорт электронов между комплексом III и комплексом IV [7].

Ранее показано, что цитохром *c* в присутствии пероксида водорода способен окислять тиамин с образованием тиохрома и оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида. Тиамин (или витамин  $\text{B}_1$ ) является важнейшим незаменимым фактором питания и с момента своего открытия известен как соединение предотвращающее развитие бери-бери [15]. Более поздние исследования показали, что фосфорилированная форма тиамин, тиаминдифосфат (ТДФ) является коэнзимом таких важнейших ферментов энергетического метаболизма, как пируватдегидрогеназа и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа. ТДФ также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла [16,17,18]. Кроме ТДФ в организме всегда содержится свободный тиамин и его фосфорные эфиры ТМФ, ТТФ, которые выполняют также и собственные некоферментные функции, играют важную структурную роль, взаимодействуют с клеточными мембранами и увеличивают их стабильность [19]. Как известно, тиамин и трифосфат тиамин ответственны за передачу нервных импульсов, участвуют в регуляции проницаемости  $\text{Na}$ -каналов в нервной ткани [20,21,22]. Кроме того, тиамин не только улучшает метаболические процессы в мозгу у пациентов с болезнью Альцгеймера [23], а также с синдромом Вернике-Корсакова [24,19], но и снижают повреждения клеточных структур [25], выступают в качестве антиоксидантов, например, в нервной ткани, снижая ее повреждение при окислительном стрессе [27,26]. Повреждение нервной ткани сопровождается усилением синтеза оксида азота, протеканием реакций нитрования тирозина с образованием 3-нитротирозина на фоне дефицита тиамин [26,2]. В последнее время, наряду с выяснением механизмов основных реакций, в которых каталитическую роль играет ТДФ, стали накапливаться данные о высокой биологической активности некоферментных метаболитов тиамин, а также продуктов окислительной трансформации тиамин и его фосфорных эфиров [28,29,19]. Сравнительно недавно показано, что тиольная форма тиамин высвобождает из состава S-нитрозоглутатиона оксид азота, который вызывает релаксацию сосудов [30].

Хотя антиоксидантная способность тиамин пока ещё полностью не охарактеризована, ряд экспериментальных фактов свидетельствуют о том, что тиамин может выступать в качестве антиоксиданта при окислительном и нитрозильном стрессе [31,28,32].

Тиамин (особенно бенфотиамин) предотвращает повреждение сосудов при сахарном диабете, предупреждает развитие нефропатий, снижает уровень токсических продуктов неэнзиматического гликозилирования белков [33,34]. Защитные свойства тиамин при сахарном диабете

нельзя объяснить только его коферментными свойствами, влиянием на метаболизм  $\alpha$ -кетокислот и карбонильных соединений. Действительно, тиамин, его фосфорные эфиры ингибируют образование конечных продуктов гликозилирования белков также в опытах *in vitro*. В этом случае ингибирование неэнзиматического гликозилирования белков тиаминотом происходит в отсутствие ферментов [31]. Одним из возможных механизмов защитного действия тиаминот является его взаимодействие с пероксинитритом и диоксидом азота с образованием тиохрома и оксодигидротиохрома [31,35]. Рассматривая антиоксидантный потенциал тиаминот необходимо оценивать не только суммарный антиоксидантный эффект минорных форм тиаминот — трициклической и тиольной, но и продуктов окислительной трансформации тиаминот — тиохрома и оксодигидротиохрома. Предполагается, что гидрофобный метаболит тиаминот — тиохром может выполнять важную антиоксидантную функцию в защите клеточных структур от повреждающего действия активных форм азота и кислорода [31]. Минорная трициклическая форма тиаминот легко окисляется диоксидом азота в тиохром, который затем, в свою очередь окисляется диоксидом азота в оксодигидротиохром. В конечном итоге, одна молекула тиаминот, которая находится в трициклической форме, восстанавливает четыре молекулы диоксида азота в нитрит [35].

Равновесная концентрация трициклической формы тиаминот очень низка, поэтому и выход тиохрома очень мал при воздействии, например, пероксида водорода на водные растворы тиаминот, в отсутствие гемопротеинов. Воздействие на тиамин пероксинитрита в нейтральной среде также не сопровождается заметным образованием тиохрома. Низкие равновесные концентрации минорной трициклической формы тиаминот обеспечивают его сохранность, предохраняют от быстрого окисления в тиохром и оксодигидротиохром [31]. Однако оксоферрильные формы гемопротеинов в сопряженных реакциях с фенольными соединениями вызывают резкое увеличение выхода окисленных производных тиаминот, в первую очередь тиохрома [36]. Оксоферрильные формы гемопротеинов, а также пероксидазы, такие как лактопероксидаза, глутатионпероксидаза играют важнейшую роль в образовании тиохрома и других окисленных производных тиаминот [37]. Растворимость тиохрома в гидрофобной среде примерно в 100 раз выше, нежели растворимость тиаминот. Поэтому даже низкие концентрации тиохрома способны оказать защитный эффект на клеточные мембраны. Мы предполагаем, что гидрофобные продукты окисления тиаминот и продукты окисления его некоферментных форм, например, тиохром монофосфат или тиохромтрифосфат могут являться дополнительными «резервными антиоксидантами», усиливая антиоксидантное действие минорных форм тиаминот — тиольной и трициклической. Антиоксидантное действие тиохрома и оксодигидротиохрома, вероятно, проявляется только при возрастании уровня диоксида азота, тирозильных и феноксильных радикалов, в том числе долгоживущих тирозильных радикалов белков, при длительном окислительном стрессе, сопровождающимся недостатком низкомолекулярных антиоксидантов. Предварительный анализ имеющихся экспериментальных результатов позволяет заключить, что окисление тиаминот, сопряженное с окислением монофенольных соединений в реакциях, катализируемых гемопротеинами, в присутствии пероксидов является одним из источников образования тиохрома и дисульфида тиаминот в живых организмах [38].

Целью работы является изучение реакций пероксидазного окисления тиаминот, катализируемого цитохромом *c* в присутствии пероксида водорода.

Мы показали, что цитохром *c* из сердца лошади в присутствии пероксида водорода не только окисляет тиаминот до тиохрома, но также эффективно (в отличие от других гемопротеинов) окисляет тиохром до оксодигидротиохрома.

В данной работе мы также показали, что благодаря протеканию реакций псевдопероксидазного окисления парацетамола (или других монофенольных соединений), сопряженных с окислением тиамин, обеспечивается восстановление оксоферрильной формы цитохрома *c* до феррицитохрома, который, вероятно, снова может участвовать в транспорте электронов. Полученные результаты позволяют предположить, что псевдопероксидазное окисление тиамин, сопряженное с окислением парацетамола, салициловой кислоты, тирозина может выступать в качестве фактора, препятствующего накоплению токсичной оксоферрильной формы  $Cytc^{+}Fe(IV=O)$ , способствовать элиминации пероксида водорода в межмембранном пространстве митохондрий. Скорость восстановления оксоферрильной формы цитохрома *c* тиохромом в ферри-форму, почти на два порядка выше нежели скорость восстановления оксоферрильной формы тиамин.

**Материалы и методы.** В работе использовали тиамин, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат, тиохром, парацетамол (ацетаминофен, N-ацетил-п-аминофенол), салициловая кислота, ферри-цитохром *c*, трет-бутилгидропероксид (Сигма, США); аминокислоты L- и D-тирозин, феррицианид и гемин (Fluka, США). Все другие реагенты высокой очистки производства России и Беларуси. Концентрацию пероксида водорода определяли спектрофотометрически, по поглощению при  $\lambda$  - 353 нм, используя коэффициент молярной экстинкции  $2,64 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Концентрацию тиохрома и оксодигидроциохрома определяли флуоресцентным методом. При pH 7,5 тиохром и оксодигидроциохром имеют максимумы поглощения 365 нм и 340 нм соответственно, максимумы флуоресценции при 450 и 440 нм, соответственно [35]. Определение концентрации тиаминдисульфида проводили после инкубации с избытком глутатиона и последующего окисления образовавшегося тиамин щелочным феррицианидом [35]. Образование дитирозина контролировали спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{315} = 5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , pH=7,5, а также флуоресцентным методом. Возбуждение флуоресценции проводили при длине волны 315 нм, а интенсивность флуоресценции измеряли при 410 нм [39]. Спектрально-флуоресцентными методами и методом восходящей бумажной хроматографии определяли продукты трансформации тиамин и фенольных соединений [40]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary-100, флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Aminco-Bowman.

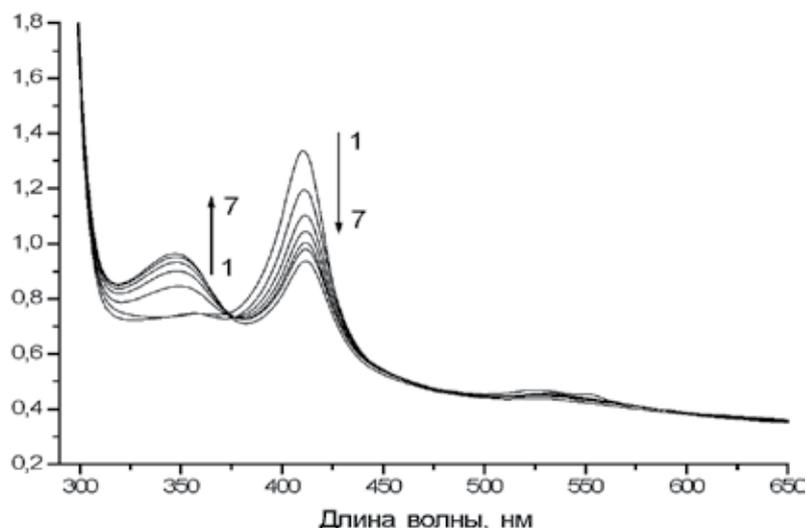
**Результаты. Окисление тиамин в оксодигидроциохром и тиаминдисульфид под действием цитохрома *c* и пероксида водорода. Спектрально-флуоресцентные методы измерения продуктов окисления тиамин.**

После смешивания ферри-цитохрома *c* с пероксидом водорода в спектре поглощения смеси тиамин с ферри-цитохромом *c* наблюдали образование новой полосы поглощения с максимумом в области 340-350нм, принадлежащей продуктам окисления тиамин.

Разделение продуктов окисления тиамин методом восходящей хроматографии на бумаге свидетельствует о том, что в инкубационной смеси главным образом находится оксодигидроциохром и тиаминдисульфид, а тиохром присутствует в небольшом количестве. Тиаминдисульфид не обладает заметной флуоресценцией. Концентрацию продуктов окисления тиамин, образованных после инкубации тиамин с цитохромом *c* и пероксидом водорода, определяли спектрально-флуоресцентными методами (таблица 1).

В таблице 2 приведены структурные формулы тиамин и его продуктов окислительной трансформации в пероксидазных реакциях, катализируемых цитохромом *c* — тиохрома, оксодигидроциохрома и тиамин-дисульфида.

D



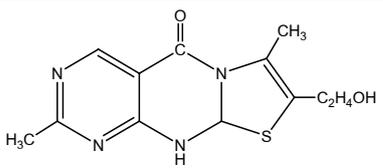
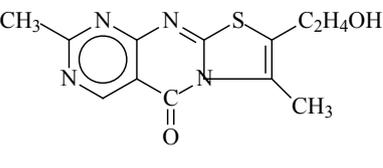
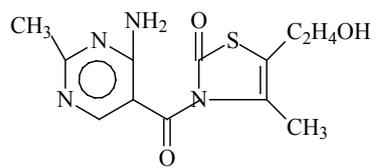
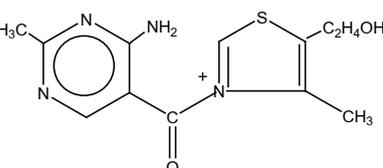
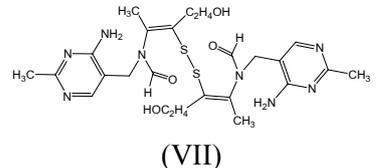
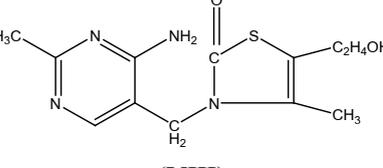
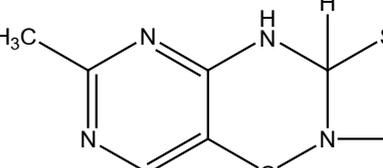
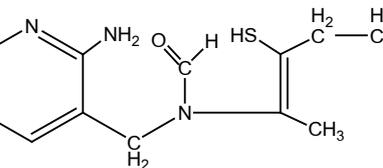
**Рисунок 1** — Изменение спектров поглощения водных растворов смеси цитохрома *c* с тиаминном и пероксидом водорода в зависимости от времени инкубации. Спектры поглощения (1-7) записаны с интервалом 5 мин. Концентрация цитохром *c* (10 мкМ), тиамина (1,0 мМ) и  $H_2O_2$  (0,2 мМ).

**Таблица 1** — Выход продуктов окисления тиамина в пероксидазной реакции катализируемой цитохромом *c* в зависимости от концентрации тиамина

Состав раствора	Выход ОДТ- Chr (мкМ)	Выход TChr (мкМ)	Выход TSST (мкМ)
Сyt c (10мкМ) + Тиамин (0,05мМ) + $H_2O_2$ (0,2 мМ)	0,60	0,05	-
Сyt c (10мкМ) + Тиамин (0,1мМ) + $H_2O_2$ (0,2 мМ)	1,4	0,11	1,7
Сyt c (10мкМ) + Тиамин (0,2мМ) + $H_2O_2$ (0,2 мМ)	2,5	0,15	2,5
Сyt c (10мкМ) + Тиамин (0,5мМ) + $H_2O_2$ (0,2 мМ)	5,0	0,20	10,5
Сyt c (10мкМ) + Тиамин (1мМ) + $H_2O_2$ (0,2 мМ)	8,0	0,25	22,0

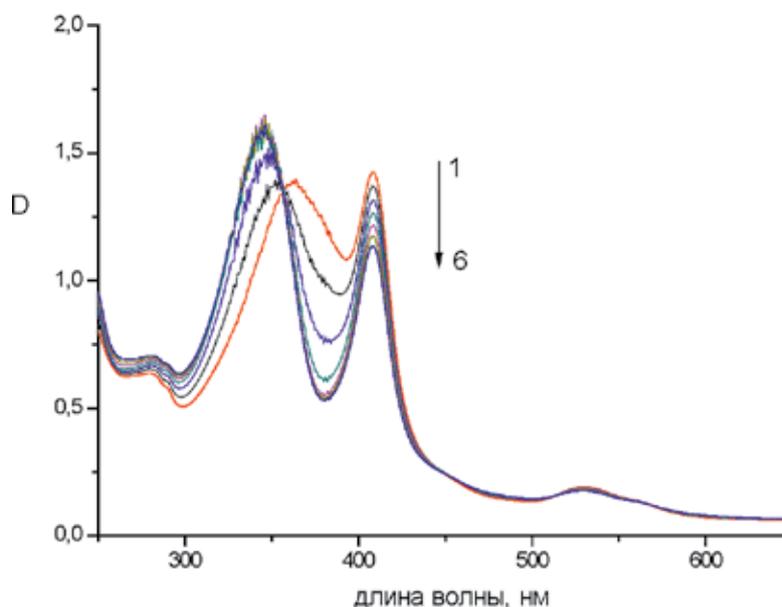
**Таблица 2** — Структурные формулы тиамина, продуктов окислительной трансформации тиамина и величины  $m/z$  их молекулярных ионов

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	$m/z$ молекулярных ионов, относ.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%)
Тиохром (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%)

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	m/z молекулярных ионов, относ. интенсивность
<p>Оксидигидротиохром (ODTChr)</p> <p>Массы:</p> <p><math>M_0=278,0837</math> (81,7 %)</p> <p><math>M_1=279,0863</math> (12,6 %)</p> <p><math>M_2=280,0819</math> (4,9 %)</p>	 <p>(III)</p>	<p>279,091 <math>[M_0+H]^+</math> (100%)</p> <p>280,094 <math>[M_1+H]^+</math> (14%)</p>
<p>Оксотиохром (охо-ТChr)</p> <p>Массы:</p> <p><math>M_0=</math> (81,7 %) 276,0681</p> <p><math>M_1=277,0707</math> (12,6 %)</p> <p><math>M_2=278,0662</math> (4,9 %)</p>	 <p>(IV)</p>	<p>277,076 <math>[M_0+H]^+</math></p> <p>278,0777 <math>[M_1+H]^+</math></p>
<p>2,3-оксотиамин (2,3-охо-Т)</p> <p><math>M_0=</math> (81,54 %) 294,0787</p> <p><math>M_1=</math> (12,64 %) 295,0813</p> <p><math>M_2=</math> (5,06 %) 296,077</p>	 <p>(V)</p>	<p>295,0856 <math>[M_0+H]^+</math></p> <p>(100%)</p>
<p>3-оксотиамин (3-оксо-Т)</p>	 <p>(VI)</p>	<p><math>m/z=279,1084</math> <math>[M]^+</math></p>
<p>Тиаминдисульфид (TSST)</p> <p>Массы:</p> <p><math>M_0=562,2144</math> (66,8 %)</p> <p><math>M_1=563,2170</math> (20,7 %)</p> <p><math>M_2=564,2137</math> (9,6 %)</p>	 <p>(VII)</p>	<p>563,219 <math>[M_0+H]^+</math> (100%)</p> <p>564,2226 <math>[M_1+H]^+</math> (23%)</p>
<p>Тиамин-тиазолон</p> <p><math>M_0=</math> (81,78 %) 280,0994</p> <p><math>M_1=</math>(12,64 %) 281,1020</p> <p><math>M_2=</math>(5,06 %) 282,0974</p>	 <p>(VIII)</p>	<p><math>m/z=280,09926</math> <math>[M_0]^+</math></p> <p><math>m/z=281,106</math> <math>[M_0+H]^+</math></p>
<p>Трициклическая форма тиамин</p> <p>(3-CT)</p>		
<p>Тиольная форма тиамин</p> <p>(TSH)</p>		

Под действием ферри-формы цитохрома *c* и пероксида водорода образовавшийся тиохром эффективно превращается в оксодигидротиохром. Как видно из рисунка 2, максимум поглощения тиохрома сдвигается в коротковолновую сторону. Максимум поглощения продукта окисления тиохрома лежит при 342 нм. Методом бумажной хроматографии было показано, что продукт окисления тиохрома полученный под действием пероксида водорода и цитохрома *c* имеет такое же значение  $R_f$  что и химически синтезированный оксодигидротиохром. Суммарный спектр поглощения продуктов окисления тиохрома для любых промежутков времени характеризуется наличием четкой изобестической точки и хорошо соответствует двум компонентам с полосами поглощения при 365 нм, принадлежащей тиохрому, и соединению *c* полосой, имеющей максимум при 442 нм, принадлежащей оксодигидротиохрому (рисунок 2).

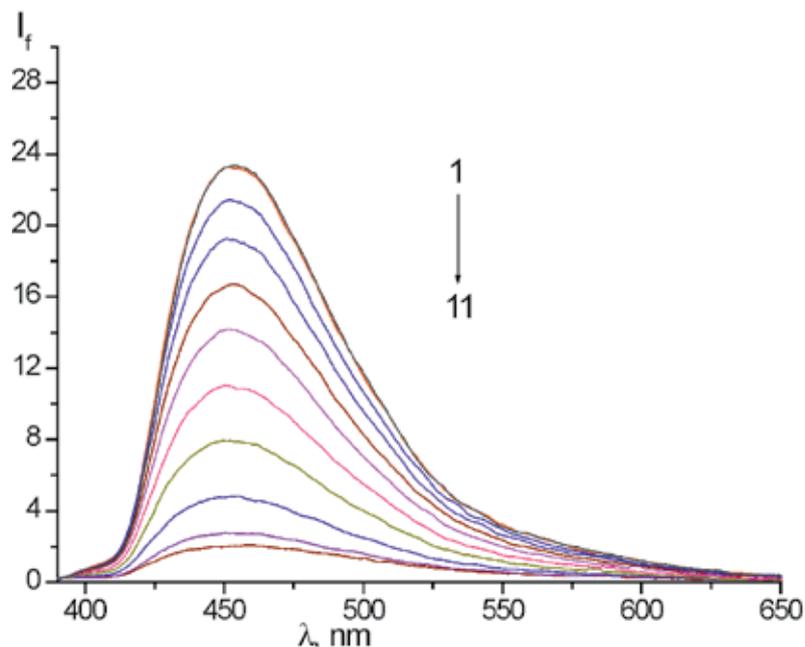
После продолжительной инкубации можно достичь того, что в растворе содержится практически только оксодигидротиохром, а тиохром присутствует в следовых количествах. Квантовый выход флуоресценции оксодигидротиохрома более чем на порядок ниже, нежели у тиохрома, поэтому окисление тиохрома в оксодигидротиохром сопровождается падением интенсивности флуоресценции и коротковолновым сдвигом максимума флуоресценции (рисунок 3).



**Рисунок 2 — Изменение спектров поглощения тиохрома после инкубации с цитохромом *c* и пероксидом водорода. Спектры поглощения (1-6) записаны с интервалом 5 мин. Концентрация цитохрома *c* (10 мкМ), тиохрома (50 мкМ) и  $H_2O_2$  (0,2 мМ).**

Спектр флуоресценции сильно перекрывается со спектром флуоресценции тиохрома. Максимум в спектре возбуждения оксодигидротиохрома лежит при 340 нм, а максимум флуоресценции при 440 нм. Поэтому регистрировать оксодигидротиохром флуоресцентным методом, в присутствии сильно флуоресцирующего тиохрома, трудно. Напротив, присутствие оксодигидротиохрома практически не сказывается на интенсивности флуоресценции тиохрома, если использовать для возбуждения длины волн 370 нм или больше.

После гельфильтрации смеси, содержащей цитохром *c*, тиамин и пероксид водорода на колонке, заполненной сефадексом G-25, наблюдали выход тиохрома и оксодигидротиохрома отдельными пиками (рисунок 4). Соотношение концентраций образовавшихся продуктов окисления тиамина тиохром — оксодигидротиохром составляет 1:50 соответственно после 30 минут инкубации реакционной смеси.



**Рисунок 3 — Изменение интенсивности флуоресценции тиохрома в процессе его окисления цитохромом *c*. Концентрация цитохрома  $c$   $10^{-5}$  М, тиохром  $5 \cdot 10^{-5}$  М,  $H_2O_2$   $10^{-4}$  М. Спектры флуоресценции записаны с интервалом 3 мин.**

Тиохром с высокой скоростью окисляется в присутствии цитохрома *c* и пероксида водорода (рисунок 2 и 3). Поэтому даже в условиях высоких концентраций тиамин в растворе (1,0 мМ и выше) происходит окисление большей части образовавшегося тиохрома в оксодигидро-тиохром. Поэтому можно предположить, что тиохром очень эффективно проникает в гемовый карман оксоферрильной формы цитохрома *c*. Только в присутствии 200-кратного молярного избытка тиамин по отношению к концентрации тиохрома в растворе равновесная концентрация тиохрома в растворе практически не изменялась. В этих условиях наблюдается стационарное состояние, когда скорость окисления тиамин в тиохром равна скорости окисления образовавшегося тиохрома в оксодигидро-тиохром.

Для доказательства того, что взаимодействие тиохрома происходит с оксоферрильным комплексом гема и, следовательно, тиохром входит в гемовый карман макромолекулы цитохрома *c* мы использовали ингибирование реакции имидазолом.

Как известно, имидазол встраивается в гемовый карман цитохрома *c* и плоскость встроенного имидазола — лиганда практически параллельна имидазолу проксимального гистидина и их плоскости составляют угол примерно 7-8 градусов. Замена аксиального лиганда метионин-80 на экзогенный имидазол не только затрудняет вход в карман молекул-субстратов, но также вызывает значительные конформационные изменения боковых аминокислотных остатков со стороны дистального лиганда [40].

Высокие концентрации имидазола практически полностью ингибировали окисление тиамин в оксодигидро-тиохром. Оксодигидро-тиохром был основным продуктом после инкубации раствора тиамин с цитохромом *c* и пероксидом водорода. Имидазол практически полностью ингибировал окисление тиохрома в оксодигидро-тиохром (таблица 3). На рисунке 5 показана кинетика окисления тиохрома в оксодигидро-тиохром под действием ферри-формы цитохрома *c* и пероксида водорода в присутствии и в отсутствие имидазола.

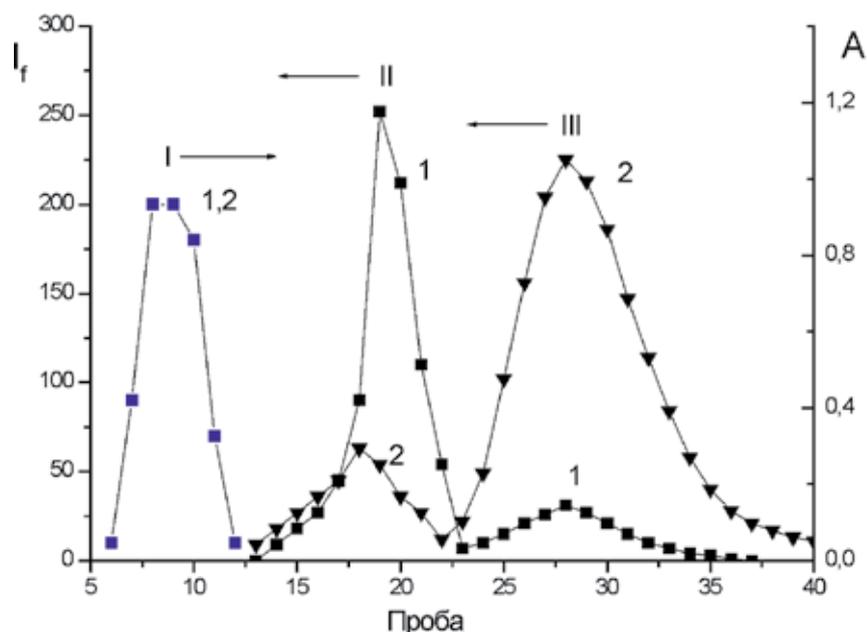


Рисунок 4 — Хроматографическое разделение инкубационной смеси, содержащей цитохром *c* тиамин - пероксид водорода-(1) и смеси содержащей цитохром *c* — тиамин, тирозин, пероксид водорода (2) на сефадексе G-25. Растворы (1) и (2) инкубировали 30 мин., затем каждый раствор (объем 1,0 мл.) наносили на колонку с сефадексом G-25. Концентрация цитохрома *c* составляла 10 мкМ, тиамина, пероксида водорода и тирозина 1,0 мМ. Элюцию проводили 0,05 М натрий фосфатным буфером. Объем фракций 3 мл. Интенсивность флуоресценции тиохрома регистрировали при 450 нм (возбуждение 365 нм), интенсивность флуоресценции оксидигидроцитохрома регистрировали после экстракции бутанолом. I-ый пик-принадлежит цитохрому *c*, II-ой пик принадлежит оксидигидроцитохрому, III-ий пик принадлежит тиохрому. \*Примечание: квантовые выходы флуоресценции тиохрома в воде и оксидигидроцитохрома в бутаноле практически совпадают. Поэтому площади пиков II и III пропорциональны концентрациям оксидигидроцитохрома и тиохрома соответственно.

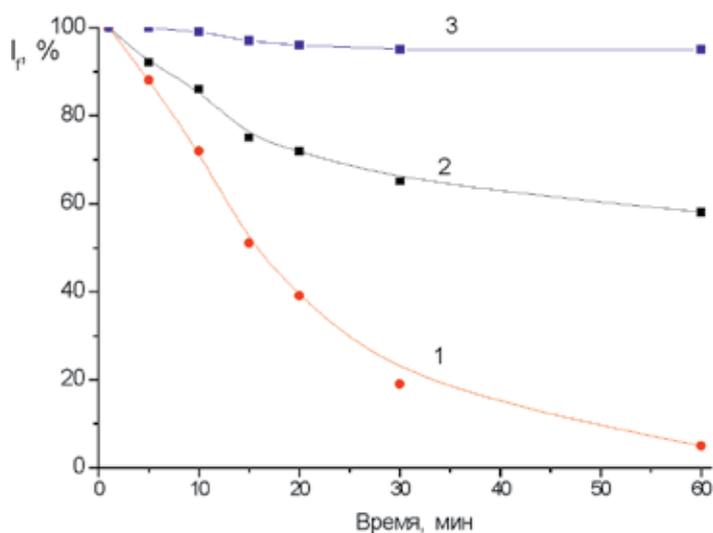


Рисунок 5 — Кинетика убыли флуоресценции тиохрома (Tx) в водном растворе в процессе инкубации: кривая 1 - цит *c* (10 мкМ) + TChr ( $5 \cdot 10^{-6}$  М) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 мМ); кривая 2 - цит *c* (10 мкМ) + TChr ( $5 \cdot 10^{-6}$  М) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 мМ); кривая 3 - цит *c* (10 мкМ) + TChr ( $5 \cdot 10^{-6}$  М) + имидазол + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 мМ) в %. Концентрация имидазола 10 мМ.

Имидазол встраиваясь в гемовый карман полностью перекрывает доступ к железу. Однако порфириновое кольцо гема частично находится на поверхности макромолекулы и доступно для других реагентов. Поэтому окисление ряда соединений, таких как тирозин, парацетамол, в присутствии имидазола может происходить под действием свободных радикалов, локализованных на порфирине гема или на аминокислотных остатках белковой глобулы.

Действительно, окисление тирозина, с образованием дитирозина, в присутствии имидазола, снижается лишь на 25-30% (таблица 3). Так как в присутствии имидазола взаимодействие тирозина может происходить только с порфириновым циклом, то можно полагать, что и в отсутствие имидазола тирозин взаимодействует главным образом с радикалами локализованным на порфириновом цикле.

**Таблица 3 — Выход продуктов окисления тиамин, тиохрома и тирозина в пероксидазной реакции катализируемой цитохромом *c* в присутствии и в отсутствие имидазола. Концентрация цитохрома *c* 10 мкМ.**

Состав раствора	ОДТх (мкМ)	Тх (мкМ)	Дитирозин (мкМ).
Сyt <i>c</i> (10мкМ) + Тиамин (1,0 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2 мМ)	8,0	0,22	
Сyt <i>c</i> (10мкМ) + Тиамин (1мМ) +имидазол + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2 мМ)	0,1	0,25	
Сyt <i>c</i> (10мкМ) + Тиохром ( 50 мкМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2 мМ)	49,0	1.0	
Сyt <i>c</i> (10мкМ) + Тиохром ( 50 мкМ) + имидазол +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2 мМ)	0,5	49,5	
Сyt <i>c</i> (10мкМ) + Тирозин (1,0 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2 мМ)			35,2
Сyt <i>c</i> (10мкМ) + Тирозин (1,0 мМ) +имидазол + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,2 мМ)			23,7

Таким образом, имидазол связываясь с ионом железа в активном центре ингибирует реакцию окисления тиамин в тиохром, а также реакцию окисления тиохрома в оксодигидро-тиохром. Реакция окисления тиамин в тиохром, а затем тиохрома в оксодигидро-тиохром протекает вследствие двуэлектронного окисления в результате которого происходит взаимосвязанный перенос электронов от тиамин на оксоферрильный катион и порфириновый радикал или соответственно от тиохрома на оксоферрильный катион и порфириновый радикал. В присутствии высоких концентраций имидазола окисление тиамин в тиохром протекает только с участием свободных радикалов порфирина и тирозильных радикалов макромолекулы цитохрома *c*. Окисление тиамин в тиохром, в этом случае, происходит, вследствие, последовательного протекания двух- одноэлектронных реакций с участием свободных радикалов, которые центрированы на атомах углерода порфиринового кольца или атомах углерода тирозильных остатков макромолекулы цитохрома *c* (таблица 3, третья строка сверху).

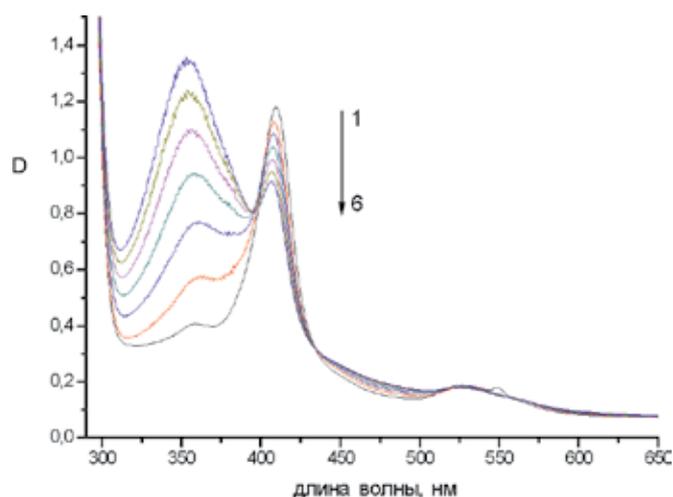
Ни свободные радикалы порфирина, ни тирозильные радикалы цитохрома *c* не окисляют тиохром в оксодигидро-тиохром. Выход оксодигидро-тиохрома после инкубации тиамин с ферри-формой цитохрома *c* и пероксида водорода присутствии имидазола был очень низок (таблица 5, вторая строка сверху). Тиамин окисляется в этом случае, главным образом, в тиохром (таблица 1). В присутствии фенольных соединений выход тиохрома возрос после инкубации ферри-цитохрома *c* с тиамин и пероксидом водорода (таблица 4).

Фенольные соединения выступают в роли челноков, обеспечивая перенос электронов от тиольной и трициклической форм тиамин до оксоферрильного комплекса гема (реакции 4,5,7,8). При достаточно высокой концентрации тиамин (больше 5 мМ) образования дитирозина не наблюдали. В этих условиях тирозильные радикалы полностью восстанавливаются до молекул тирозина вследствие окисления тиамин в тиохром. Следовательно, фенольные соединения (тирозин, парацетамол) не только увеличивают скорость окисления тиамин в тиохром, но также ингибируют образование оксодигидро-тиохрома.

**Таблица 4 — Изменение выхода тиохрома, оксодигидро тиохрома и степени деградации гема после инкубации тиамин с цитохромом *c*, пероксидом водорода и фенольными соединениями в присутствии или отсутствии имидазола. Концентрация тиамин, парацетамол, тирозина 1 мМ, концентрация пероксида водорода, 0,2 мМ. концентрация имидазола 5 мМ, концентрация цитохрома *c* -10 мкМ. Время инкубации 30 минут**

№ п/п	Состав растворов	ТChг мкМ	ОдТх мкМ	Степень деградации гема(%)
1	Cyt <i>c</i> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	25
2	Cyt <i>c</i> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + имидазол	-	-	2
3	Cyt <i>c</i> +Т+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,22	8,0	24
4	Cyt <i>c</i> +Т+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + имидазол	0,10	-	2
5	Cyt <i>c</i> +Т	0,00	-	-
6	Cyt <i>c</i> +Т+L-Тур +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30,5	14,0	21
7	Cytc+Т+ L-Тур + имидазол+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20,1	-	2
8	Cyt <i>c</i> +Т+парацетамол +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	42,4	-	18
9	Cyt <i>c</i> +Т+ парацетамол +имидазол +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20,0	-	2

После инкубации водных растворов цитохрома с тиамин, и пероксида водорода в присутствии тирозина в высоких концентрациях- 2 мМ и выше, наблюдали образование продуктов окисления тиамин, поглощающих с максимумом при 360-365 нм, характерным для тиохрома (рисунок 6). В отсутствие тирозина (рисунок 1) или при низких концентрациях тирозина максимум продуктов окисления тиамин лежит при 340-350 нм. Изменение выхода тиохрома и оксодигидро тиохрома в зависимости от концентрации тирозина представлено в таблице 5. Высокие концентрации тирозина, парацетамол или фенола сильно ингибируют образование оксодигидро тиохрома (рисунок 4, кривая 2). Концентрация оксодигидро тиохрома снижется в несколько раз, а выход тиохрома растет (таблица 6). При высоких концентрациях тирозина окисление тиамин останавливается на стадии тиохрома Т→ТChг. В этих условиях, основными продуктами реакции, являются тиохром, ТДС, а также димеры тирозина. При изменении концентрации парацетамол наблюдали аналогичные закономерности выхода продуктов окисления тиамин.



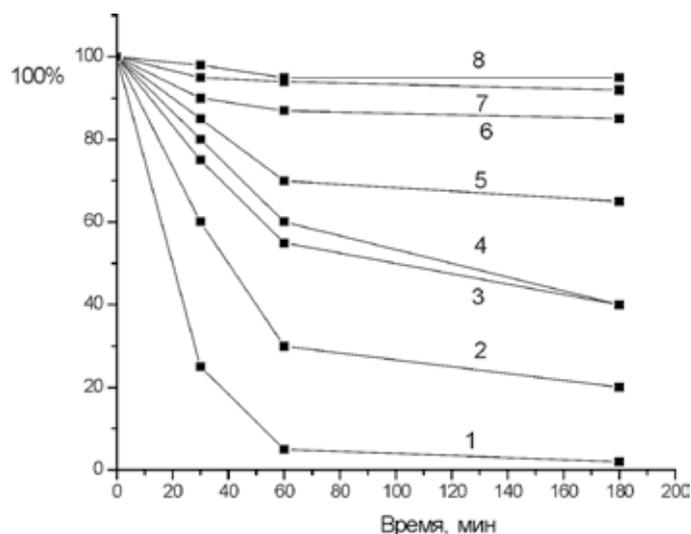
**Рисунок 6 — Изменение спектров поглощения растворов, содержащих цитохром *c*, тиамин, тирозин и пероксид водорода в зависимости от времени инкубации после инкубации с цитохромом *c*. Спектры поглощения (1-7) записаны с интервалом 5 мин. Концентрация цитохрома *c* (10 мкМ), тирозина и тиамин 1,0 мМ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2 мМ). Тх-40, ОдТх-14.**

**Таблица 5 — Изменение выхода тиохрома и оксодигидро тиохрома в пероксидазной реакции окисления тиамин, катализируемой цитохромом *c*, в зависимости от концентрации тирозина в растворе. Время инкубации растворов 30 мин. Концентрация тиамин 1 мМ, концентрация цитохрома *c* 10 мкМ, концентрация пероксида водорода 0,2 мМ**

Состав раствора	Выход ОДТх (мкМ)	Выход Тх (мкМ)	Выход дитирозина (мкМ)
Cyt <i>c</i> + Тиамин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,0	0,45	
Cyt <i>c</i> + Тиамин +Тирозин (0,02 мМ)+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9,0	3,0	-
Cyt <i>c</i> + Тиамин +Тирозин (0,1 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	19	9,0	0,4
Cyt <i>c</i> + Тиамин +Тирозин (0,2 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	31	13,5	1,2
Cyt <i>c</i> + Тиамин +Тирозин (0,5 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	36	23,0	2,8
Cyt <i>c</i> + Тиамин + L-тир. (1мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16	34,0	4,8
Cyt <i>c</i> + Тиамин + Тирозин(2мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8	43,0	5,4
Cyt <i>c</i> + Тиамин +Тирозин (4 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4	47,0	6,0
Cyt <i>c</i> + L-тир.(1 мМ)+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			36,0

Тиохром в свою очередь ингибировал образование димеров тирозина. Ингибирование тиохромом образования дитирозина, а с другой стороны, ингибирование тирозином образования оксодигидро тиохрома свидетельствует, что тиохром, во- первых, проникает в гемовый карман оксоферрильной формы цитохрома *c*, во-вторых, между тирозином и тиохромом наблюдаются конкурентные взаимоотношения за взаимодействие с оксоферрильным комплексом гема Fe(IV=O) и свободным радикалом порфирина. На рисунке 7 представлена кинетика убывания флуоресценции тиохрома (Тх) в процессе инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5\*10<sup>-4</sup>М) и цитохромом в присутствии фенолов и глутатиона. Окисление тиохрома в оксодигидро тиохром и окисление фенольных соединений фактически являются параллельно протекающими реакциями. Поэтому скорости этих реакций пропорциональны концентрациям образовавшихся продуктов. Глутатион только при концентрации 1 мМ ингибировал скорость окисления тиохрома в концентрации 5 мкМ наполовину. Парацетамол наиболее эффективно восстанавливал оксоферрильную форму цитохрома *c* в ферри-форму и наиболее эффективно ингибировал окисление тиохрома в оксодигидро тиохром. Как известно, имидазол встраивается в гемовый карман, и вероятно, этим и вызвано ингибирование имидазолом окисление тиохрома. Равновесная константа связывания имидазола с оксоферрильной формой цитохрома *c* составляет согласно нашим оценкам 1,2\*10<sup>3</sup>М<sup>-1</sup>.

Таким образом, мы показали, что спектрально-флуоресцентными методами можно надежно регистрировать продукты окислительной трансформации тиамин - тиохром и оксодигидро тиохром, полученные после инкубации тиамин с цитохромом *c* и пероксидом водорода только в начальные, короткие промежутки времени инкубации. Более продолжительная инкубация растворов тиамин с пероксидом водорода и цитохромом *c* приводит к, практически, полному окислению тиамин и тиохрома с образованием оксодигидро тиохрома, поглощающего в области 340 нм и продуктов, поглощающих в коротковолновой области спектра поглощения. Следует отметить, что регистрировать продукты окислительной трансформации тиамин, поглощающие в более коротковолновой области, затруднительно, вследствие сильного перекрывания их полос поглощения. Поэтому для изучения молекулярной структуры и идентификации продуктов окисления тиамин, образованных в пероксидазных реакциях, катализируемых цитохромом *c*, мы наряду с спектрально-флуоресцентными методами использовали масс-спектрометрические измерения.

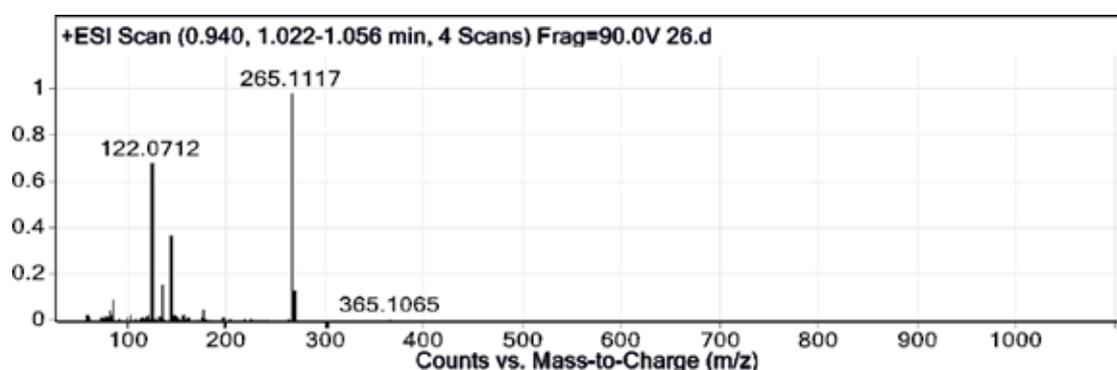


**Рисунок 7 — Кинетика убыли флуоресценции тиохрома (Тх) в процессе инкубации с цитохромом с и пероксидом водорода  $H_2O_2$  ( $5 \cdot 10^{-4}M$ ) - (1), - (2) кинетика убыли флуоресценции тиохрома в составе того же раствора + глутатион ( $10^{-4}M$ ) (3) - тот же состав раствора + глутатион ( $10^{-3}M$ ) (4) - тот же состав раствора + имидазол ( $10^{-3}M$ ) (5) тот же состав раствора + имидазол ( $2 \cdot 10^{-3}M$ ) (6) - тот же состав раствора + имидазол ( $5 \cdot 10^{-3}M$ ) (7) - тот же состав раствора + парацетамол ( $5 \cdot 10^{-5}M$ ) (8) — тот же состав раствора + парацетамол ( $10^{-3}M$ ). Исходная концентрация тиохрома 5 мкМ.**

**Измерение продуктов окисления тиамин, образовавшихся в псевдопероксидазной реакции катализируемой цитохромом с и пероксидом водорода, методами масс-спектрологии.**

Результаты спектрально-флуоресцентных измерений об образовании тиохрома и оксидигидроотиохрома хорошо подтверждаются данными масс-спектрологии.

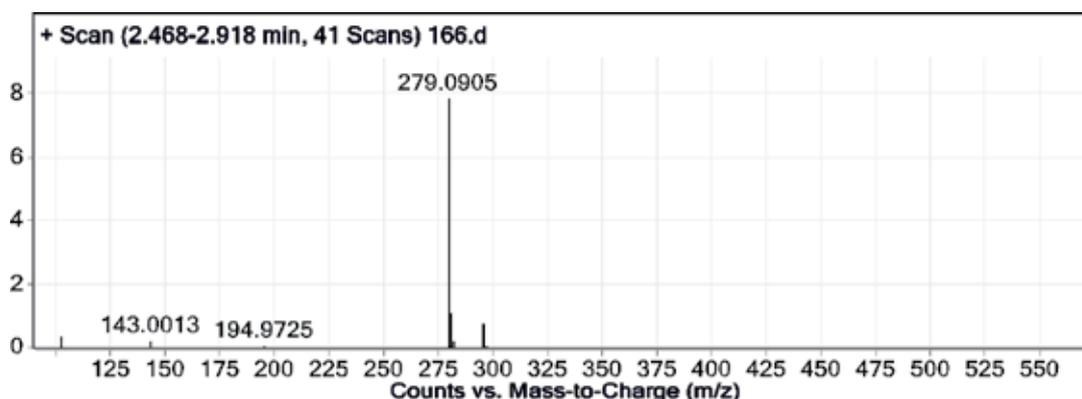
Масс-спектр исходного, тиамин представлен на рисунке 8. Обращает внимание тот факт, что в масс-спектре кроме молекулярного иона тиамин ( $m/z=265,1117$ ) присутствуют два наиболее интенсивные пики, а именно, пик с  $m/z=122,0712$  и пик с  $m/z=144,07$ , принадлежащие, соответственно, фрагменту аминопиримидинового и тиазолового компонента, образованных после расщепления связи C-N метиленового мостика. Эти два пика являются не только наиболее высокоинтенсивными, но и имеют наибольшую молекулярную массу среди фрагментов молекулы тиамин. Все остальные пики, присутствующие в масс-спектре тиамин в данной фракции, имеют меньшие значения молекулярной массы и являются более низкомолекулярными фрагментами этих двух ионов соответственно с  $m/z=122,07$  и  $m/z=144,07$



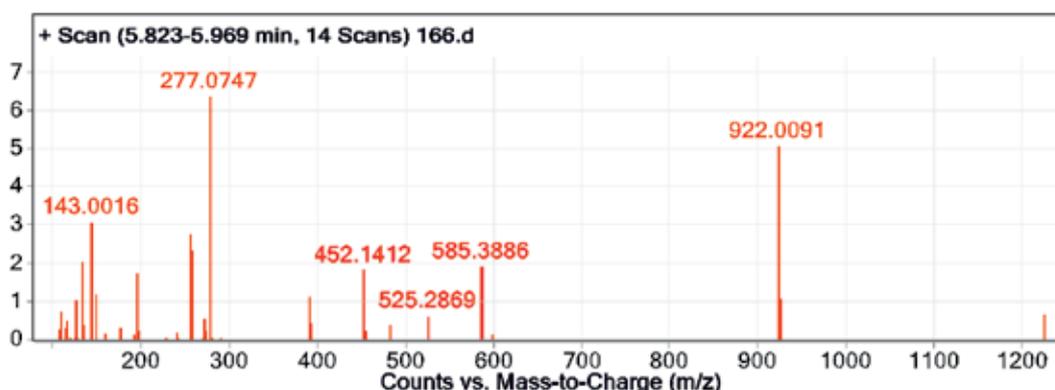
**Рисунок 8 — Масс-спектр тиамин. Метод ионизации ESI (электрораспыление). Пик с  $m/z=265.1117$  принадлежит молекулярному иону Т, пик с  $m/z=265,1117$ .**

На рисунках 8-10 приведен масс-спектры молекулярных ионов продуктов окисления тиамин после его инкубации с цитохромом *c* и пероксидом водорода. Продукт окисления тиамин выходит во фракции с *Rt* равным и имеет значение  $m/z=279,0905$  хорошо совпадающее со значением  $m/z$  для молекулярного иона химически синтезированного оксодигидротиохрома. После длительной инкубации водных растворов тиамин с цитохромом *c* и пероксидом водорода, содержание тиохрома в растворе было малым или вообще не регистрировалось (таблица 6). Масс-спектры свидетельствуют об образовании продуктов окисления тиамин со значениями  $m/z=295,0856$  и  $m/z=277,0747$  для их молекулярных ионов (рисунок 9 и 10). Эти значения  $m/z$  хорошо совпадают со значениями моноизотопных масс молекулярных ионов 2,3-охо-Т и также оксотиохрома (таблица 2).

Содержание тиамин-дисульфида, а также оксотиохрома и 2,3-охо-Т в растворе было малым. В качестве основного продукта регистрировали образование оксодигидротиохрома (рисунок 9, таблица 6).



**Рисунок 9** — Масс-спектр продуктов окисления тиамин, образовавшихся после инкубации его водных растворов в смеси с цитохромом *c*. Пик с  $m/z=279,0905$  принадлежит молекулярному иону ODTChr ( $[M_0+H]^+$ ), пик  $m/z=295,0856$   $[M_0+H]^+$  принадлежит молекулярному иону 2,3-охо-Т. Начальная концентрация Т в растворе равна 0,1мМ, концентрация пероксида водорода 1,0мМ, цитохрома *c* -5 мкМ. Время инкубации водных растворов цитохрома *c* Т и пероксидом водорода 20 часов.



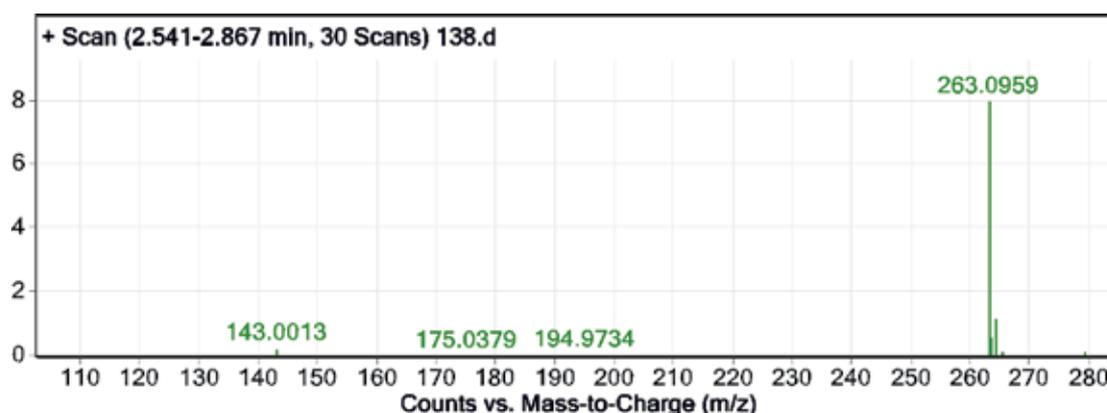
**Рисунок 10** — Масс-спектр продуктов окисления тиамин, образовавшихся после инкубации его водных растворов в смеси с цитохромом *c* и пероксидом водорода. Пик с  $m/z=277,076$  принадлежит протонированному моноизотопному молекулярному иону ( $[M_0+H]^+$ ), пик  $m/z=278,0777$  принадлежит протонированному изотопологу молекулярного иона оксотиохрома ( $[M_1+H]^+$ ). Начальная концентрация Т в растворе равна 0,1мМ, концентрация пероксида водорода 1,0мМ, цитохрома *c* -5 мкМ. Время инкубации водных растворов цитохрома *c* с Т и пероксидом водорода 20 часов.

**Таблица 6 — Выход продуктов окисления тиамин в пероксидазной реакции катализируемой цитохромом *c* в присутствии пероксида водорода. Концентрация цитохрома *c* 5 мкМ.**

Состав раствора и время воздействия UVA	T m/z= 265,111 [M <sub>0</sub> ] <sup>+</sup> m/z= 266,114 [M <sub>1</sub> ] <sup>+</sup>	TChr m/z=263, 096 [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup>	ODTChr m/z=279, 0905 [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup>	OTChr m/z=277, 076 [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup> m/z=278, 076 [M <sub>1</sub> +H] <sup>+</sup>	(2,3-охо-Т) [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup> m/z=295, 0856	TSST m/z=563, 221 [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup>
T (100 мкМ),	291811					
Cyt <i>c</i> (5мкМ) + Ти-амин (0,1мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1,0 мМ)	177 000	-	80 213	6391	8045	165

Тиохром также окисляется цитохромом *c* после инкубации с пероксидом водорода. На рисунке 11 представлен масс-спектр исходного тиохрома, метод ионизации *ESI* (электрораспыление).

В растворе тиохрома после инкубации с цитохромом *c* в присутствии пероксида водорода образуются протонированные молекулярные ионы 2,3-охо-Т [M<sub>0</sub>+H]<sup>+</sup> m/z=295,0856, ODTChr [M<sub>0</sub>+H]<sup>+</sup> (m/z=279,0911) и молекулярные ионы OTChr [M<sub>0</sub>+H]<sup>+</sup> (m/z=277,0750). Масс-спектры этих соединений представлены на рисунках 10-12. Структурные формулы этих соединений представлены в таблице 2, интенсивности пиков молекулярных ионов для продуктов окисления тиохрома суммированы в таблице 5. Полученные хроматографические фракции содержат или отдельные молекулярные ионы продуктов окисления тиохрома или как в случае представленном на рисунке 11. Смесь молекулярных ионов ODTChr ([M<sub>0</sub>+H]<sup>+</sup>), и молекулярному иону 2,3-охо-Т, 2,3-охо-Т значения m/z=279,0911 и m/z=295,0856, соответственно.

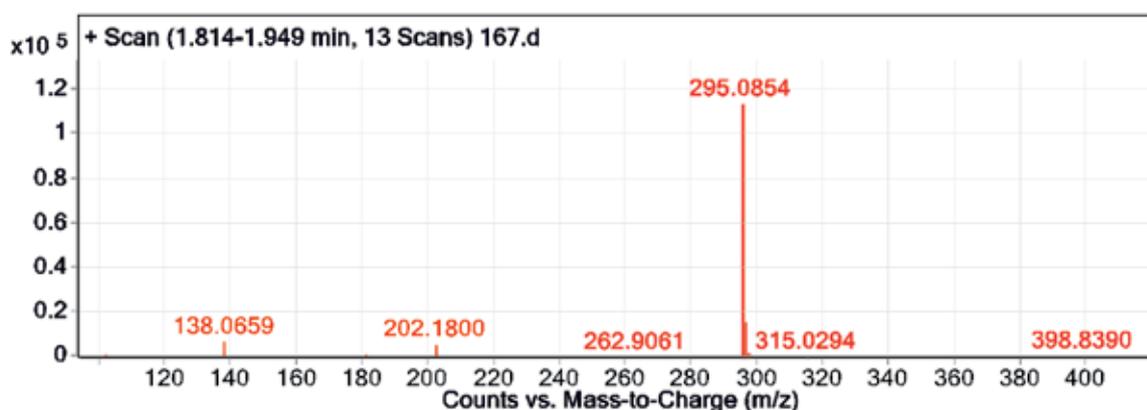


**Рисунок 11 — Масс-спектр тиохрома. Метод ионизации *ESI* (электрораспыление). Пик с m/z=263.0959 принадлежит молекулярному иону TChr [M<sub>0</sub>+H]<sup>+</sup>, пик с m/z=264,097 молекулярному иону TChr [M<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup>.**

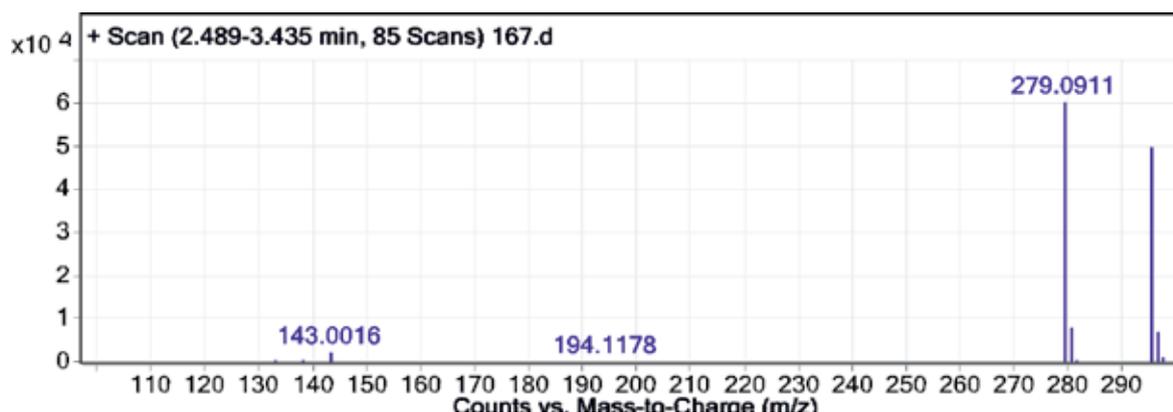
Следовательно, в растворе тиохрома после инкубации с цитохромом *c* в присутствии пероксида водорода образуются 2,3-охо-Т, оксидигидроотиохром и оксотиохром.

**Обсуждение результатов. Окисление тиамин в оксидигидроотиохром и тиаминди-сульфид под действием цитохрома *c* и пероксида водорода.**

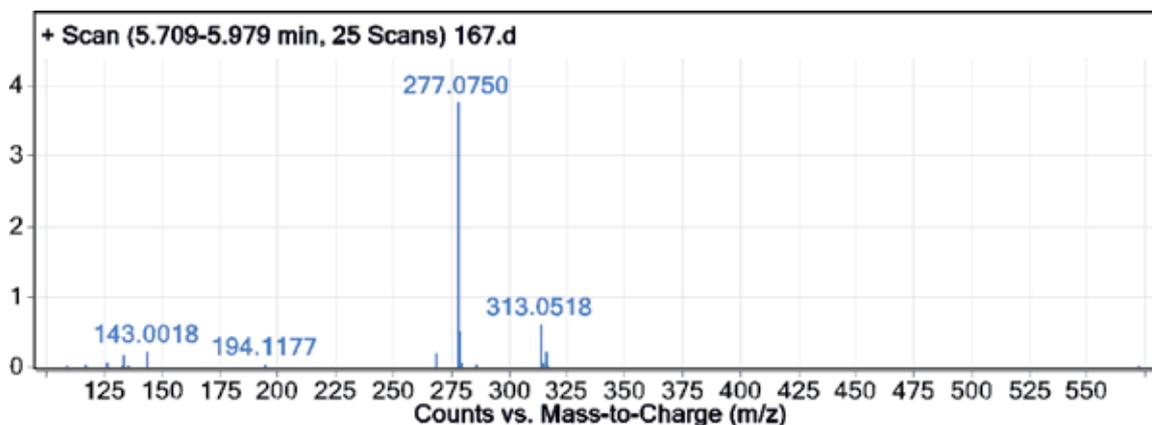
Данные рентгеноструктурного анализа кристаллов ферро-цитохрома *c* показывают, что гемовое железо полностью скоординировано. Четыре координационные связи заполнены азотными атомами гема, одно имидазольным азотом гистидина - 18 и одно атомом серы метионина 80. Вся плоскость гема глубоко погружена в гидрофобную область белковой глобулы. Поэтому внешние реагенты не имеют доступа к железу. Только один край плоскости гема находится на поверхности макромолекулы и доступен для других реагентов. Узкий канал обнаруживается с каждой стороны гема, но только очень малые гидрофобные молекулы, например, монооксид азота, могут проходить через него и связываться с железом, образуя комплексы с ферри-и ферро-формами цитохрома *c*. В реакции между ферри-цитохромом *c* и пероксидом водорода в результате двух электронного окисления образуется  $^{+}Cyt\ Fe(IV=O)$  (соединение I) с радикалом, локализованным на порфириновом цикле и молекула воды.



**Рисунок 12** — Масс-спектр продукта окисления тиохрома, образовавшихся после инкубации его водных растворов в смеси с цитохромом *c*. Пик с  $m/z=295,0856 [M_0+H]^+$  принадлежит молекулярному иону 2,3-охо-Т. Начальная концентрация тиохрома в растворе равна 0,1мМ, концентрация пероксида водорода 1,0мМ, цитохрома *c* -5 мкМ. Время инкубации водных растворов цитохрома *c* в смеси тиохромом и пероксидом водорода 20 часов.



**Рисунок 13** — Масс-спектр продуктов окисления тиохрома, образовавшихся после инкубации его водных растворов в смеси с цитохромом *c*. Пик с  $m/z=279,0905$  принадлежит молекулярному иону ODTChr ( $[M_0+H]^+$ ), пик  $m/z=295,0856 [M_0+H]^+$  принадлежит молекулярному иону 2,3-охо-Т. Начальная концентрация тиохрома в растворе равна 0,1мМ, концентрация пероксида водорода 1,0мМ, цитохрома *c* -5 мкМ. Время инкубации водных растворов цитохрома *c* с тиохромом и пероксидом водорода 20 часов.



**Рисунок 14** — Масс-спектр продуктов окисления тиохрома, образовавшихся после инкубации его водных растворов в смеси с цитохромом *c* и пероксидом водорода. Пик с  $m/z=277,076$  принадлежит протонированному моноизотопному молекулярному иону ( $[M_0+H]^+$ ), пик  $m/z=278,0777$  принадлежит протонированному изотопologue молекулярного иона оксотиохрома ( $[M_1+H]^+$ ). Начальная концентрация тиохрома в растворе равна 0,1мМ, концентрация пероксида водорода 1,0мМ, цитохрома *c* -5 мкМ. **Время инкубации водных растворов цитохрома *c* с тиохромом и пероксидом водорода 20 часов.**

**Таблица 7** — Выход продуктов окисления тиохрома в пероксидазной реакции катализируемой цитохромом *c* в присутствии пероксида водорода. Концентрация цитохрома *c* 5 мкМ, тиохрома 0,1мМ, пероксида водорода 1,0 мМ.

Состав раствора и время воздействия UVA	TChr $m/z=263,096$ $[M_0+H]^+$	ODTChr $m/z=279,0905$ $[M_0+H]^+$	OTChr $m/z=277,076$ $[M_0+H]^+$ $m/z=278,076$ $[M_1+H]^+$	(2,3-охо-Т) $[M_0+H]^+$ $m/z=295,0856$	TSST $m/z=563,221$ $[M_0+H]^+$
TChr (100 мкМ),	322000				
Cyt <i>c</i> (5 мкМ) + Тиохром(0,1 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 мМ)		60 503	37 957	202 133	

При образовании оксоферрильной формы цитохрома *c* происходит потеря связи катиона железа гема с метионином-80 [14], вследствие чего увеличивается доступность железа внешним реагентам, в том числе тиамину, тирозину и другим фенолам. Тиамин встраивается в гемовый карман оксоферрильной формы цитохрома *c*.

Под действием низкомолекулярных доноров АН, таких как тирозин, парацетамол, трициклическая и тиольная формы тиамин происходит восстановление — катион радикала порфирина.

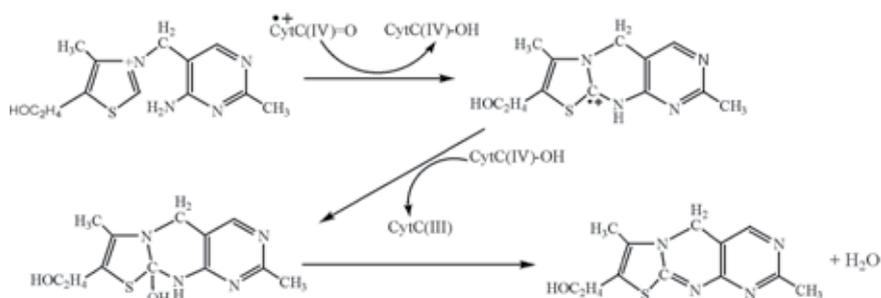
Вследствие протекания данных реакций\*\* Cyt Fe(IV=O) трансформируются в соединение II или Cyt *c*(IV)=O, а тиамин окисляется с образованием тиохрома и тиаминдисульфида соответственно. Фенолы — тирозин, парацетамол окисляются до тирозильных радикалов или феноксильных радикалов, которые дисмутируют с образованием соответствующих димеров.

Окисление тиамин в системе цитохром *c*/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сопровождается изменением спектров поглощения, как тиамин, так и цитохрома *c* (рисунок 1). Образовавшийся тиохром с высокой скоростью окисляется с образованием оксодигидротиохрома (рисунок 2 и 3). Оксодигидротиохром и тиохром, полученные после инкубации водных растворов тиамин был и разделены на отдельные компоненты на колонке с сефадексом.

Полученные результаты показывают, что микромолярные концентрации тиамин, и, особенно, тиохрома с высокой эффективностью взаимодействуют с оксоферрильной формой цитохрома *c* и восстанавливают ее в ферри-форму. Как видно из рисунка 7, даже в присутствии высоких концентраций глутатиона наблюдали окисление тиохрома в оксодигидротиохром, а, следовательно, восстановление оксоферрильной формы цитохрома *c* в ферри-форму. Аскорбиновая кислота также менее эффективно восстанавливала оксоферрильную форму цитохрома *c* нежели тиохром. Показано, что тиамин и продукт его окисления тиохром эффективно восстанавливают оксоферрильную форму цитохрома в ферри-форму.

Данные масс-спектропии также свидетельствуют об образовании оксодигидротиохрома после инкубации тиамин с цитохромом и пероксидом водорода в качестве основного продукта (рисунки 8-10). После длительной инкубации растворов тиамин в смеси с цитохромом *c* и пероксидом вообще не удалось определить тиохром. После длительной инкубации водных растворов тиохрома в смеси цитохромом *c* также наблюдали очень быстрое превращение тиохрома с образованием оксодигидротиохрома.

Суммируя результаты, полученные спектрально-флуоресцентным методом, а также методами масс-спектропии можно заключить, что молекула тиамин в результате двухэлектронного окисления превращается в тиохром, а оксоферрильная форма  $^{+2}\text{Cyt}c(\text{IV}=\text{O})$  (соединение 1) при этом восстанавливается до ферри-формы  $\text{Cyt}c(\text{III})$ . Мы предполагаем, что первоначально молекула тиамин в результате одноэлектронного окисления превращается в трициклический катион-радикал (рисунок 13), а оксоферрильная  $^{+2}\text{Cyt}c(\text{IV}=\text{O})$  при этом восстанавливается до  $\text{Cyt}c(\text{IV})=\text{O}$ . На втором этапе реакции происходит перенос протона на  $\text{Cyt}c(\text{IV}=\text{O})$  и образуется  $\text{Cyt}c(\text{IV})-\text{OH}$ . Затем происходит присоединение гидроксильного радикала к катион-радикалу тиамин и образование тиохрома. В свою очередь  $\text{Cyt}c(\text{IV})-\text{OH}$  восстанавливается до  $\text{Cyt}c(\text{III})$  (рисунок 15).

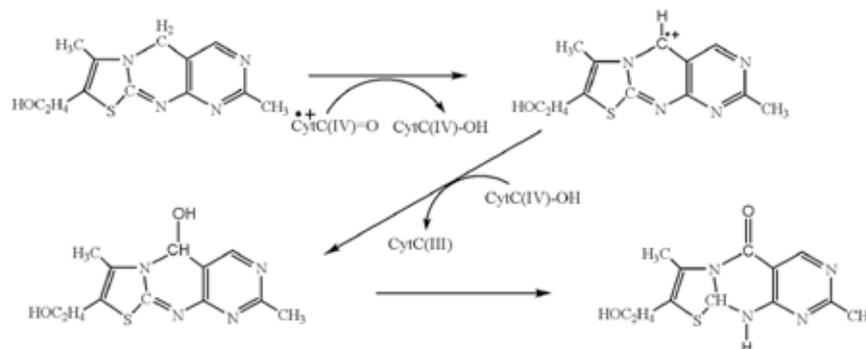


**Рисунок 15 — Предполагаемая схема окисления тиамин в тиохром в пероксидазной реакции, катализируемой цитохромом *c*.**

Тиохром под действием новой молекулы  $^{+2}\text{Cyt}c(\text{IV}=\text{O})$  окисляется до катион — радикала тиохрома, который после присоединения гидроксильного радикала по атому углерода метиленового мостика и внутримолекулярной перегруппировки образует оксодигидротиохром (рисунок 7). Оксоферрильная форма  $^{+2}\text{Cyt}c(\text{IV}=\text{O})$  (соединение 1) при этом восстанавливается до ферри-формы  $\text{Cyt}c(\text{III})$ .

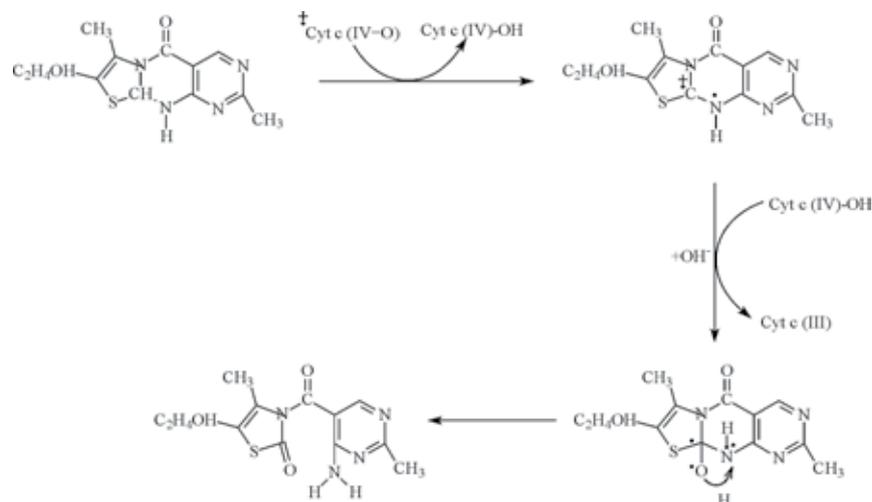
Скорость окисления тиохрома в оксодигидротиохром почти на два порядка выше, нежели скорость окисления тиамин в тиохром (таблица 1 и таблица 2), например, для концентрации тиамин и тиохрома 50 мкМ. Поэтому окисление тиохрома в оксодигидротиохром протекает с высокой скоростью также в присутствии высоких концентраций тиамин. В присутствии имидазола окисление тиамин в тиохром, а тиохрома в оксодигидротиохром, вследствие протекания

двухэлектронных реакций, не происходит. Имидазол связываясь в гемовом кармане блокирует доступность железа оксоферрильного комплекса гема. В присутствии имидазола окисление тиамин в тиохром, а тиохрома в оксидигидроотиохром, вследствие протекания двухэлектронных реакций, не происходит. Оксидигидроотиохром не является конечным продуктом окислительной трансформации тиамин и превращается под действием цитохрома с и пероксида водорода с образованием 2,3-оксо-Т. Структурная формула молекулярного иона 2,3-оксо-Т ( $m/z=295,0856[M_0+H]^+$ ) приведена в (таблице 2).



**Рисунок 16 — Предполагаемая схема окисления тиохрома в пероксидазной реакции, катализируемой цитохромом с.**

Мы предполагаем, что (молекула оксидигидроотиохрома в результате двухэлектронного окисления превращается в 2,3-охо-Т, а оксоферрильная форма  $^+Cyt c(IV=O)$  (соединение 1) при этом восстанавливается до ферри-формы  $Cyt c(III)$ . Мы предполагаем, что первоначально молекула оксидигидроотиохрома (в нейтральной или слабо-щелочной средах, диапазон значений рН 7,0-9,0) в результате одноэлектронного окисления превращается в трициклический катион-радикал, электронная плотность распределена между соседними атомом углерода и атомом азота (рисунок 17), а оксоферрильная  $^+Cyt c(IV)=O$  при этом восстанавливается до  $Cyt c(IV)=O$ . На втором этапе реакции происходит перенос протона на  $Cyt c(IV=O)$  и образуется  $Cyt c(IV)-OH$ . Затем происходит присоединение гидроксильного радикала к катион-радикалу тиамин и после внутримолекулярного переноса атома водорода и образование 2,3оксо-Т. В свою очередь  $Cyt c(IV)-OH$  восстанавливается до  $Cyt c(III)$  (рисунок 17).



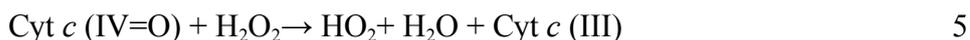
**Рисунок 17 — Предполагаемая схема окисления оксидигидроотиохрома в пероксидазной реакции, катализируемой цитохромом с.**

Имидазол встраиваясь в гемовый карман полностью перекрывает доступ к железу. Однако порфириновое кольцо гема частично находится на поверхности макромолекулы и доступно для других реагентов. Поэтому окисление внешних реагентов в присутствии имидазола может происходить под действием свободных радикалов, локализованных на порфирине гема или на аминокислотных остатках белковой глобулы, например, на тирозильных остатках. Поэтому следует ожидать ингибирования имидазолом двухэлектронных реакции окисления в которых участвуют оба окислительных центра — оксоферрильный комплекс гема и порфириновый  $\pi$ -радикал или одноэлектронных реакций в которых избирательно участвует оксоферрильный комплекс гема, что мы и наблюдаем.

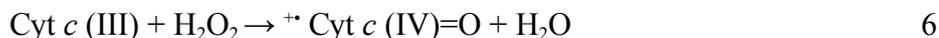
После добавления пероксида водорода к ферри-формам цитохрома *c* и последующей инкубации растворов мы наблюдали уменьшение поглощения при 408 нм (рисунок 1), что свидетельствует о раскрытии порфиринового кольца и разрушении гема. Ранее было показано, что гем в составе гемопroteинов разрушается под действием пероксидов, главным образом, вследствие протекания реакции с супероксид-анионами [27].



Образование супероксид-аниона происходит в гемовом кармане. Пероксид водорода взаимодействует с оксоферрильным комплексом гема  $\text{Fe(IV=O)}$  и восстанавливает его в ферриформу.



В отсутствие субстратов, доноров электронов, молекула пероксида водорода выступает для макромолекул метгемоглобин или метмиоглобин, а также для ферри-цитохром *c* в качестве двухэлектронного акцептора и образуется  $\cdot\cdot$  Cyt *c* (IV)=O или соединение I.



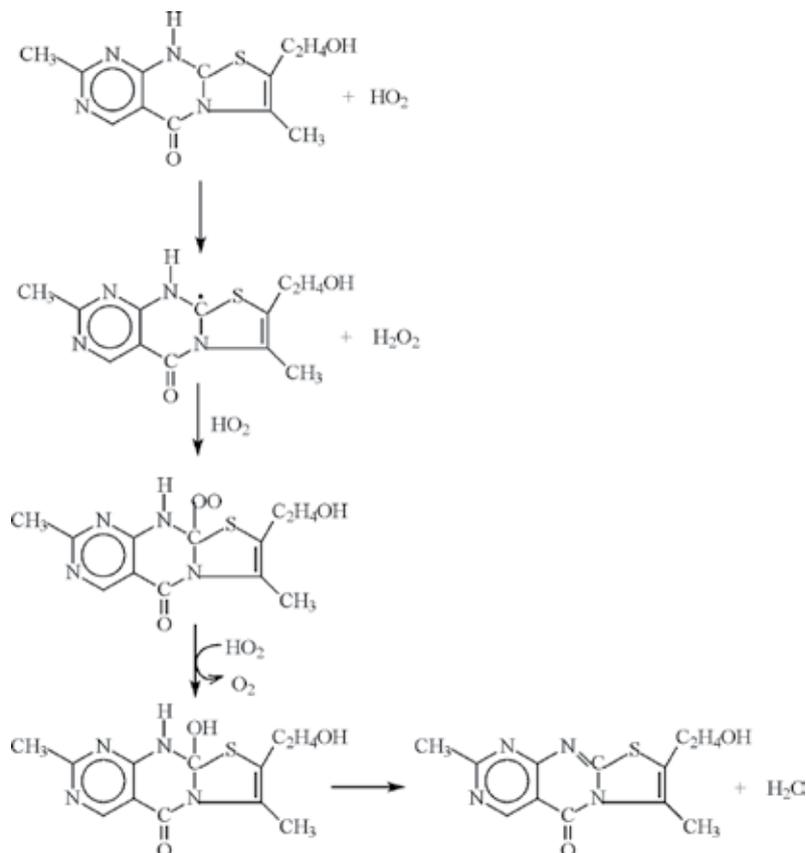
Взаимодействие  $\cdot\cdot$  Cyt *c* (IV)=O с другой молекулой пероксида водорода приводит к образованию Cyt*c*(IV=O) и супероксиданионов. Супероксиданионы дисмутируют с образованием пероксида водорода и молекул кислорода. Под действием супероксиданионов может происходить окисление оксодигидротиохрома с образованием оксотиохрома. Предполагаемая схема окисления оксодигидротиохрома под действием супероксиданионов с образованием оксотиохрома представлена на рисунке 18. После воздействия супероксиданиона на молекулу оксодигидротиохрома образуется свободный радикал, локализованный на атоме углерода молекулы оксодигидротиохрома. Под действием молекулы супероксиданиона образуется пероксиданион оксодигидротиохрома, который, под действием новой молекулы супероксиданиона образует оксотиохром ( $m/z=276,0681$ , моноизотопная масса  $M_0$ ).

Высокая скорость окисления тиохрома в оксодигидротиохром по сравнению с окислением тиамин в тиохром в реакциях двухэлектронного окисления (рисунок 15 и рисунок 16), вероятно, связана с различием конформаций молекул тиамин и тиохрома.

В молекуле тиамин аминопиримидиновый цикл и тиазольный цикл связаны между собой метиленовым мостиком. Молекула тиамин может образовывать два термодинамически устойчивых конформера, отличающихся торсионными углами вращения  $\phi$  и  $\psi$  аминопиримидинового и тиазольного компонентов вокруг одинарных связей метиленового мостика [1].

Установлено, что для конформера I расстояние между аминогруппой в аминопиримидиновом кольце и углеродом в C2-положении тиазольного кольца составляет 3,2 Å, а в конформе-

ре II это расстояние равно 5,4 А. Только для конформера I возможно образование трициклической формы тиамин, способной окисляться в тиохром. Вероятно, наличие в щелочном растворе двух конформеров — I и II определяет параллельно протекающее превращение тиамин под действием окислителей в тиохром и его дисульфид.



**Рисунок 18 — Предполагаемая схема окисления оксодигидротиохрома в пероксидазной реакции под действием супероксид анионов.**

Как известно, тиамин с триптофаном и другими индольными соединениями образует молекулярные комплексы. Эти комплексы образуются в растворах тиамин и триптофан и легко обнаруживаются методами УФ и ПМР — спектроскопии. В этом молекулярном комплексе двугранный угол между плоскостями пиримидинового и тазольного циклов больше 90 и 4-аминогруппа и 2СН тиазолия сближены. Таким образом, могут достигаться конфигурация молекулы тиамин, которая может быть окислена в тиохром. Как известно, плоскость гема лежит в гидрофобной щели и остатки пропионовой кислоты глубоко вдвинуты в щель и образуют водородные связи с остатком триптофана -59 и остатком тирозина -48. Образование оксоферрильной формы цитохрома *c* увеличивает доступность железа оксоферрильного комплекса в гемовом кармане. Мы предполагаем, молекула тиамин встраивается в гемовый карман оксоферрильной формы цитохрома *c*, образует комплекс с переносом заряда с индольным кольцом. Плоскости пиримидинового и тиазольного колец выстраиваются параллельно плоскости гема. В данной конфигурации тиамин легко окисляется в тиохром с участием двух реакционных центров - радикала порфирина и оксоферрильного комплекса гема.

Тиохром, в отличие от тиамин, обладает планарной структурой и легко проникает в гемовый карман оксоферрильной формы цитохрома *c*, и затем окисляется, вследствие двухэлектронного переноса, в оксодигидротиохром.

Цитохром *c* является мишенью для пероксинитрита. В частности, показано, что ONOO<sup>-</sup> быстро реагирует и окисляет ( $k=2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}/\text{с}$ ) ферро-форму цитохрома  $c^{2+}$  в ферри-форму, а также вызывает нитрование Tug-67 в цитохроме  $c^{3+}$ . Нитрование Tug-67 вызывает значительные изменения редокс-свойств цитохрома *c*, включая возрастание пероксидазной активности [42]. В работе [43] показано, что цитохром *c*, в присутствии физиологических концентраций NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, служит катализатором собственного нитрования и нитрования проксимальных фенольных молекул и белковых тирозинильных остатков. Тиохром эффективно взаимодействует с нитритом и пероксинитриом [34].

Полученные результаты поддерживают идею, что модификация тирозильных, лизиновых и метиониновых аминокислотных остатков цитохрома *c* активными формами азота и кислорода сопровождается усилением пероксидазной активности гемопротейна, но нарушает электронтранспортную функцию митохондриального комплекса III. Повышение пероксидазной активности цитохрома *c*, вследствие, модификации функциональных групп белковой глобулы, вследствие связывания фосфолипидов характерно для предопределенного состояния клеток.

Тиамин и, особенно, тиохром, с высокой эффективностью взаимодействуют с оксоферрильной формой цитохрома *c* и восстанавливают ее в ферри-форму даже если присутствуют в растворах при микромолярных концентрациях. Как видно из рисунка 7, даже в присутствии высоких концентраций глутатиона наблюдали окисление тиохрома в оксодигидротиохром. Следовательно, восстановление оксоферрильной формы цитохрома *c* в ферри-форму происходило под действием тиохрома. Аскорбиновая кислота также с меньшей эффективностью восстанавливала оксоферрильную форму цитохрома *c* в ферри-форму нежели тиохром, при одинаковых концентрациях в инкубационной смеси. Следовательно, можно заключить, что тиамин и продукт его окисления тиохром эффективно восстанавливают оксоферрильную форму цитохрома в ферри-форму и, вероятно, могут предотвращать возрастание пероксидазной активности и выход цитохрома *c* в цитоплазму и, как следствие, ингибировать запуск процессов апоптоза.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют предположить, что окисление тиохрома в оксодигидротиохром, а оксодигидротиохрома в 2,3-оксо-тиамин в последовательных двух электронных реакциях, а также псевдопероксидазное окисление тиамин, сопряженное с окислением парацетамола, тирозина могут выступать в качестве фактора, препятствующих накоплению токсичной оксоферрильной формы Cyt<sub>c</sub><sup>+</sup>Fe(IV=O), способствовать элиминации пероксида водорода в межмембранном пространстве митохондрий и восстанавливать функцию ЭТЦ в условиях гипоксии. В то же время процесс восстановления оксоферрильной формы цитохрома *c*, вероятно, будет сопровождаться уменьшением содержания свободного тиамин в тканях и приведет к снижению концентрации тиамин в кардиомиоцитах. В этих условиях тиамин выступает в качестве жертвенного антиоксиданта, обеспечивая на короткое время защиту клеточных структур.

Полученные результаты позволяют заключить, что антиоксидантный потенциал тиамин необходимо оценивать по суммарному антиоксидантному эффекту минорных форм тиамин — трициклической, тиольной, а также продуктов окислительной трансформации тиамин — тиохром и оксодигидротиохром, которые окисляются с образованием соответственно оксо-тиохром и 2,3 оксотиамина. Обоснование возможности применения продуктов окисления тиамин — тиохром и оксодигидротиохром в качестве лекарств для предотвращения повреждения кардиомиоцитов при окислительном стрессе, при гипоксии-реперфузии является важной задачей молекулярных биофизических исследований.

## Список литературы

1. Степуро, И.И., Степуро, В.И. Окисленные производные тиамина. Механизмы образования под действием активных форм азота, кислорода и в реакциях, катализируемых гемопро-теинами / И.И. Степуро, В.И. Степуро // LAP LAMBERT Acad. Publish. — 2014. — 280 с.
2. Уайт, А. Основы биохимии / А. Уайт // М:Мир. — 1981. — Т. 3. — С. 1157–1878.
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 blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy / H. P. Hammes [et al.]. // Nature medicine. — 2003. — Vol. 9. — №. 3. — P. 294–299.
5. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro / U. Schmid [et al.]. // Diabetes/metabolism research and reviews. — 2008. — Vol. 24. — №. 5. — P. 371–377.
6. Booth, A. A., Khalifah, R. G., Hudson, B. G. 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 // Biochemical and biophysical research communications. — 1996. — Vol. 220. — №. 1. — P. 113–119.
7. Brown, L. A. S., Harris, F. L., Guidot D. M. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF- $\alpha$ -mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells / L. A. S. Brown, F. L. Harris // J Physiol Cell and Molec Physiol. — 2001. — Vol. 281. — №. 2. — P. L377–L386.
8. Calingasan, N. Y., Gibson, G. E. 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 // Annals New York Acad. Scien. — 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., Pincus, J. H. The role of thiamine in nervous tissue / J. R. Cooper, J. H. Pincus // Neurochem. Res. — 1979. — Vol. 4. — №. 2. — P. 223–239.
11. Cytochrome c nitration by peroxyxynitrite / A. M. Cassina [et al.]. // J. Biol. Chem. — 2000.— Vol. 275. — №. 28. — P.21409–21415.
12. Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration / L. Castro [et al.]. // Archiv. Biochem. Biophys. — 2004. — Vol.421. — №. 1. — P. 99–107.
13. Cytochrome c-catalyzed oxidation of organic molecules by hydrogen peroxide / R. Radi [et al.]. // Arch. Biochem. Biophys. — 1991. — Vol. 288. — №. 1. — P. 112–117.
14. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages / J. W. Heinecke [et al.]. // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. — №. 6. — P. 4069–4077.
15. Effects of extrinsic imidazole ligation on the molecular and electronic structure of cytochrome c / L. Banci [et al.]. // JBIC. — 2001. — Vol. 6. — №. 5-6. — P. 628–637.
16. ESR spin-trapping of a protein-derived tyrosyl radical from the reaction of cytochrome c with hydrogen peroxide / D.P. Barr [et al.]. // J. Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271. — №. 26. — P. 15498–15503.
17. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Implications for oxidative stress during apoptosis / A. Lawrence [et al.]. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — №. 32. — P. 29410–29419.
18. Formation of protein tyrosine ortho-semiquinone radical and nitrotyrosine from cytochrome c-derived tyrosyl radical / Y. R. Chen [et al.]. // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279. — №. 17. — P. 18054–18062.

19. Gibson, G. E., Blass, J. P. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration / G. E. Gibson, J. P. Blass // *Antioxidants & redox signaling*. — 2007. — Vol. 9. — №. 10. — P. 1605-1620.
20. Gibson, G. E., Zhang, H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration / G. E. Gibson, H. Zhang // *Neurochem. Internat.* — 2002. — Vol. 40. — №. 6. — P. 493-504.
21. Harbury, H. A., Marks, R. H. L. Cytochromes b and c / H. A. Harbury, R. H. L. Marks // *Inorganic Biochem.* — 1973. — Vol. 2. — P. 902-954.
22. Itokawa, Y., Schulz, R. A., Cooper, J. R. Thiamine in nerve membranes / Y. Itokawa, R. A. Schulz, J. R. Cooper // *BBA*. — 1972. — Vol. 266. — №. 1. — P. 293-299.
23. Jordan, F. Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions / F. Jordan // *Natural product reports*. — 2003. — Vol. 20. — №. 2. — P. 184-201.
24. Lonsdale, D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin (e) and its derivatives / D. A. Lonsdale // *Evidence-Based Complementary and Alternative Med.* — 2006. — Vol. 3. — №. 1. — P. 49-59.
25. Matsuda, T., Cooper, J.R. Thiamine as an integral component of brain synaptosomal membranes / T. Matsuda, J.R. Cooper // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. — 1981. — Vol. 78. — №. 9. — P. 5886-5889.
26. McCord, J. M., Fridovich I. The Utility of Superoxide Dismutase in Studying Free Radical Reactions: II. The mechanism of the mediation of Cytochrome c reduction by a variety of electron carriers / J. M. McCord, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* — 1970. — Vol. 245. — №. 6. — P. 1374-1377.
27. Nagababu, E. and Rifkind, J. M. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation / E. Nagababu, J. M. Rifkind // *J. Biochem.* — 2000. — Vol. 39. — №. 40. — P.12503-12511.
28. Nitrite reductase activity of cytochrome *c* / S. Basu [et al.]. // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Vol. 283. — №. 47. — P. 32590-32597.
29. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide / Stepuro I. I. [et al.]. // *J. Biochem.* — 2012. — Vol. 77. — №. 1. — P. 41-55.
30. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome *c* bound to cardiolipin-containing membranes / N. A. Belikova [et al.]. // *J. Biochem.* — 2006. — Vol. 45. — №. 15. — P. 4998-5009.
31. Potent radical-scavenging activities of thiamin and thiamin diphosphate / Okai Y. [et al.]. // *J. Clinic. Biochem. Nutrit.* — 2007. — Vol. 40. — №. 1. — P. 42-48.
32. Protein oxidation of cytochrome *C* by reactive halogen species enhances its peroxidase activity / Y.R. Chen [et al.]. // *J. Biol. Chem.* — 2002.— Vol. 277. — №.33. — P. 29781-29791.
33. Schonhoff, C.M., Gaston, B. and Mannick, J.B. Nitrosylation of cytochrome *c* during apoptosis / C.M. Schonhoff, B. Gaston and J.B. Mannick // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278. — №. 20. — P. 18265-18270.
34. Shimazono, N., Katsura, E. Beriberi and thiamine / N. Shimazono, E. Katsura // Tokyo: Igaku Shoin Ltd. — 1965. — P. 1-295.
35. Stepuro, A. I., Piletskaya, T. P., Stepuro, I. I. Role of thiamine thiol form in nitric oxide metabolism / A. I. Stepuro, T. P. Piletskaya, I. I. Stepuro // *J. Biochem.* — 2005. — Vol. 70. — №. 3. — P. 339-349.
36. Stepuro, I. I. Thiamine and vasculopathies / I. I. Stepuro // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. — 2005. — Vol. 72. — №. 2. — P. 115-127.
37. Stsiapura, V.I., Stepuro, I.I. Antioxidant properties of thiamine and its hydrophobic metabolites, in *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects* / V.I. Stsiapura, I.I. Stepuro // Nova Sci. Publish. — 2010. — P. 319-376.
38. Thiamine and Alzheimer's disease: a pilot study / J. P. Blass [et al.]. // *Arch. Neurol.* — 1988. — Vol. 45. — №. 8. — P. 833-835.

39. Thiamine inhibits formation of dityrosine, a specific marker of oxidative injury, in reactions catalyzed by oxoferryl forms of hemoglobin / A. I. Stepuro [et al.]. // J. Biochem. — 2008. — Vol. 73. — №. 9. — P. 1031–1041.
40. Thiamine, in Handbook of Vitamins / R.B. Rucker [et al.]. // Marcel Dekker: New York. Editors. — 2001. — P. 275-316.
41. Time course and site (s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite / C. Batthyány [et al.]. // J. Biochem. — 2005. — Vol. 44. — №. 22. — P. 8038-8046.
42. Cytochrome c nitration by peroxynitrite / A. M. Cassina [et al.]. // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — №. 28. — P. 21409–21415.
43. Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration / Castro L. [et al.]. // Arch. Biochem. Biophys. — 2004. — Vol. 421. — №. 1. — P. 99–107.

---

## OXIDATION OF THIAMINE AND THIAMINE PHOSPHATE ESTERS UNDER EXPOSURE TO CYTOCHROME C AND HYDROGEN PEROXIDE IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF PHENOL COMPOUNDS

---

*Stepuro I. I.<sup>1</sup>, Zavadskaya V. M.<sup>1</sup>, Aheika S. A.<sup>1</sup>, Stepuro V. I.<sup>2</sup>, Yantsevich A. V.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus*

<sup>2</sup>*Y. Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus*

<sup>3</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

**Summary.** *In the presence of thiochrome c and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, thiamine is oxidized to thiochrome, oxodihydrothiochrome and thiamine disulfide. We believe that in the heme pocket of the thiochrome c oxoferryl form (compound 1), the thiamine molecule is oxidized to thiochrome due to a two-electron reaction involving two oxidative centers, the heme oxoferryl complex Fe (IV=O) and porphyrin radical π-cation. Also, due to reactions of interrelated two-electron transfer, the thiochrome formed is then oxidized to oxodihydrothiochrome by other cytochrome c molecule, which is in oxoferryl form. In contrast to thiamine, thiochrome has a planar structure and readily penetrates into the heme pocket of the cytochrome c oxoferryl form. The rate of the thiochrome oxidation to oxodihydrothiochrome was nearly two orders of magnitude higher than the rate of the thiamine oxidation to thiochrome. Oxodihydrothiochrome and thiamine disulfide were the main products of the thiamine oxidation, whereas thiochrome was present in small amounts. Being bound in the heme pocket, imidazole blocks availability of iron in the heme oxoferryl complex. In the presence of imidazole, due to the two-electron reactions, thiamine is not oxidized to thiochrome and thiochrome is not oxidized to oxodihydrothiochrome. No two-electron reactions typical for thiamine were observed for its phosphate esters. Neither TMP nor TDP was oxidized by the cytochrome c oxoferryl form to the corresponding thiochrome phosphates or oxodihydrothiochrome phosphates.*

*It was shown that the oxidation of thiamine and its phosphate esters to thiochrome and the corresponding thiochrome phosphates was associated with oxidation of phenols in the cytochrome c catalyzed peroxidase reaction. Paracetamol and other monophenol compounds increased the yield of thiochrome and thiochrome phosphates by 1 or 2 orders of magnitude.*

*The elevated thiochrome yield and inhibition of oxodihydrothiochrome production by the phenol compounds in the cytochrome c-catalyzed peroxidase reaction was accompanied by decreased production of phenol dimers or dimers of monophenol compounds. The results obtained suggest that oxidation of thiochrome to oxodihydrothiochrome in two-electron reactions as well as pseudoperoxidase oxidation of thiamine coupled with paracetamol and tyrosine oxidation could be factors preventing accumulation of the toxic oxoferryl form of Cyt c<sup>+</sup> Fe(IV=O) and contribute to elimination of hydrogen peroxide and restoration of electron transport chain functioning.*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ В ЛИСТЬЯХ И ЧЕРЕШКАХ МОРОШКИ ПРИЗЕМИСТОЙ (*RUBUS CHAMAEMORUS L.*)

*Страх Я.Л., Игнатовец О.С.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный  
технологический университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** В работе представлены результаты по сравнительному анализу антиоксидантной и антирадикальной активности в листьях и черешках морошки приземистой (*Rubuschamaemorus L.*) произрастающей в Беларуси. Сделан вывод о высокой антиоксидантной активности экстрактов, полученных из листовых пластинок.

**Введение.** Морошка приземистая — реликтовое растение, редкое для Республики Беларусь, обладающее большим потенциалом для использования в целях рекультивации почв, а также обладает конкурентоспособным биопотенциалом, имеющим спрос в фармацевтической, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности. Целью данной работы являлось изучение и сравнительный анализ антиоксидантной и антирадикальной активности листовых пластинок и черешков *Rubus chamaemorus L.* Объектами исследований являлись листовые пластинки и черешки морошки приземистой (место сбора — Республика Беларусь, Нацпарк «Нарочанский», Мядельский р-н, Минская обл.)

**Материалы и методы исследования.** Экстракт получали методом трехкратной дробной экстракции. Навеску растительного сырья растирали в ступке с добавлением небольшого количества экстрагента 1-й концентрации. В качестве экстрагента использовали этиловый спирт следующих параметров:  $V_1, 96\% = 20$  мл,  $V_2, 70\% = 15$  мл,  $V_3, 40\% = 15$  мл. Измельченное растительное сырье количественно переносили в круглодонную колбу и вносили оставшуюся порцию экстрагента. Экстракцию проводили при кипячении в течение 45 мин каждой порции экстрагента. Далее извлечения объединяли, фильтровали и направляли на стадию упаривания под вакуумом при температуре 40 °С с помощью роторного испарителя (IKA RV 8, Германия). Для дальнейших исследований упаренный экстракт растворяли в 20 мл 70 % этилового спирта.

**Общая антиоксидантная активность.** Общая антиоксидантная активность была оценена фосфомолибденовым методом [1].

К 1 мл экстракта различных концентраций вносили 1 мл раствора 0,6 М серной кислоты, 1 мл раствора 28 мМ фосфата натрия и 1 мл раствора 4 мМмолибдата аммония. Пробирки с крышкой инкубировали в термостате при 95 °С в течение 90 минут. После охлаждения до комнатной температуры измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Specord 200 PLUS (Analytik Jena, Германия) при 695 нм по отношению к холостому образцу. Активность сравнивали с аскорбиновой кислотой (1,7 мМ раствором) в качестве стандарта.

Общая антиоксидантная активность рассчитывалась по следующему уравнению:

$$\% \text{ от общей антиоксидантной емкости} = ((A_{\text{контр}} - A_x) / A_{\text{контр}}) \cdot 100\%,$$

где  $A_{\text{контр}}$  — это абсорбция контроля,  $A_x$  — это абсорбция образца.

### **Спектрофотометрическое определение ингибирования гидроксильных радикалов (ОН) [2].**

Гидроксильные радикалы были получены с помощью реакции Фентона ( $\text{Fe}^{2+}$  — ЭДТА- $\text{H}_2\text{O}_2$ -системы). Антирадикальную способность по отношению к гидроксильным радикалам измеряли с помощью дезоксирибозного метода. Реакционная смесь содержала 0,5 мл 2-дезоксирибозы (2,8 мМ), 0,5 мл фосфатного буфера (PBS, pH 7,4), 0,15 мл раствора железа сульфата в ЭДТУ (10 мМ  $\text{FeSO}_4$ , 10 мМ ЭДТА) и 0,15 мл перекиси водорода (10 мМ), и 50 мкл исследуемых экстрактов, окончательный объем реакционной смеси 1 мл. Смесь инкубировали в течение 4 ч при 37 °С. После инкубации реакцию останавливали 0,8 мл 2,8 % раствора трихлорукусной кислоты, после чего добавляли 0,8 мл раствора тиобарбитуровой кислоты (1 % раствор в 50 мМ гидроксид натрия).

Нагревали 10 мин на водяной бане, после охлаждения пробы фильтровали и измеряли оптическую плотность при 520 нм. В качестве стандартного раствора использовали 0,05%-й раствор галловой кислоты.

Антирадикальную активность рассчитывали по формуле

$$\% \text{ ингибирования} = ((A_{\text{контр}} - A_x) / A_{\text{контр}}) \cdot 100\%.$$

### **Спектрофотометрический метод измерения NO ингибирующей активности [3].**

Метод основан на измерении концентрации оксида азота (NO), сгенерированного нитропруссидом натрия, по реакции с реактивом Грисса. Реакционную смесь, состоящую из 0,3 мл 5 мМ раствора нитропрussa натрия в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4) и 0,5 мл исследуемого экстракта инкубировали при температуре 25 °С в течение 5 ч. Параллельно готовили контрольный раствор, состоящий из 0,3 мл 5 мМ раствора нитропрussa натрия в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4) и 0,5 70%-го этилового спирта. После инкубирования к реакционной смеси добавляли 0,5 мл раствора реактива Грисса (10 % раствор в 12 % растворе укусной кислоты) и 3 мл воды. Пробы фильтровали и измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 540 нм. Антирадикальную активность рассчитывали по формуле

$$\% \text{ ингибирования} = ((A_{\text{контр}} - A_x) / A_{\text{контр}}) \cdot 100\%.$$

**Результаты исследования и их обсуждение.** В таблице 1 представлены результаты исследований антиоксидантной и антирадикальной активности листьев и черешков морошки приземистой.

**Таблица 1 — Антиоксидантная и антирадикальная активность листьев и черешков морошки приземистой**

Метод, единицы измерения	Листовые пластинки	Черешки
Общая антиоксидантная активность, % от общей антиоксидантной емкости	52,23 ± 1,76	25,94 ± 0,96
Ингибирования гидроксильных радикалов (ОН), % ингибирования	9,76 ± 0,85	(-29,48 ± 0,92)*
NO ингибирующей активность, % ингибирования	(-12,83 ± 0,34)*	(-24,62 ± 0,51)*

*Примечание.* \*Общая антиоксидантная активность экстрактов меньше активности 0,05%-го раствора галловой кислоты.

Из представленной таблицы видно, что антиоксидантная и антирадикальная активность проявляется в большей степени для экстрактов листовых пластинок, чем черешков. Данный факт может объясняться содержанием фенольных соединений в различных частях морошки приземистой. Как следует из литературных данных, указанные соединения преобладают в составе листьев и цветочной массе [4].

**Заключение.** Полученные результаты могут быть использованы для создания новых фитопрепаратов из растительного сырья, обладающих антиоксидантным действием.

Результаты данных исследований позволяют рассматривать листовые пластинки морошки приземистой в качестве перспективного источника антиоксидантных компонентов для косметической, пищевой, фармацевтической промышленности.

#### Список литературы

1. Wound Healing Studies of *Aristolochia Bracteolata* Lam. With Supportive Action of Antioxidant Enzymes / A. Shirwaikar [et al.] // *J. Phytomedicine*. — 2003. — Vol. 10. — P. 558–562.
2. Madhu, C.S. New-vista in finding antioxidant and anti-inflammatory property of crude protein extract from *Sauropus androgynus* leaf / C.S. Madhu, H.M. Manukumar, B. Puttalingaiah // *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* — 2014. — Vol. 13, № 4. — P. 375–383.
3. Rahini, D. In-vitro antioxidant activity of *Artabotrys hexapetalus* / D. Rahini, R. Anuradha // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* — 2014. — Vol. 5, № 2. — P. 396–405.
4. Антиоксидантная и антирадикальная активность *in vitro* экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития / Е.М. Мальцева [и др.] // *Медицина в Кузбассе*. — 2017. — Т. 16, № 2. — С.32–38.

### COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL ACTIVITIES IN THE LEAVES AND PETIOLES OF CLOUDBERRY (*RUBUS CHAMAEMORUS* L.)

---

*Strakh Ya.L., Ignatovets O.S.*

*Belarusian State Technological University,  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** The paper presents the results of a comparative analysis of antioxidant and antiradical activities in the leaves and petioles of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) growing in Belarus. The conclusion is made about high antioxidant activity of the extracts obtained from leaf blades.

## САМОЭМУЛЬГИРУЮЩАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ БЕРБЕРИНА И СИЛИМАРИНА

---

*Сутько И.П., Шляхтун А.Г., Титко О.В., Янкевич Н.В., Телегин П.Г.,  
Колодко А.В., Зверинская Н.Г., Зверинский И.В.*

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

**Резюме.** Проведен сравнительный анализ гепатопротекторного действия комбинации берберина и силимарина в свободном виде и в составе разработанной самоэмульгирующейся системы при экспериментальном токсическом гепатите. Установлена большая эффективность препаратов в составе самоэмульгирующейся композиции в стабилизации и предотвращении нарушения целостности клеточных мембран гепатоцитов, нормализации активности ферментов антиоксидантной системы, в том числе компонентов ее глутатионового звена.

**Введение.** Эффективность лекарственных препаратов зависит от биологической доступности лекарственных средств (ЛС), входящих в его состав. Одним из методов совершенствования биофармацевтических свойств препарата является разработка новых составов уже изученных препаратов, подбор вспомогательных веществ, обеспечивающих достаточно быстрое высвобождение и создание в организме необходимой терапевтической концентрации, а также приводящих к сокращению общего количества лекарственного вещества, достаточного для достижения терапевтического эффекта, путем более полного и рационального его использования.

Патогенетическая терапия патологии печени включает препараты, влияющие на структуру и функцию гепатоцитов, которые принято обозначать как гепатопротекторы. Широко используются фитогепатопротекторы, что в значительной степени связано с широким спектром действия биологически активных веществ растений и их высокой терапевтической эффективностью.

Защитные эффекты при поражениях печени различного генеза показаны для берберина — изохинолинового алкалоида растений ряда семейств, включая *Berberidaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae* и *Annonaceae* [1, 8, 14].

Однако эффективность применения берберина ограничивается его относительно низкой биодоступностью (менее 1 %) при пероральном применении [11]. Всасывание берберина в желудочно-кишечном тракте лимитируется в том числе и гликопротеином-P (Pgp), поскольку берберин является не только субстратом Pgp, но и в свою очередь активирует Pgp и тем самым способствует собственному выведению. На данный момент ни один известный ингибитор Pgp, применение которого могло бы повысить биодоступность ЛС, являющихся субстратами Pgp, не применяется в клинической практике из-за развития нежелательных лекарственных реакций. Ингибирующее действие на Pgp установлено для силимарина [15], который хорошо известен своими гепатопротекторными свойствами. Силимарин — экстракт

плодов и семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn), представляющий собой полифенольный комплекс флаволигнанов. Силимарин имеет относительно низкую биодоступность при пероральном применении из-за липофильной природы и, следовательно, плохой растворимости в воде (0,04 мг/мл) и, как следствие, недостаточно полной абсорбции в кишечнике (20–50 %) [7, 9].

Таким образом, выбор данных биологически активных веществ для исследования был продиктован их хорошо известными гепатопротекторными свойствами, а также возможностью увеличения их биодоступности при совместном применении.

В настоящее время применяется ряд методов и технологических приемов для повышения растворимости и, следовательно, улучшения биодоступности ЛС, поскольку в большинстве случаев существует линейная зависимость между скоростью растворения ЛС в биологических жидкостях и его биологической доступностью.

Одним из наиболее активно развивающихся направлений по увеличению биодоступности, а следовательно, и эффективности ЛС является создание специализированных форм доставки, которые защищают ЛС от метаболизма в желудке и увеличивают его растворимость в воде.

Особое место среди них занимают так называемые самоэмульгирующиеся системы (СЭС, или SEDDS (Self-Emulsifying Drug Delivery System)). СЭС обычно состоят из нескольких компонентов: чаще всего это различные масла, поверхностно-активные вещества (ПАВ) и органические со-растворители. При попадании СЭС в желудочную и кишечную среду вследствие смешивания с водной фазой происходит образование эмульсии «масло-в-воде», содержащей липидные капли диаметра 100–300 нм с лекарственным веществом. СЭС являются стабильными системами благодаря наличию в их составе ПАВ и со-растворителей и значительно превосходят по этому параметру простые эмульсии [5, 13].

Использование биологически активных веществ растительного происхождения в составе самоэмульгирующейся системы доставки отчасти позволяет решать проблему их низкой биологической доступности.

Целью нашей работы стала разработка самоэмульгирующейся системы доставки для берберина и флавоноидов расторопши пятнистой (силимарина) с целью повышения их биодоступности при пероральном применении и изучение ее гепатопротекторной активности *in vivo* при экспериментальном токсическом гепатите.

**Материалы и методы исследования.** Силимарин получали спиртовой экстракцией из семян расторопши пятнистой.

Для разработки СЭС с берберинном и силимарином проводили скрининг ее потенциальных компонентов, учитывая их токсичность, опыт использования, растворяющую способность, смешиваемость, самодиспергируемость. Исследовали растворимость берберина и силимарина в различных потенциальных компонентах СЭС. На основании фазовых диаграмм выбирали комбинации компонентов СЭС с наименьшим количеством ПАВ, при котором происходило самоэмульгирование. Полученная в результате СЭС представляла собой смесь олеиновой кислоты, твин-80, полиэтиленгликоль-400 и берберина и силимарина (олеиновая кислота 29,8 %, твин-80 34,5 %, ПЭГ-400 34,5 %, берберин 0,5 %, силимарин 0,7 % (по массе)).

Экспериментальные исследования проведены на взрослых крысах-самцах линии Wistar с массой тела на момент включения в исследование 200–220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария Института биохимии биологически активных соедине-

ний НАН Беларуси при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментальных моделей крыс рандомизировали в равные по количеству животных группы методом случайной выборки. Каждая группа включала 10 особей. Все эксперименты выполнялись в соответствии с этическими нормами обращения с животными согласно рекомендациям «Всемирного общества защиты животных» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных».

Острый токсический гепатит моделировали введением крысам однократно внутрибрюшинно четыреххлористого углерода ( $CCl_4$ ) (2,5 мл/кг массы тела 20%-го (по объему) раствора на растительном масле). Экспериментальным животным вводили ежедневно на протяжении 7 суток до введения  $CCl_4$  комбинацию силимарина (50 мг/кг) и берберина (40 мг/кг) в 0,5%-м крахмальном клейстере, либо в составе разработанной СЭС из расчета 15 мл/кг массы тела. Через сутки после интоксикации  $CCl_4$  животных декапитировали, брали образцы печени, собирали кровь и получали сыворотку.

В субхроническом эксперименте токсический гепатит у крыс вызывали введением внутрибрюшинно 2 мл/кг массы тела 20%-го (по объему) раствора  $CCl_4$  на растительном масле дважды в неделю в течение 4 недель. Ежедневно на протяжении всего эксперимента животным вводили в/ж 0,5%-й крахмальный клейстер, либо комбинацию силимарина (50 мг/кг) и берберина (40 мг/кг) в форме суспензии на 0,5%-м крахмальном клейстере, либо комбинацию силимарина (50 мг/кг) и берберина (40 мг/кг) в составе разработанной СЭС. Контролем служили животные, получавшие в это же время в/ж эквивалентные количества 0,5%-го крахмального клейстера.

Через сутки после последнего введения препаратов животных декапитировали, брали образцы печени, собирали кровь и получали сыворотку, готовили гомогенаты печени.

О характере и степени выраженности поражения печени судили по активности в сыворотке крови аланин- и аспаргатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ),  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТП), определение которых проводили с использованием соответствующих сертифицированных наборов реагентов.

В гомогенате печени крыс определяли содержание общих и свободных сульфгидрильных (SH-) групп [6, 12], активность глутатионредуктазы (ГР) [4], глутатионпероксидазы (ГПО) [10] и супероксиддисмутазы (СОД) [2]. Величины показателей рассчитывали на 1 мг белка, определяемого по методу Лоури.

Полученные данные были обработаны с помощью статистического пакета *GraphPad Prism* с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественного сравнения *Tukey*. Полученные результаты проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка. Количественные данные представлены в виде среднего арифметического (M) и ошибки среднего арифметического ( $\pm m$ ). Различия между сравниваемыми величинами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** О развитии токсического гепатита у крыс судили по изменению биохимических показателей в сыворотке крови, характеризующих состояние метаболических процессов в печени. В нашем эксперименте как однократная, так и длительная интоксикация крыс  $CCl_4$  сопровождалась гиперферментемией в сыворотке крови, обусловленной прежде всего цитолизом гепатоцитов: активности АлАТ, АсАТ и ГГТП повышались соответственно на 163,8 %, 41,5 % и 68,2 % при остром токсическом гепатите и соответственно в 4,2 и 3,1 раза и на 61% относительно контрольного уровня при субхронической интоксикации (табл.).

**Таблица — Влияние комбинации берберина и силимарина на изменение биохимических показателей в сыворотке крови и печени крыс с токсическим гепатитом**

Показатель	Экспериментальные группы			
	Контроль	CCl <sub>4</sub>	берберин + силимарин в крахмале + CCl <sub>4</sub>	берберин + силимарин в СЭС + CCl <sub>4</sub>
<b>Острая интоксикация</b>				
АлАТ, Е/л	53,04 ± 2,85	139,90 ± 15,28*	101,50 ± 8,64*	94,03 ± 13,79*#
АсАТ, Е/л	144,00 ± 11,80	203,80 ± 11,48*	207,20 ± 16,14*	174,50 ± 15,50
ГГТП, Е/л	6,80 ± 0,46	11,44 ± 0,55*	8,35 ± 0,44#	8,36 ± 0,70#
SH-группы общие, нмоль/мг белка	22,14 ± 1,44	19,02 ± 1,40	20,90 ± 1,43	24,81 ± 1,09#
SH-группы свободные, нмоль/мг белка	15,27 ± 0,87	10,02 ± 0,58*	12,42 ± 0,65	14,20 ± 1,33#
GR, нмоль НАДФН/ мин/мг белка	54,28 ± 2,38	27,05 ± 1,85*	42,36 ± 4,23	46,63 ± 4,07#
ГРО, мкмоль GSH/мин /мг белка	70,31 ± 6,76	40,93 ± 3,37*	44,09 ± 3,39*	53,46 ± 5,48
СОД, Е/мг белка	33,43 ± 2,16	19,25 ± 2,15*	27,51 ± 1,52	32,49 ± 2,71#
<b>Субхроническая интоксикация</b>				
АлАТ, Ед/л	58,21 ± 3,60	246,70 ± 41,18*	217,80 ± 31,89*	121,50 ± 16,41#
АсАТ, Ед/л	188,30 ± 14,50	585,20 ± 97,87*	367,50 ± 66,43	270,80 ± 40,71#
ГГТП, Ед/л	9,92 ± 0,89	15,95 ± 1,83*	13,32 ± 1,27	12,02 ± 1,01
SH-группы общие, нмоль/мг белка	23,82 ± 0,90	19,08 ± 0,59*	24,66 ± 0,69#	28,82 ± 0,65&
SH-группы свободные, нмоль/мг белка	13,67 ± 0,93	11,38 ± 0,95	13,72 ± 0,90	14,85 ± 1,19
ГР, нмоль НАДФН /мин/мг белка	51,02 ± 2,51	30,23 ± 1,17*	33,09 ± 1,32*	44,41 ± 2,45#
ГПО, мкмоль GSH/ мин/мг белка	49,28 ± 5,32	48,41 ± 4,09	52,50 ± 5,16	54,97 ± 7,10
СОД, Ед/мг белка	15,24 ± 0,94	9,94 ± 0,74*	10,09 ± 0,85*	12,37 ± 1,07

*Примечание:* \* — статистически значимые изменения в сравнении с контрольной группой; # — статистически значимые изменения в сравнении с группой «CCl<sub>4</sub>»; & — статистически значимые изменения в сравнении с группой «силимарин + берберин в крахмале + CCl<sub>4</sub>».

В печени крыс снижались активности СОД на 42,4 % и 35,0 %, ГР на 50,2 % и 41,0 % соответственно при острой и субхронической интоксикации тетрахлорметаном. Также уменьшалось содержание свободных SH-групп на 34,4 % при остром CCl<sub>4</sub>-индуцированном гепатите; наблюдали дефицит общих SH-групп (их содержание снижалось на 20 % относительно контроля) с тенденцией к уменьшению свободной фракции SH-групп в субхроническом эксперименте (таблица).

В эксперименте установлено, что силимарин и берберин в составе разработанной СЭС превосходят по эффективности гепатопротекторного действия силимарин и берберин в свободном виде при CCl<sub>4</sub>-индуцированном как остром, так и субхроническом токсическом гепатите.

Действие СЭС с берберин и силимарином при острой интоксикации CCl<sub>4</sub> способствовало снижению выраженности цитолитического процесса (активность АлАТ была на 32,8 % ниже ее уровня у крыс с токсическим гепатитом, не получавших препараты, активность АсАТ достоверно не отличалась от уровня контрольных животных); содержание общих и свободных SH-групп, активности СОД, ГР не только соответствовали контрольным значениям, но, в отличие от животных, получавших берберин и силимарин в крахмальном клейстере, были выше соответственно на 30,4, 41,7, 68,8 и 72,4 % относительно экспериментальных животных, которым препараты не вводили (таблица).

СЭС с берберин и силимарином при субхронической интоксикации CCl<sub>4</sub> приводило к снижению в сыворотке крови активности АлАТ и АсАТ соответственно на 51 % и 54 % от-

носителем их значений в экспериментальной группе животных, не получавших препараты; в печени повышалось содержание сульфгидрильных групп по сравнению с величиной показателя у животных, получавших берберин и силимарин в крахмальном клейстере; нормализовывалась активность СОД (повышалась на 24 % относительно животных, не получавших лечения) и ГР (увеличивалась на 47 % по сравнению с ее уровнем у крыс без лечения) (таблица).

Большая эффективность силимарина и берберина в составе разработанной СЭС при остром и субхроническом токсическом поражении печени крыс четыреххлористым углеродом по сравнению с их действием в свободном виде связана с повышением их биодоступности. Проведенное ранее исследование фармакокинетики берберина и силимарина в свободном виде и в составе полученной СЭС подтвердило увеличение биодоступности берберина при его применении в комбинации с силимарином, а также увеличение биодоступности берберина и силимарина в составе разработанной СЭС [3].

**Заключение.** Таким образом, применение комбинации берберина и силимарина в составе СЭС повышает биодоступность берберина и силимарина при пероральном применении. Сравнительный анализ гепатопротекторного действия комбинации берберина и силимарина в свободном виде и в составе разработанной СЭС при экспериментальном токсическом гепатите показал большую эффективность препаратов в составе самоэмульгирующейся композиции в стабилизации и предотвращении нарушения целостности клеточных мембран гепатоцитов, нормализации активности ферментов антиоксидантной системы, в том числе компонентов ее глутатионового звена.

### Список литературы

1. Влияние берберина на восстановление активности ферментов биотрансформации ксенобиотиков печени крыс после частичной гепатэктомии / И. В. Зверинский [и др.] // Биомед. химия. — 2015. — Т. 61, № 3. — С. 381–383.
2. Сирота, Т.В. Использование нитросинего тетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирота // Биомед. химия. — 2013. — Т. 59. — Вып. 4. — С. 399–410.
3. Экспериментальная оценка эффективности совместного применения берберина и силимарина в составе самоэмульгирующейся системы доставки с целью повышения их гепатопротекторной активности при токсическом гепатите / И.П. Сутько [и др.] // Вестник Смоленской гос. мед. акад. — 2019. — Т. 18, № 3. — С. 31–39.
4. Carlberg, I. Glutathione reductase / I. Carlberg, B. Mannervick // *Methods Enzymol.* — 1985. — Vol. 113. — P. 484–490.
5. Dokania, S. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) — challenges and road ahead / S. Dokania, A.K. Joshi // *Drug Deliv.* — 2015. — Vol. 22, № 6. — P. 675–690.
6. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1959. — Vol. 82. — P. 70–71.
7. Gillessen, A. Silymarin as supportive treatment in liver diseases: A Narrative Review / A. Gillessen, H.H. Schmidt // *Adv. Ther.* — 2020. — Vol. 37, № 4. — P. 1279–1301.
8. 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.
9. Javed, S. Reassessing bioavailability of silymarin / S. Javed, K. Kohli, V. Ali // *Altern. Med. Rev.* — 2011. — Vol. 16, № 3. — P. 239–249.
10. Martinez, J.I. A sensitive fluorimetric microassay for the determination of glutathione peroxidase activity. Application to human blood platelets / J.I. Martinez, J.M. Launay, C. Dreux // *Anal. Biochem.* — 1979. — Vol. 98, № 1. — P. 154–159.

11. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability / C.S. Liu [et al.] // *Fitoterapia*. — 2016. — Vol. 109. — P. 274–282.
12. Sedlak, J. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // J. Sedlak, R.H. Lindsay // *Anal. Biochem.* — 1968. — Vol. 25. — P. 192–205.
13. Self-emulsifying oral lipid drug delivery systems: advances and challenges / S. Rani [et al.] // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* — 2019. — Vol. 20, № 3. — P. 129–141.
14. The effect of berberine administration to rats on the functional state of liver after common bile duct ligation / I.V. Zverinsky [et al.] // *J. Biochem. (Mosc.) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. — 2012. — Vol. 6. — P. 169–163.
15. Zhou, S. Herbal modulation of P-glycoprotein / S. Zhou, L.Y. Lim, B. Chowbay // *J. Drug Metab. Rev.* — 2004. — Vol. 36, № 1. — P. 57–104.

## **SELF-EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM AS A TOOL TO IMPROVE THE BIOAVAILABILITY OF BERBERINE AND SILYMARIN**

---

*Sutsko I.P., Shlyahatun A.G., Titko O.V., Yankevich N.V., Telegin P.G.,  
Kolodko A.V., Zverinskaya N.G., Zverinsky I.V.*

*Republican Research Unitary Enterprise Institute of Biochemistry of Biologically Active  
Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *A comparative analysis of the hepatoprotective effect of a combination of berberine and silymarin in a free form and in the self-emulsifying system on rats with experimental toxic hepatitis was carried out. It was established that the administration of silymarin and berberine in the self-emulsifying system to a greater extent stabilized hepatocytecellular membrane and prevented a disturbance in membrane integrity, normalized antioxidant enzyme activities, including the components of the glutathione antioxidant system.*

## ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРОКАТЕХИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ У КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ ЛЕГКИХ

*Туманов А.В.<sup>1</sup>, Шляхтун А.Г.<sup>1</sup>, Мороз В.Л.<sup>1</sup>, Марчик А.И.<sup>1</sup>,  
Полубок В.Ч.<sup>1</sup>, Семенкова Г.Н.<sup>2</sup>, Сорокин В.Л.<sup>2</sup>, Шадыро О.И.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** В экспериментальной модели хронического воспаления легких проведена оценка противовоспалительной активности пространственно-экранированных производных пирокатехина.

**Введение.** Известно, что хлорноватистая кислота (ХК) образуется в организме преимущественно в нейтрофилах, поскольку миелопероксидаза (МПО) присутствует в этих клетках в наибольшем количестве. Образование ХК происходит и во внеклеточной среде, поскольку активация нейтрофилов к фагоцитозу сопровождается усиленной секрецией МПО из клеток. Примечательно, что уровень ХК в организме зависит не только от активности МПО, но и от ряда факторов, связанных с модификацией процессов внутриклеточной сигнализации, которые контролируют образование фаголизосом внутри клеток, а также секрецию содержащих МПО гранул во внеклеточное пространство. В крови содержатся эндогенные соединения, которые снижают уровень ХК либо за счет уменьшения ее количества (таурин), либо за счет угнетения активности фермента (церулоплазмينا). Однако таких соединений может быть недостаточно для предотвращения галогенирующего стресса. В этом случае предлагается использовать лекарственные средства, направленные на снижение уровня ХК.

Исходя из вышесказанного, 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. Так же, они обладают антиоксидантной и противомикробной активностью, а также противовоспалительными, нейропротекторными и противоопухолевыми свойствами [3,6].

Таким образом, цель данного исследования состояла в оценке противовоспалительной активности пространственно-экранированных производных пирокатехина в условиях хронического воспаления легких у крыс, вызванного интратрахеальным введением липополисахарида (ЛПС) *E. Coli*.

**Материалы и методы исследования.** В работе использованы новые производные пирокатехина:

- 1) 4,6-ди-трет-бутил-3-(2-сульфанилэтилиминометил)-1,2-дигидроксibenзол (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 [13].

Исследование выполнено на 50 крысах-самках линии Wistar весом 200-220 грамм. 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 хроническом воспалении легких вызванного интратрахеальным введением ЛПС *E. Coli* O55:B5 в дозе 1 мг/кг, растворенного в физиологическом растворе NaCl.

Животные были поделены на пять групп. Крысам первой группы (контрольная) в/ж вводили подсолнечное масло. У животных остальных четырех групп моделировали хроническое воспаление легких. 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 7 дней после введения ЛПС *E. Coli* животных декапитировали.

Пероксидазная активность миелопероксидазы в сыворотке крови оценивалось по методу Josephy [12]. Псевдогалогенирующую активность миелопероксидазы сыворотки крови оценивали по методу Weiss [16]. Оксидазную активность церулоплазмينا (ЦП) оценивали в нашей модификации метода Ravin [15]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) сыворотки крови определяли по методу Paglia и Valentine [14]. Для оценки содержания общих тиолов в сыворотке крови использовали метод Элмана [10].

Для иммунологических исследований использовали гепаринизированную кровь животных, где оценивали относительное количество моноцитов [4, 5]. Определение содержания интерлейкина-10 в сыворотке крови проводилось набором Rat IL-10 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, R1000 согласно инструкции производителя.

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 и их обсуждение.** При моделировании у крыс хронического воспаления легких, у крыс на 7 сутки после интратрахеального введения ЛПС пероксидазная и псевдогалогенирующая активность миелопероксидазы достоверно снижалась на 27,9 % и 48,7 % по сравнению с группой 1 (контроль) (таблица 1).

Активность глутатионпероксидазы достоверно снижалась в 2 раза, уровень свободных SH-групп снижался в 1,26 раза по сравнению с контрольной группой. Оксидазная активность церулоплазмينا практически не менялась как в группе с ЛПС (2-я) так и при в/ж введении производных пространственно экранированного пирокатехина.

**Таблица 1 — Активности МРО, ЦП, ГПО и содержание свободных SH-групп в сыворотке крови крыс при моделировании хронического воспаления легких**

Показатель	Группа 1 контроль (физ. р-р) + подс. масло	Группа 2 ЛПС + подс. масло	Группа 3 ЛПС + подс. мас- ло + П1	Группа 4 ЛПС + подс. масло + П2	Группа 5 ЛПС + подс. масло + П3
Пероксидазная актив- ность МРО, мкмоль ТМВ /мин/мл	64,21± 5,06	46,26± 2,11*	49,93± 3,50	44,01± 4,67**	54,33± 2,36
Псевдогалогенирующая активность МРО, мкмоль/мин/мл	3,41± 0,52	1,75± 0,13*	2,42± 0,31	1,43± 0,23**	2,17± 0,26
Оксидазная активность ЦП, мкМ /мин/мл	80,48± 3,83	76,44± 8,74	77,19± 6,87	77,34± 5,52	76,59± 7,23
Глутатионпероксидаз- ная активность сыво- ротки, мкмоль /мин/мл	287,04± 17,94	168,94± 8,45**	140,69± 13,42**	191,93± 17,10**	257,36± 16,11#
SH-группы сыворотки, мкмоль/мл	327,01± 20,03	260,30± 6,22**	302,10± 7,36	312,06± 14,57#	300,57± 9,83

Примечание: 1 — \*, \*\* —  $p < 0,05, 0,01$  по сравнению с группой «1»; 2 — #, ## —  $p < 0,05, 0,01$  по сравнению с группой «2».

При внутрижелудочном введении П1, П2 и П3 крысам с индуцированным АФ хроническим воспалением кожи пероксидазная активность миелопероксидазы оставалась приблизительно на уровне второй группы (кроме П3, там данная активность миелопероксидазы несколько повышалась, но не до уровня контроля). Псевдогалогенирующая активность стремилась к уровню контрольных значений, но не достигала ее (кроме П2, там данная активность миелопероксидазы оставалась на уровне 2-й группы).

Активность глутатионпероксидазы после введения П3 восстанавливалась практически до уровня контрольной группы. Однако введение П1 и П2 такого эффекта не оказало. Активность ГПО незначительно повышалась при введении П2, а при введении П1 была даже несколько ниже чем во 2-й группе. Содержание свободных SH-групп в сыворотке крови после введения пирокатехинов 1, 2, 3 восстанавливалось практически до уровня контрольных значений. Особенно эффективным для данного показателя себя показал П2.

Таким образом, в/ж введение П1, П2 и П3 крысам с хроническим воспалением легких, оказывало в целом благоприятный эффект на антиоксидантную систему крови. Однако, в отличие от ранее проведенных нами моделей острого и хронического воспаления кожи [7,8], при воспалительном процессе, индуцированном введением в легкие ЛПС, псевдогалогенирующая активность миелопероксидазы наоборот снижалась, а пирокатехины П1 и П3 возвращали ее к контрольным. Вероятно, это связано либо со специфическим действием ЛПС, либо с истощением псевдогалогенирующей активности данного фермента. Пирокатехины же снижали нагрузку на данный фермент и препятствовали его истощению.

Воспалительный процесс может вызывать местный и системный воспалительный ответ и индуцировать выработку различных медиаторов воспаления, таких как, например, интерлейкин-10 (IL-10) [11]. IL-10 является противовоспалительным цитокином, который в основном продуцируется моноцитами. Его содержание при воспалительном процессе возрастает [9]. В нашем исследовании при моделировании хронического воспаления легких (группа 2) содержание IL-10 в сыворотке крови через 7 дня после интратрахеального введения ЛПС оставалось

на уровне контрольной группы. Относительное количество моноцитов в этой группе было выше контрольных значений (1 группа) практически в 2 раза.

**Таблица 2 — Концентрация IL-10 в сыворотке крови и относительное количество моноцитов в цельной крови крыс при моделировании хронического воспаления легких**

Показатель	Контроль (1гр)	ЛПС (2 гр)	ЛПС+П1 (3гр)	ЛПС+П2 (4гр)	ЛПС+П3 (5гр)
Концентрация IL-10, пг/мл	1,27±0,26	1,31±0,24	0,75±0,18	1,05±0,24	0,99±0,29
Моноциты, %	4,63±0,57	9,14±0,96* a	7,13±0,83a	7,00±1,02	5,63±0,86b

Примечание: a —  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; b —  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ЛПС».

При в/ж введении пирокатехинов 1, 2, 3 крысам с хроническим воспалением легких содержание IL-10 снижается в сравнении со второй группой на 42,7 %, 19,8 % и 24,4 % соответственно. Снижение содержания IL-10 при введении П1, П2 и П3 крысам с хроническим воспалением кожи свидетельствует о снижении воспалительного процесса. Относительное количество моноцитов в третьей, четвертой и пятой группах так же снижается.

**Заключение.** Показано, что в условиях экспериментального хронического воспаления легких наблюдалось снижение пероксидазной и псевдогалогеизирующей активностей миелопероксидазы, активности глутатионпероксидазы и содержания свободных SH-групп. Введение пирокатехинов оказывало в целом благоприятное действие на антиоксидантную систему крови и восстанавливало (пирокатехины 1 и 3) псевдогалогеизирующую активность миелопероксидазы. Оксидазная активность церулоплазмينا оставалась неизменной.

При хроническом воспалении легких содержание IL-10 во всех группах достоверно не отличалось от значений животных интактной группы. Однако на фоне ежедневного внутрижелудочного введения каждого из трех производных пирокатехинов на 7 сутки отмечалось восстановление относительного количества моноцитов к контрольным значениям.

### Список литературы

1. Едимичева, И.П. 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. Михасько, Т.А. Пространственно-затрудненные фенолы — перспективный класс новых ноотропных средств / Т.А. Михасько [и др.] // Медицинские новости. — 2002. — Т. 82., № 4. — С. 81–84.
4. Новиков, Д.К. Клиническая иммунопатология. Руководство. / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. — М. Мед. лит., 2009. — 273, 288с.
5. Новикова, И.А. Метод комплексной оценки вне- и внутриклеточных факторов бактерицидности нейтрофилов / И.А. Новикова, В.В. Железко // инструкция по применению, Гомельский государственный медицинский университет — 2014.

6. Петрекевич, Д.К. Синтез и противовирусная активность некоторых производных 3,5-дигидро-3-бутилпирокатехина / Д.К. Петрекевич [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. — 1995. — Т. 29., № 12. — С. 32–34.
7. Туманов, А.В. Влияние производных пирокатехина на иммунологические и биохимические показатели крови у крыс с хроническим воспалением мягких тканей / А.В. Туманов [и др.] // Вестник ГрГУ. Серия 5. — 2020 — Т. 10, № 3. — С. 142–150.
8. Туманов, А.В. Влияние производных пирокатехина на биохимические и иммунологические показатели крови у крыс с острым воспалением кожи / А.В. Туманов [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. Выпуск 4. Сборник статей, посвященный 95-летию основателя Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси академика Ю. М. Островского. — Минск, 2020. — С. 245–249.
9. 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.
10. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — Vol. 82, Iss. 1. — P. 70–77.
11. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell transplantation in rat burn models / J. Zhang [et al.] // Int J Clin Exp Pathol. — 2015. — Vol. 8, № 5. — P. 5129-5136.
12. 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.
13. Ksendzova, G.A. 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.
14. 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.
15. Ravin, H.A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin / H.A. Ravin // J. Lab. Clin. Med. — 1961. — Vol. 58. — P. 161–168.
16. Weiss, S.J. Chlorination of taurine by human neutrophils / S.J. Weiss [et al.] // J. Clin. Invest. — 1982. — Vol. 70. — P. 582–607.

## **EFFECT OF PYROCATECHIN DERIVATIVES ON BLOOD BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN RATS WITH CHRONIC SKIN INFLAMMATION**

---

*Tumanov A.V.<sup>1</sup>, Shlyahtun A.H.<sup>1</sup>, Moroz V.L.<sup>1</sup>, Marchik A.I.<sup>1</sup>,  
Polybok V.Ch.<sup>1</sup>, Semenkova G.N.<sup>2</sup>, Sorokin V.L.<sup>2</sup>, Shadyro O.I.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*«Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, National Academy  
of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *In an experimental model of chronic lung inflammation, the anti-inflammatory activity of spatially shielded pyrocatechin derivatives was evaluated.*

## СХОДСТВО СПЕКТРОВ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПРИОННОГО ПЕПТИДА СС36 В СВОБОДНОЙ И КОНЬЮГИРОВАННОЙ ФОРМЕ

*Хрусталёв В.В.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Резюме.** С целью повышения растворимости при pH=7,4 прионный пептид СС36 был конъюгирован с бычьим сывороточным альбумином (БСА) с помощью линкера SMCC. С помощью флюоресцентной спектроскопии факт сходства трёхмерного строения свободного пептида СС36 и того же пептида, конъюгированного с БСА, был доказан методом термического анализа. Свободный пептид СС36, его конъюгат с БСА, а также пептид СС36 с внутримолекулярной дисульфидной связью претерпевают один и тот же структурный переход в районе 35°C, связанный с диссоциацией олигомеров.

**Введение.** Многие иммуногенные пептиды требуют конъюгации с белками-носителями. Необходимость в этом возникает как по причине короткой длины пептидов, так и по причине их низкой растворимости при физиологическом pH=7,4. При этом встаёт серьёзный вопрос о том, соответствует ли структура конъюгированного пептида структуре пептида свободного. Прежде, чем проверять это предположение в опытах на лабораторных животных необходимо применить физико-химические методы исследования. Одним из таких методов является флюоресцентная спектроскопия, которая становится весьма информативной в сочетании с термическим анализом.

Объектом исследования послужил пептид «СС36», соответствующий фрагменту прионного белка человека с неустойчивой вторичной структурой [1], и его конъюгат с бычьим сывороточным альбумином. В пептид СС36 вместо остатков Met28 и Val32 были включены остатки аргинина [1]. В получившемся мотиве «RERVRE» остатки аргинина должны препятствовать образованию бета-тяжа, находясь в положениях «1 — 3» друг от друга, и способствовать формированию альфа-спирали, находясь в положениях «1 — 4» с остатками глутаминовой кислоты. Помимо этого, вместо остатка Val2 был введён пролин — разрушитель бета-структуры [1]. Сама возможность флюоресцентного анализа пептида была достигнута путём введения в его последовательность остатка триптофана вместо остатка Phe20 [1]. Пептид с описанными выше четырьмя заменами может быть получен путём твёрдофазного химического синтеза, в отличие от фрагмента прионного белка только с одной заменой Phe20 на Trp [1]. То есть, внесённые замены обладают аттенуирующим эффектом на образование межмолекулярной бета-структуры. По данным спектроскопии кругового дихроизма в пептиде СС36 с дисульфидной связью между первым и последним остатками воспроизводится часть бета-структуры патологической формы прионного белка человека [1]. Такой пептид можно использовать для иммунизации с целью выработки антител, способных к связыванию с патологической формой прионного белка. Полученные антитела должны предотвращать распространение патологической формы белка: бета-структурный прионный белок не сможет связаться с нормальным, если его поверхность будет заблокирована антителом [2]. Использование непосредственно пептида СС36 с этой це-

лью затруднено по причине его низкой растворимости при  $pH=7,4$ . Для повышения растворимости пептид СС36 был конъюгирован с бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Целью исследования явилась проверка того, повлияла ли конъюгация с БСА на трёхмерное строение пептида СС36 методом термического анализа под контролем спектрофлуориметрии.

**Материалы и методы исследования.** Пептид СС36 с дисульфидной связью между 1-м и 36-м остатками цистеина имеет аминокислотную последовательность CPNITIKQHTVTITTK GENWTETDVKMRERVREQMC, молекулярную массу 4264 Да, степень очистки — 96,57% (Peptide 2.0).

Пептид СС36 восстановленный — без дисульфидной связи — имеет такую же аминокислотную последовательность, как и окисленный, молекулярную массу 4266 Да, степень очистки — 96,63% (Peptide 2.0). Факт наличия или отсутствия дисульфидной связи в пептидах подтверждён данными масс-спектрометрии.

Для получения конъюгата пептида СС36 с бычьим сывороточным альбумином использовался SMCC (сукцинимидил-4-N-малеимидометил-циклогексан-1-карбоксилат), процесс проводился по стандартному протоколу, БСА и СС36 были взяты в соотношении 1:1 по массе, что соответствует 15-16 молекулам СС36 на одну молекулу БСА. Со стороны пептида СС36 конъюгация происходила по остаткам цистеина. Так как на одну молекулу СС36 приходится два остатка цистеина, то количество экспонированных остатков Lys на БСА должно быть выше, чем 32, чтобы достичь конъюгации всех молекул пептида через N- и C-концевые остатки цистеина одновременно. На трёхмерной структуре БСА (PDB идентификатор: 3V03) на одну молекулу белка приходится 42 остатка Lys с уровнем доступности сольвенту выше 50 квадратных Ангстрем (по результатам работы программы DSSP [3]). То есть, молекулы пептида СС36 были присоединены к БСА с помощью  $-SH$  групп как первого, так и последнего остатков цистеина одновременно. Длина линкера составляет 8,3 Ангстрем.

Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра SOLAR CM2203, по мере нагревания раствора от 22 до 56°C, с шагом в один градус. При записи спектров щели устанавливали на 5 нм, шаг при записи составлял 1 нм, скорость регистрации — средняя. Пептид СС36, так же, как и бычий сывороточный альбумин, содержит остатки триптофана. По этой причине флуоресценцию в растворе пептида СС36, его конъюгата с БСА и в растворе самого БСА возбуждали при длине волны 280 нм, регистрировали спектр — в диапазоне от 300 до 400 нм. При таких условиях на тонком спектре флуоресценции остатков триптофана появляются два максимума: при 330 нм и при 360 нм. О наличии структурных переходов в триптофан-содержащих пептидах судили по графику зависимости интенсивности флуоресценции на одном из максимумов от температуры.

Концентрации пептидов приведены ниже: 246 мкг/мл для СС36 восстановленного и для СС36 с дисульфидной связью; 167 мкг/мл для бычьего сывороточного альбумина; 165 мкг/мл для конъюгата пептида СС36 с бычьим сывороточным альбумином. БСА и конъюгат СС36 с БСА были растворены в 0,01М фосфатном буфере  $pH=7,4$ . Пептид СС36 в обеих формах растворяли в 0,01М фосфатном буфере с  $pH=5,3$ . Все спектры были скорректированы относительно таковых для чистого буфера.

**Результаты исследования и их обсуждение.** На Рисунке 1а приведена зависимость интенсивности флуоресценции остатка Trp из пептида СС36 с дисульфидной связью от температуры при длине волны 360 нм, так как длинноволновый компонент спектра флуоресценции триптофана (360 нм) в этом пептиде преобладает над коротковолновым (330 нм). При нагревании от 28 до 31°C интенсивность флуоресценции довольно резко падает, а затем постепенно

возрастает вплоть до достижения температуры, равной 37°C (Рисунок 1а). После этого следует резкое снижение интенсивности флюоресценции (до температуры 39°C). Далее (до 53°C) интенсивность флюоресценции снижается медленно. Прирост интенсивности флюоресценции при температуре от 31 до 37°C должен быть связан с тем, что исчезают взаимодействия остатка триптофана с тушителями флюоресценции, в качестве которых могут выступать соседние остатки (в особенности — карбоксильные группы) [1]. Хорошо известен эффект тушения флюоресценции остатков триптофана расположенной рядом дисульфидной связью [4]. Освобождение триптофана от такого эффекта возможно в случае диссоциации олигомеров, в которых мономеры расположены друг к другу в положении «голова к хвосту». Тогда остаток триптофана, находящийся на «вершине» пептида — в петле между бета-тяжами — будет расположен рядом с дисульфидной связью, С-концевой карбоксильной группой и остатком Glu33 соседнего пептида. То есть, олигомеры при нагревании диссоциируют, некоторые остатки триптофана повышают интенсивность флюоресценции, а затем они вновь подвергаются тушению. Далее продолжается процесс диссоциации олигомеров более низкого порядка, с чем связано замедление термического тушения флюоресценции.

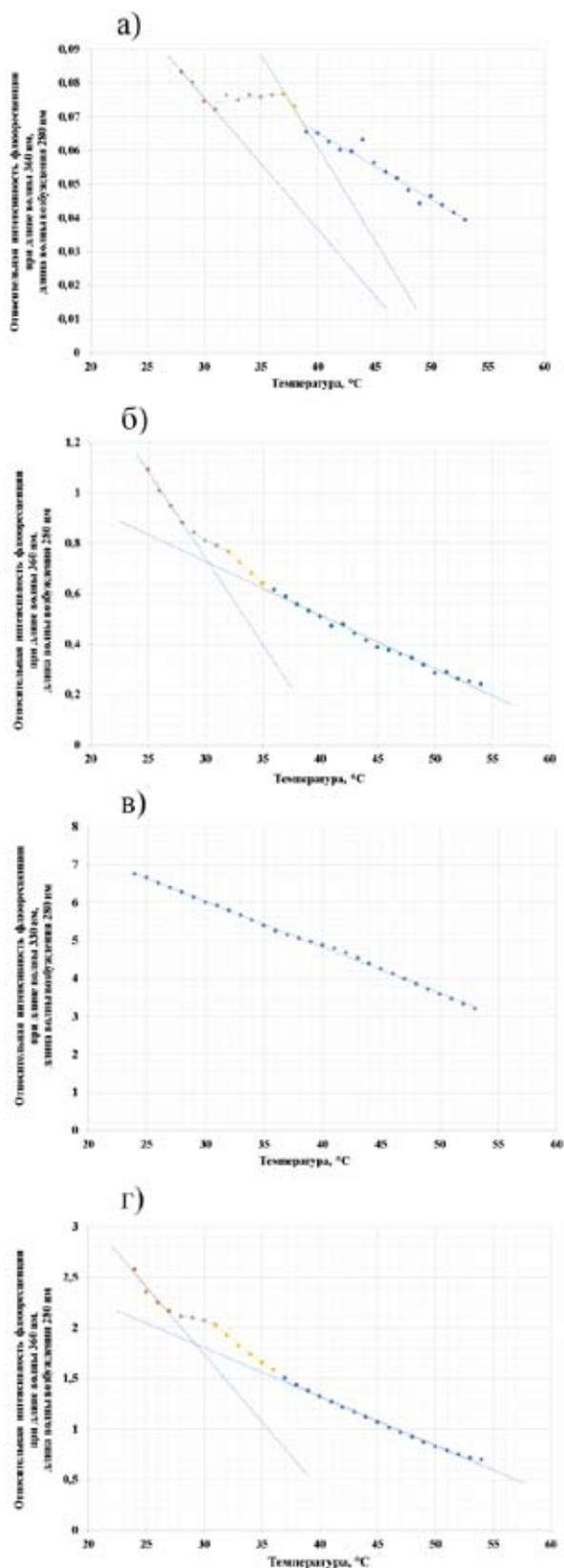
В отсутствии дисульфидной связи флюоресценция остатка триптофана пептида СС36 подвергается тушению по мере нагревания на всём протяжении графика (Рисунок 1б). Однако интенсивность тушения изменяется: при температуре от 25 до 28°C тушение происходит резко, при температуре 28 — 32°C — плавно, при температуре 32 — 35°C — опять резко, при температуре 35 — 54°C — снова плавно. То есть, на графике с Рисунка 1б присутствуют переходы, аналогичные таковым на графике с Рисунка 1а. Тем не менее, без дисульфидной связи эффект «возгорания» флюоресценции триптофана при диссоциации олигомеров выражен не столь ярко.

На спектрах флюоресценции пептида СС36 без дисульфидной связи преобладает длинноволновой компонент (360 нм). При этом интенсивность флюоресценции в отсутствие дисульфидной связи значительно выше (на порядок), чем в её присутствии, при одинаковой концентрации пептида.

Данные по термическому тушению флюоресценции остатков триптофана в чистом БСА (Рисунок 1в) показывают, что эти два остатка не вовлечены в какие-либо структурные переходы. Действительно, оба остатка отличаются средней доступностью растворителю (16 и 29 квадратных Ангстрем, согласно DSSP [3]), а, следовательно, не должны реагировать на диссоциацию олигомеров так, как остатки, расположенные на поверхности, непосредственно участвующие в белок-белковых взаимодействиях. На спектрах флюоресценции БСА доминирует коротковолновой компонент (при 330 нм).

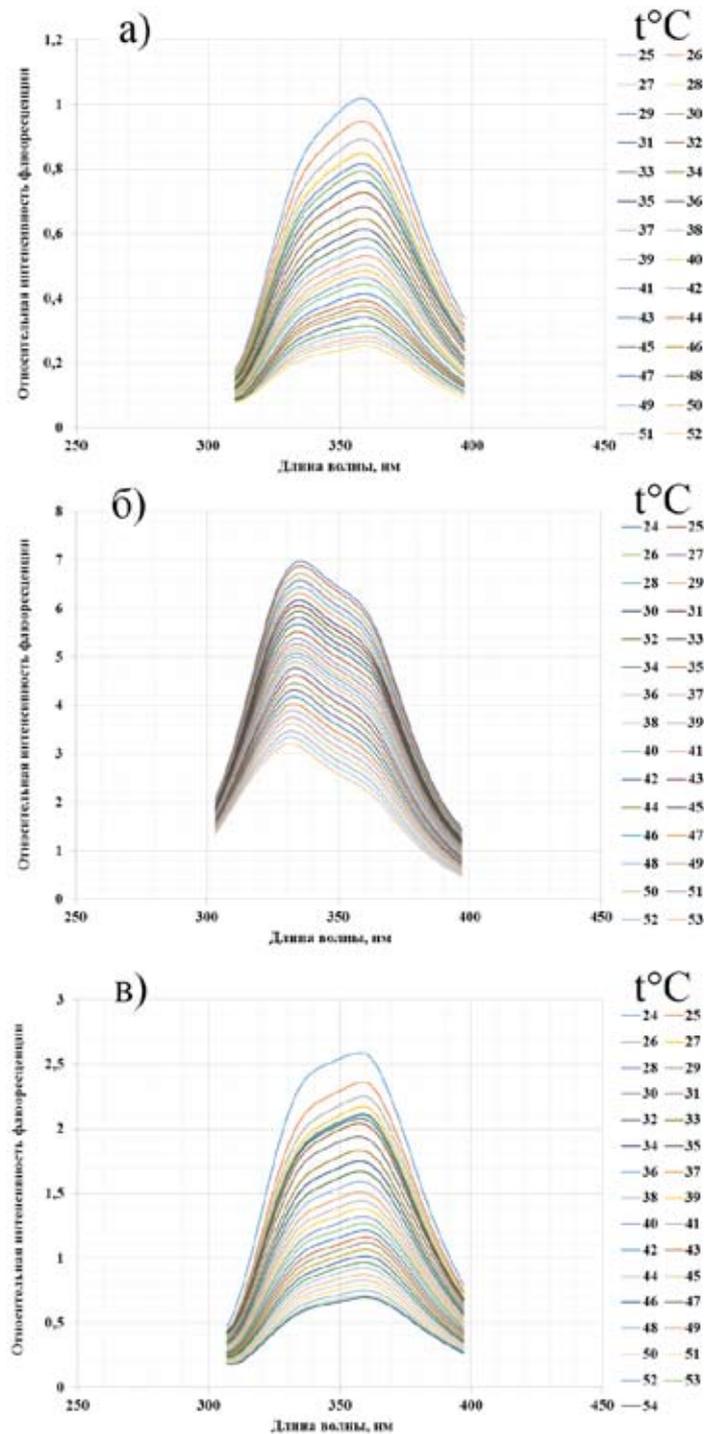
При анализе спектров флюоресценции конъюгата СС36 с БСА по мере увеличения температуры заметен структурный переход (Рисунок 1г), аналогичный таковому для чистого СС36. В интервале от 28 до 31°C заметна задержка тушения флюоресценции, а после неё более резкое снижение интенсивности сигнала при температуре от 31 до 36°C. При дальнейшем повышении температуры флюоресценция остатков триптофана снижается более плавно.

Данные, приведенные на Рисунке 1г, заставляют признать, что конъюгация с БСА не мешает молекулам пептида СС36 образовывать олигомеры. Связь между мономерами, тем не менее, при этом становится сильнее, чем в свободном виде для молекул без дисульфидной связи, что можно объяснить вовлечением в образование связей между мономерами остатков линкера. На спектрах флюоресценции конъюгата (Рисунок 2в) доминирует длинноволновой компонент (360 нм), но отношение его к коротковолновому (330 нм) заметно ниже, чем на спектрах для молекул чистого пептида СС36 (Рисунок 2а), что говорит о вкладе двух остатков триптофана самого БСА (Рисунок 2б) в интегральный спектр [5].



**Рисунок 1 — Зависимость интенсивности флуоресценции пептида СС36 с дисульфидной связью (а) и без дисульфидной связи (б) при длине волны 360 нм от температуры; зависимость интенсивности флуоресценции БСА при длине волны 330 нм (в) и конъюгата пептида СС36 с БСА при 360 нм (г) от температуры. Длина волны возбуждения флуоресценции — 280 нм.**

Олигомеры между конъюгированными с БСА молекулами пептида СС36 могут формироваться при взаимодействии, как минимум, двух таких конъюгатов. Тогда молекулы пептида смогут образовывать связи друг с другом в положении «голова к хвосту». Поскольку плотность пептидов на поверхности конъюгата высока, соседние молекулы из одного конъюгата могут связываться друг с другом за счёт образования контактов с одной и той же молекулой пептида из другого конъюгата.



**Рисунок 2 — Спектры флюоресценции пептида СС36 без дисульфидной связи в 0,01М фосфатном буфере при рН=5,3 (а), БСА (б) и конъюгата пептида СС36 с БСА в 0,01М фосфатном буфере при рН=7,4 (в) в зависимости от температуры. Длина волны возбуждения флюоресценции — 280 нм.**

**Заключение.** Пептид СС36, вне зависимости от того, находится он в окисленной форме или восстановленной, и от того, конъюгирован он с БСА или нет, претерпевает схожий температурный переход, регистрируемый на спектре флюоресценции его единственного остатка триптофана. Полученные результаты свидетельствуют в пользу сохранения трёхмерного строения пептида СС36 в конъюгированном с БСА состоянии.

### Список литературы

1. The part of a long beta hairpin from the scrapie form of the human prion protein is reconstructed in the synthetic CC36 protein / V. V. Khrustalev [et al.] // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 2016. — Vol. 84. — P. 1462–1479.
2. Prusiner, S. B. Prions / S. B. Prusiner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95. — P. 13363 — 13383.
3. Kabsch, W. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features / W. Kabsch, C. Sander // *Biopolymers*. — 1983. — Vol. 22. — P. 2577–2637.
4. Topics in fluorescence spectroscopy: Biochemical applications / J. R. Lakowicz [et al.] // — Kluwer Academic Publishers, 2002. — 307 p.
5. Microenvironment of tryptophan residues in proteins of four structural classes: applications for fluorescence and circular dichroism spectroscopy / V. V. Khrustalev [et al.] // *European Biophysics Journal*. — 2019. — 48. — P. 523–537.

## THE SIMILARITY OF FLUORESCENCE SPECTRA FOR FREE AND CONJUGATED CC36 PRION PEPTIDE

---

*Khrustalev V.V.*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** *The CC36 prion peptide has been conjugated with Bovine serum albumin (BSA) through SMCC linker to increase its solubility at pH=7.4. With the help of fluorescence spectroscopy, the fact of the similarity of three-dimensional shapes of free and conjugated CC36 peptides has been approved in thermal analysis. Free CC36 peptide, its conjugate with BSA, and CC36 peptide with an intramolecular disulfide bond demonstrate the same structural shift near 35 °C associated with the increase of tryptophan fluorescence due to dissociation of oligomers.*

## ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ *DUNALIELLA SALINA* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕДАХ

Чепелева Е.В., Самович Т.В., Козел Н.В.

Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Беларусь

**Резюме.** Установлено, что дефицит биогенных элементов существенно влияет на пигментный состав клеток *Dunaliella salina*. Показано, что накопление  $\beta$ -каротина в клетках микроводоросли в условиях дефицита азота более эффективно по сравнению с контролем, а также дефицитом калия и фосфора.

**Введение.** Биотехнология водорослей достигла больших успехов за последние три десятилетия, и некоторые водоросли, такие как *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* и сине-зеленая водоросль (цианобактерия) *Spirulina*, теперь выращиваются для производства белков, витаминов, астаксантина,  $\beta$ -каротина, глицерина, незаменимых ненасыщенных жирных кислот, жидкого топлива, фармацевтических препаратов и других химических веществ [4, 7, 9].

*Dunaliella salina* представляет собой галофильную зеленую водоросль, которая способна расти и размножаться при уровне солености от 0,5 до 5,0 М NaCl. При благоприятных для роста условиях данная водоросль продуцирует  $\beta$ -каротин (провитамин А) в количествах, равных около 0,3% сухой массы, аналогично содержанию  $\beta$ -каротина в листьях растений и других водорослях. Однако под действием стрессовых факторов накопление вторичного  $\beta$ -каротина (не связанного с фотосинтетическим аппаратом) может достигать 10% от сухой массы, что является самым высоким содержанием  $\beta$ -каротина для любой известной водоросли, растения или другого микроорганизма [7].

Способность *Dunaliella salina* к накоплению  $\beta$ -каротина широко используется в различных отраслях производства, таких как пищевая промышленность (для производства кормов и пищевых добавок), косметическая промышленность (для производства косметических средств), фармакология (для производства лекарственных препаратов).

Наличие у  $\beta$ -каротина выраженного антиоксидантного и иммуномодулирующего действия привело к более активным исследованиям по его применению в профилактике онкологии человека. Пигмент используется для лечения различных расстройств, таких как эритропоэтическая протопорфирия, снижает риск возникновения рака молочной железы у женщин и возрастной дегенерации желтого пятна [1].

В последнее время интерес к  $\beta$ -каротину *Dunaliella salina* существенно возрос после обнаружения факта, что он более эффективен в фармакологическом плане по сравнению с пигментом, выделенным из других фотосинтезирующих организмов. В природе, как правило, каротиноиды находятся в *транс*-форме. Однако при накоплении каротиноидов (каротиногенезе), индуцированном стрессорами разной природы, клетки *Dunaliella salina* могут синтезировать *цис*-изомеры, обладающие повышенным фармакологическим эффектом [6].

Исследования *Dunaliella salina* носят как фундаментальный, так и прикладной характер и сосредоточены чаще всего на организации эффективного производства  $\beta$ -каротина. В Респуб-

лике Беларусь также имеется коллекция водорослей, в которой присутствует дуналиелла (*Dunaliella salina* штамм IBCE D-1) [8]. Этот штамм как продуцент  $\beta$ -каротина изучен недостаточно. Представляет большой интерес исследовать влияние модификации состава питательной среды на продукцию клетками *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1  $\beta$ -каротина. В частности, цель данной работы — изучить особенности каротиногенеза в клетках *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1 при культивировании на средах, дефицитных по биогенным элементам (N, K+P).

**Материалы и методы исследования.** В качестве объекта исследования в работе использовали галофитную зеленую водоросль *Dunaliella*, штамм *Dunaliella salina* IBCE D-1 из альгологической коллекции Республиканского центра альгологии Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [8].

Микроводоросль *Dunaliella salina* для опытов выращивали в стеклянных колбах с рабочим объемом 50 мл на стандартной питательной среде Артари при освещении светом светодиодных ламп белого дневного света (цветовая температура 4000 К) с интенсивностью 40 мкмоль квантов/ (м<sup>2</sup>·с) и фотопериодом 14 часов света — 10 часов темноты. Эксперимент проводили в строго контролируемых условиях окружающей среды: температура в световом периоде — 23±1°C, относительная влажность воздуха — 50%.

Для культивирования *Dunaliella salina* использовали питательную среду Артари. Полная стандартная питательная среда Артари для *Dunaliella salina* содержала (г/л):

- 1) NaCl — 116;
- 2) MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O — 50;
- 3) KNO<sub>3</sub> — 2,5;
- 4) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0,2;
- 5) FeSO<sub>4</sub> — 0,009;
- 6) ЭДТА — 0,037;
- 7) NaHCO<sub>3</sub> — 1;

8) Микроэлементы А<sub>5</sub> по Арнону — 2 мл на 1 л среды (в этот раствор входит Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub> — 2,86 г/л, MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O — 1,81 г/л, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O — 0,222 г/л, МоО<sub>3</sub> — 176,4 мг/10 л, NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> — 229,6 мг/10 л) [8].

Для выяснения влияния модификации состава питательной среды, а именно — удаления из нее биогенов (N и K+P), использовали среду, дефицитную по азоту (исключен KNO<sub>3</sub>), и среду, дефицитную по калию и фосфору (исключен K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub> заменен NaNO<sub>3</sub>).

Закладка опытов осуществлялась следующим образом: суспензию *Dunaliella salina* известной оптической плотности центрифугировали 10 минут при 4000 g на центрифуге Sigma 3-18KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия), супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и снова центрифугировали 10 минут при 4000 g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 30 мл питательной среды, после чего суспензию помещали в колбы, контролируя оптическую плотность в каждой колбе.

Для проведения биохимических анализов отбирали по 12 мл суспензии из каждой колбы, центрифугировали 10 минут при 4000 g, супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и снова центрифугировали 10 минут при 17000 g на центрифуге Heraeus Pico 17 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Осадок замораживали и хранили до проведения анализа при -24°C.

Пигментный состав клеток *Dunaliella salina* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), модифицированным в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси соглас-

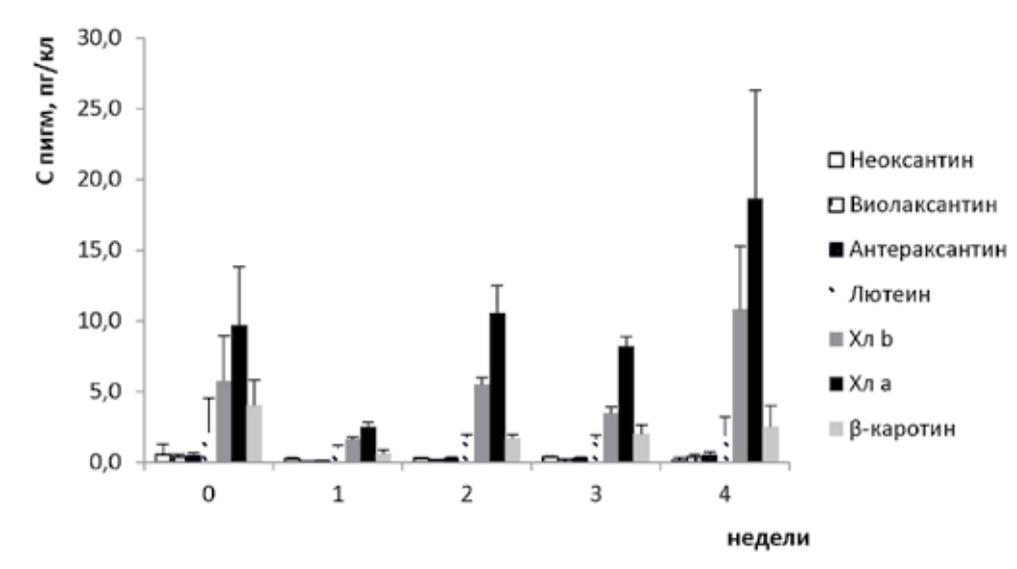
но работам [2, 3, 5]. Подсчет клеток осуществляли с помощью камеры Горяева на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (Япония) [10].

Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Excel 2019» и статистических методов, принятых в области биологических исследований. Различия считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** В работе было изучено влияние дефицита питательных элементов — азота (N) и калия в сочетании с фосфором (K+P), на накопление фотосинтетических пигментов в клетках *Dunaliella salina* при культивировании в течение 4 недель в нормальных условиях:  $t=23\pm 1^\circ\text{C}$ , интенсивность освещения 40 мкмоль квантов/ ( $\text{м}^2\cdot\text{с}$ ), фотопериод — 14 часов света — 10 часов темноты.

Анализ пигментных экстрактов позволил выявить в клетках исходной культуры наличие каротиноидов неоксантина, виолаксантина, лютеина и  $\beta$ -каротина, а также хлорофиллов (Хл) *a* и *b*.

Установлено, что при культивировании культуры на полной питательной среде содержание Хл *a* и *b* увеличилось почти в 2 раза, в то время как изменение содержания остальных пигментов изменялось в небольших пределах (рис. 1).



**Рисунок 1. — Содержание пигментов в *Dunaliella salina* при культивировании на контрольной среде**

При культивировании водоросли на среде, дефицитной по азоту (рис. 2), содержание неоксантина снижалось до минимальных значений — детектировались лишь следовые количества пигмента. Изменение содержания виолаксантина, лютеина и хлорофилла *b* изменялось в небольших пределах. А вот содержание хлорофилла *a* и  $\beta$ -каротина значительно увеличилось по отношению к исходным значениям.

При культивировании водоросли на среде, дефицитной по калию и фосфору (рис. 3), содержание неоксантина также снижалось до следовых количеств. Содержание виолаксантина, лютеина и хлорофилла *b* незначительно увеличилось, в то время как содержание хлорофилла *a* и  $\beta$ -каротина увеличилось в значительной степени по отношению к исходным значениям.

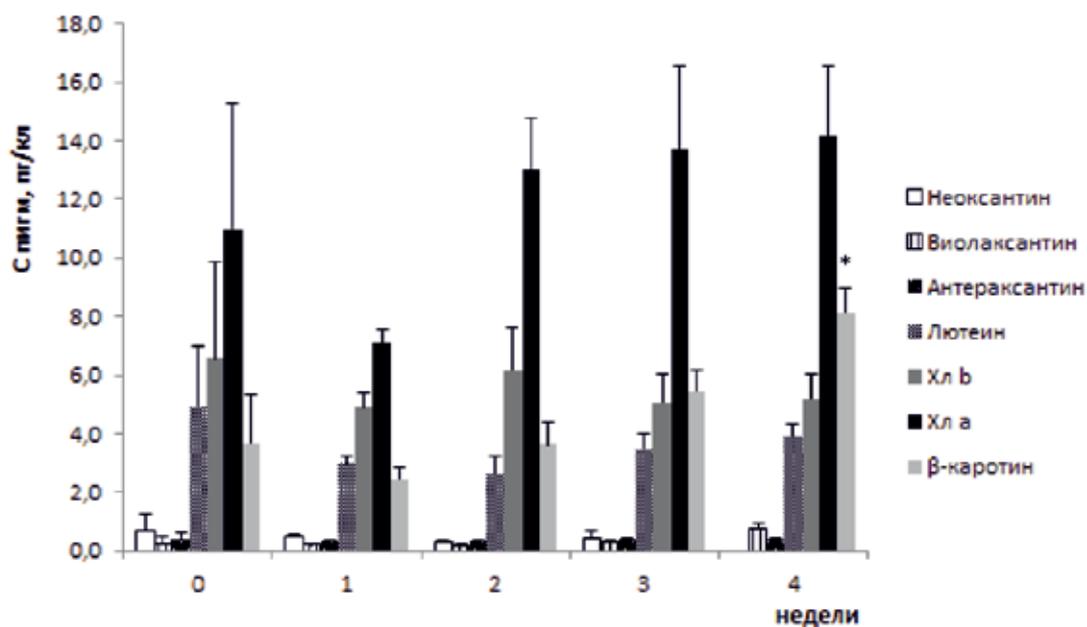


Рисунок 2. — Содержание пигментов в *Dunaliella salina* при культивировании на среде, дефицитной по азоту

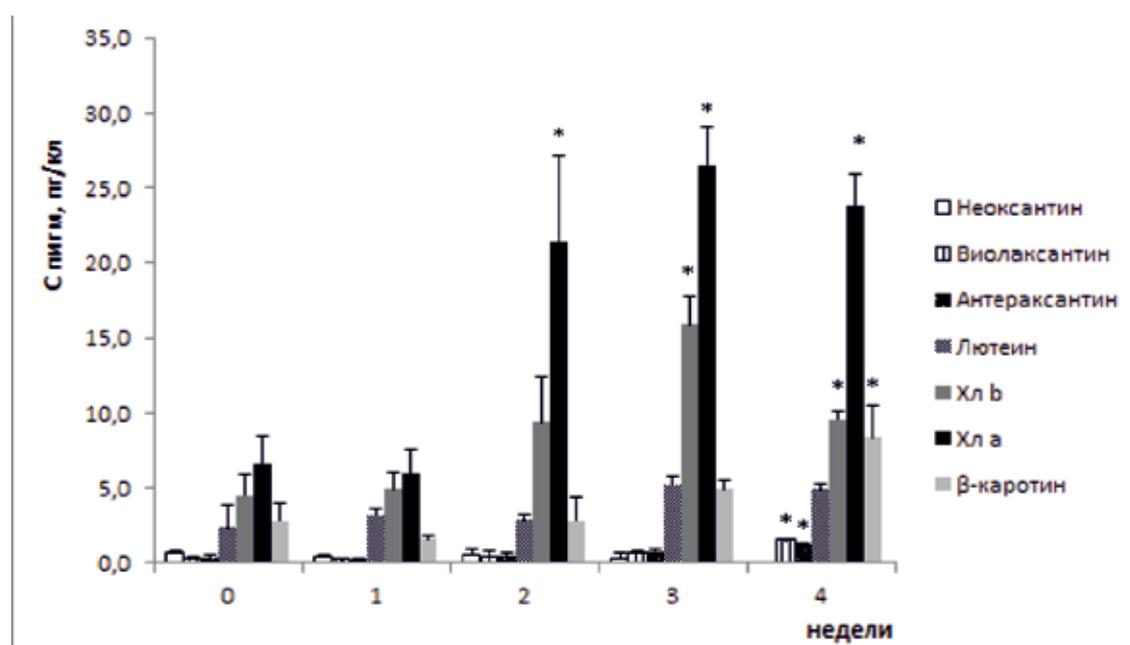


Рисунок 3. — Содержание пигментов в *Dunaliella salina* при культивировании на среде, дефицитной по калию и фосфору

Сравнивая количественный состав клеток микроводоросли, культивированных на биогедефицитных средах по отношению к стандартной среде Артари, видно, что дефицит биогенных элементов существенно влияет на пигментный состав клеток *Dunaliella salina*. Так, в условиях дефицита азота содержание хлорофилла *a* и *b* уменьшилось соответственно в 1,2 и 2 раза, а содержание β-каротина в клетках увеличилось в 5 раз относительно контроля. При культивировании микроводоросли на среде, дефицитной по калию и фосфору, содержание β-каротина в клетках увеличилось в 4 раза относительно контроля. Таким образом, дефицит азота оказался наиболее эффективным фактором стимуляции синтеза β-каротина.

**Заключение.** Таким образом, установлено, что дефицит биогенных элементов существенно влияет на пигментный состав клеток *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1. При этом дефицит азота оказался наиболее эффективным фактором стимуляции синтеза  $\beta$ -каротина. В частности, показано, что накопление  $\beta$ -каротина в клетках микроводоросли в условиях дефицита азота более эффективно по сравнению с контролем, а также дефицитом калия и фосфора. Полученные результаты указывают на перспективность направленной модификации состава питательной среды культивирования *Dunaliella salina* с целью увеличения продукции клетками водоросли  $\beta$ -каротина.

### Список литературы

1. Al-Muhteseb, S.I. Producing Natural Mixed Carotenoids from *Dunaliella salina* / S. I. Al-Muhteseb, S. Emeish // Journal of Natural Sciences Research. — 2015. — Vol. 5, № 10 — P. 53-59.
2. Forni, E. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas // Chromatography. — 2012. — Vol. 1. — P. 120–124.
3. Milenković, S.V. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies // Advanced technologies. — 2012. — Vol. 1. — P. 16–24.
4. Raja, R. Exploitation of *Dunaliella* for  $\beta$ -carotene production/ R. Raja, S. Hemaiswarya, R. Rengasamy // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2007. — Issue 74. — С. 517–523.
5. Rodriguez-Amaya D. B. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis // D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura — HarvestPlus, 2004. — 63 p.
6. Shariati, M. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella* / M. Shariati, M. Reza Hadi // Progress in Molecular and Environmental Bioengineering — From Analysis and Modeling to Technology Applications, Isfahan, 1 August 2011 / University of Isfahan; ed.: A. Carpi [et al.]. — Isfahan, 2011. — С. 483–506.
7. Индукция вторичного каротиногенеза у новых галофильных микроводорослей из рода *Dunaliella* / А.Е. Соловченко [и др.] // Биохимия. — 2015. — Т. 80, № 11 — С. 1817-1823.
8. Мельников, С. С., Мананкина, Е. Е., Будакова, Е. А., Шалыго, Н. В. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей. Мн., 2011. — 101 с.
9. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор / Г. С. Минюк [и др.] // Морський екологічний журнал. — 2008. — Т. 7, № 2 — С. 5–23.
10. Сиренко, Л. А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л. А. Сиренко, А. И. Сакевич, Л. Ф. Осипов, Л. Ф. Лукина // Навукова думка, Киев. — 1975. — 248 с.

## THE PIGMENT COMPOSITION OF DUNALIELLA SALINA DURING CULTIVATION ON MODIFIED MEDIA

---

*Chepeleva E.V., Samovich T.V., Kozel N.V.*

*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary.** It has been established that the shortage of biogenic elements significantly affects the pigment composition of *Dunaliella salina* cells. It is shown that the accumulation of  $\beta$ -carotene in the cells of the microalgae under the conditions of nitrogen deficiency is more efficient compared to the control, as well as potassium deficiency and phosphorus.

## ПРИМЕНЕНИЕ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРИРОДНЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ

---

*Чонабаева Н.Н., Мукашева А.Г.*

*Казахский национальный университет имени аль-Фараби,  
г. Алматы, Республика Казахстан*

**Резюме.** Исследована эффективность химически модифицированных природных сорбентов на основе лигнина для коррекции углеводно-липидного статуса больных сахарным диабетом. Показано, что детоксикационная активность аминолигнинов зависит от природы их функциональных групп. Установлено, что для регуляции обменных процессов в организме наиболее предпочтительно использование аминопроизводного лигнина с группами полиэтиленimina.

**Введение.** Сахарный диабет (СД) относится к числу наиболее распространенных эндокринных заболеваний, характеризующийся нарушением всех видов обмена веществ: углеводного, жирового, белкового, минерального и водно-солевого. Консервативная стратегия лечения СД направлена на стабильную компенсацию углеводно-липидного обмена с помощью препаратов, сочетающих антиоксидантное, гиполипидемическое и гипогликемическое действие [1–3]. Однако отсутствие действенных лекарственных средств, способных обеспечивать адекватную нормализацию нарушенного гомеостаза, требует разработки вспомогательных методов коррекции метаболических нарушений при СД.

Одним из подходов может быть применение неинвазивных сорбционных технологий, привлекающих особое внимание исследователей как один из экспрессных, сравнительно простых и безопасных путей выведения токсических метаболитов из жидкостных сред организма [4–8]. Сорбционные эфферентные технологии получили широкое развитие благодаря разработке сорбционных материалов, отвечающих критериям избирательности к факторам патогенности, биосовместимости и доступности. При этом особое внимание уделяется сорбентам природного происхождения. Предполагается [9, 10], что химическая модификация позволит повысить их емкость и специфичность к метаболитам, обуславливающим патологический процесс.

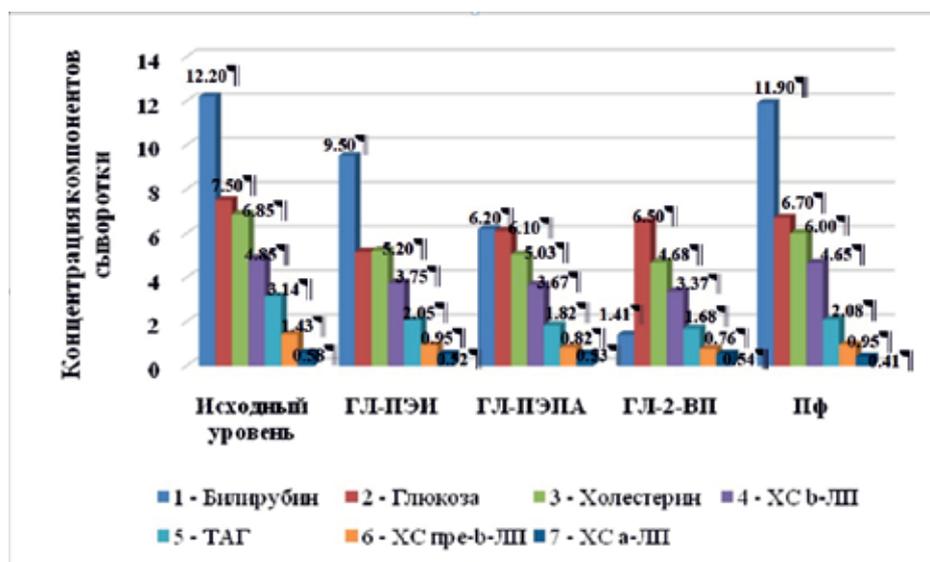
**Цель работы** — исследование сорбции водо- и липидорастворимых веществ из сыворотки крови диабетических больных химически модифицированными природными сорбентами на основе аминопроизводных лигнина и оценка эффективности их применения для коррекции углеводно-липидного статуса больных СД.

**Материалы и методы исследования.** Иониты синтезировали каталитическим *o*-алкилированием гидролизного лигнина (ГЛ) хлопковой шелухи эпоксидно-диановой смолой ЭД-20 с последующим аминированием полученного оксиранового производного полиэтиленимином (ПЭИ), полиэтиленполиамином (ПЭПА) и 2-винилпиридином (2-ВП).

Сорбцию осуществляли в статических условиях *in vitro* из свежей сыворотки крови больных, взятой утром натощак после 12-часового голодания. Биохимические показатели сыворотки до и после контакта с сорбентами определяли на УФ-спектрометре «Specord

210 plus» (Германия) при различных длин волн с использованием стандартных диагностических наборов реактивов фирмы «Vital Diagnostics» (Санкт-Петербург, Россия) и «Pliva-Lachema Diagnostika» (Чехия), скомпанованных в соответствии с международными требованиями. Уровень общего холестерина ( $XС_{общ}$ ) и его фракций устанавливали энзиматическим колориметрическим методом ( $\lambda = 510$  нм) по ферментативной реакции с холестеринэстеразой, холестериноксидазой и пероксидазой. Содержание ХС в  $\alpha$ -липопротеидных частицах ( $\alpha$ -ЛП) определяли также как и концентрацию  $XС_{общ}$  в прозрачном супернатанте после осаждения  $\beta$ -, пре- $\beta$ -ЛП фосфовольфраматом магния. Концентрацию атерогенных фракций ХС  $\beta$ -, пре- $\beta$ -ЛП рассчитывали по формуле Фридвальда [11]. Содержание триацилглицеридов (ТАГ) определяли по реакции Хантга [12], уровень глюкозы — глюкооксидазным, общего белка — биуретовым методом [13]. Количество общего билирубина в пробе устанавливали по цветной реакции Ван-ден-Берга с диазореактивом Эрлиха [13]. Для расчета использовали разность оптической плотности исследуемого и контрольного растворов и калибровочный график, отражающий зависимость оптической плотности стандартных растворов от содержания вещества в них.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Как видно из представленных данных (рис. 1), сыворотка крови больных СД характеризуется повышенным содержанием глюкозы и общих липидов, в том числе ТАГ и ХС, включая его атерогенные фракции, и сниженным уровнем антиатерогенных фракций ХС  $\alpha$ -ЛП по сравнению с нормой (табл.). Длительное патологическое содержание липидов в крови может привести к развитию структурных и функциональных изменений сосудов крупного, среднего и мелкого калибра [1–3], способствуя прогрессированию макро- и микроангиопатий (диабетическая ретинопатия, нефропатия, нейропатия и т. д.). Задача сорбции состоит в стабильной компенсации углеводно-липидного обмена путем удаления избыточных количеств эндогенных метаболитов, что позволит замедлить, а в лучшем случае устранить опасные сосудистые осложнения при СД.



**Рисунок 1 — Коррекция углеводно-липидного профиля сыворотки крови больных СД сорбентами на основе лигнина**

Введение химически активных групп в структуру природного биополимера — лигнина приводит к улучшению его сорбционных свойств. Модифицированные сорбенты с вве-

денными аминными, простыми эфирными и гидроксильными группами демонстрируют повышенную сорбционную способность к липопротеиновым комплексам ХС по сравнению с Полифепаном (Пф) — энтеросорбентом на основе немодифицированного древесного лигнина. При их использовании уровень ХС<sub>общ</sub> в сыворотке снижается более чем на 30 % и достигает 5,20–4,68 ммоль/л, что соответствует уровню оптимально скомпенсированного СД. Из указанного количества удаляемого ХС<sub>общ</sub> более половины приходится на долю транспортного ХС β- и преβ-ЛП, остальное — на «полезный» ХС α-ЛП. При этом степень извлечения атерогенных фракций ХС несколько выше на винилпиридиниевом ионите, чем на остальных образцах, содержащих группы алифатических полиаминов, что, вероятно, связано с дополнительной реализацией ионообменного механизма связывания стероидного метаболита четвертичными атомами азота пиридиниевого кольца. В аналогичных условиях Пф выводит из сыворотки 12,41 % ХС<sub>общ</sub>, большую часть которого составляет ангиопротективный ХС α-ЛП.

**Таблица — Углеводно-липидный профиль больных СД и критерии компенсации [14, 15]**

Показатель	Углеводно-липидный профиль		Критерии компенсации СД I и II типа		
	Здоровые	СД	оптимально	удовлетворительно	неудовлетворительно
Глюкоза, ммоль/л	< 4,2–6,1	—	4,4–6,7	8,9–11,1	> 16,7
ХС <sub>общ</sub> , ммоль/л	4,10 ± 0,08	5,40 ± 0,21	< 4,8	4,8–6,0	> 6,0
ХС β-ЛП, ммоль/л	2,40 ± 0,24	3,60 ± 0,15	< 3,0	3,0–4,0	> 4,0
ХС пре-β-ЛП, ммоль/л	0,31 ± 0,09	0,62 ± 0,07	—	—	—
ХС α-ЛП, ммоль/л	1,6 ± 0,3	1,1 ± 0,07	> 1,2	1,0–1,2	< 1,0
β-ЛП	36,1 ± 1,6	47,4 ± 2,7	—	—	—
ТАГ, ммоль/л	1,50 ± 0,23	2,8 ± 0,18	< 1,7	1,7–2,2	> 2,2

Коррекция липидного обмена протекает не только за счет снижения уровня ХС, но и существенного выведения ТАГ. В результате сорбции концентрация липида в сыворотке уменьшается в 1,5–2,0 раза по сравнению с исходной, что коррелирует с липидными показателями здоровых или больных СД в скомпенсированном состоянии (см. табл.). Наименьшую сорбционную активность проявляет Пф, при контакте с которым содержание ТАГ в сыворотке уменьшается от 3,15 ммоль/л до 2,08 ммоль/л.

Билирубин — продукт белкового обмена, образующийся при распаде сложного белка — гемоглобина, входящего в состав красных кровяных клеток — эритроцитов. Согласно полученным данным, степени извлечения билирубина определяются основностью ионитов и возрастают в следующем ряду: ГЛ-ЭД-20-ПЭИ < ЭД-20-ПЭПА < ГЛ-ЭД-20-2ВП. Практически количественное поглощение этого метаболита пиридиниевым ионитом указывает на значительный вклад в извлечение электростатических взаимодействий между ониевым сорбционным центром ионита и карбоксилат-анионами молекулы билирубина или его комплексов с альбумином.

Регуляция углеводного обмена эффективно осуществляется с помощью лигнинового ионита с группами ПЭИ. Содержание глюкозы при этом понижается от патологического уровня 7,50 ммоль/л до уровня здоровых — 5,20 ммоль/л. На остальных ионитах, в том числе Пф уровень глюкозы достигает критериев компенсации. Пф проявляет меньшую специфичность, снижая концентрацию глюкозы до 6,70 ммоль/л, что соответствует верхней границе оптимально скомпенсированного СД (4,40–6,70 ммоль/л).

**Заключение.** Таким образом, исследование детоксикационных свойств ионитов на основе ГЛ в отношении патологической сыворотки крови диабетических больных показало, что наиболее эффективным для коррекции углеводно-липидного профиля больных СД является среднеосновный ионит с группами ПЭИ. Он оказывает гипогликемический и гиполипидемический эффект, достаточный для достоверного снижения риска развития сосудистых осложнений при СД за счет сорбционного выведения избыточных количеств атерогенных фракций ХС, глюкозы и ТАГ. Недостаточная приемлемость пиридиниевого ионита обусловлена низкой специфичностью к глюкозе и высокой избирательностью к билирубину, что может иметь отрицательное влияние на биохимию печени, мочи и крови больных СД. Сорбент на основе аминопроизводного лигнина может быть эффективен для профилактики и комплексной терапии диабетических больных.

### Список литературы

1. Complex treatment of patients with pyo-necrotic complications of the neuropathic form of diabetic foot syndrome / В.М. Belik [et al.] // *J. Khirurgiia*. — 2020. — № 4. — P. 81–87.
2. Буланова, Е.Ю. Статинотерапия: доказательства, мнения экспертов, перспективы / Е.Ю. Буланова // *Лечебное дело*. — 2013. — № 3. — С. 59–77.
3. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова // *Сахарный диабет*. — 2019. — Т. 22, S. 1–1. — С. 1–144.
4. Enterosorption: current state and prospect on the future (a review) / V.G. Nikolayev [et al.] // *Bull. Prob. In Boil. & Med.* — 2007. — № 4. — P. 7–17.
5. Complex treatment of diabetes by using enterosorption / E.G. Dubovya [et al.] // *Efferent Therapy*. — 1996. — № 2. — P. 2–7.
6. Леванова, В.П. Лечебный лигнин / В.П. Леванова. — СПб.: Центр сорбционных технологий, 1992. — 136 с.
7. Innovative enterosorption methods. Enterosgel research. Collection of research papers. — London: EnteroMedLimited, 2015. — 56 p.
8. Зобнина, Н.Л. Изучение сорбции пирувата как предшественника кетоновых тел при сахарном диабете на препарате гидролизного лигнина / Н.Л. Зобнина // *Вятский медицинский вестник*. — 2015. — № 2. — С. 48–51.
9. Lignin — a useful bioresource for the production of sorption-active materials / T. Dizhbite [at al.] // *Biores. Technol.* — 1999. — Vol. 67, № 3. — P. 221–228.
10. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world / Kai Dan [et al.] // *Green Chem.* — 2016. — Vol. 18, iss. 5. — P. 1175–1200.
11. Freidwald, W.T. Estimation of the concentration of LDL-C in plasma without the use of the preparative ultracentrifuge / W.T. Freidwald, P.J. Levy, P.S. Fredrickson // *Clin. Chem.* — 1972. — Vol. 18. — P. 499–502.
12. Курашвили, Л.В., Бобылева Л.Н. Определение триглицеридов во фракции липопротеидов высокой плотности / Л.В. Курашвили, Л.Н. Бобылева // *Лаб. дело*. — 1991. — № 7. — С. 75–76.
13. Кочетов, Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочева. — М.: Высшая школа, 1980. — 272 с.
14. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus // *Diabetes Care*. — 1998. — Vol. 21, № 1. — P. 5–19.
15. Standards of Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus // *American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendation*. — 2001. — Vol. 24, № 1. — P. 58–61.

# APPLICATION OF CHEMICALLY MODIFIED NATURAL SORBENTS FOR REGULATION OF METABOLIC PROCESSES IN THE ORGANISM

---

*Chopabayeva N.N., Mukasheva A.G.*

*al-Farabi Kazakh National University,  
Almaty, Republic of Kazakhstan*

**Summary.** *The effectiveness of the chemically modified natural sorbents based on lignin was investigated for correction of the carbohydrate-lipid status of patients with diabetes mellitus. It was shown that detoxication activity of aminolignins depended on the nature of their functional groups. It was found that the lignin aminoderivative with polyethyleneimine groups was preferable to use for regulation of metabolic processes in the organism.*

## ОЦЕНКА ПРОТЕКТОРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС-САМЦОВ В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МОБИЛЬНОГО ТЕЛЕФОНА

*Чуешова Н.В., Чешик И.А.*

*Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Гомель, Республика Беларусь*

**Резюме.** Разработана рецептура средства, состоящего из О-ацетил-L-карнитина (3 мг/кг), витамина С (20 мг/кг), фруктозы (100 мг/кг) и сукцината Na (20 мг/кг), для эффективной коррекции и восстановления нарушений в репродуктивной системе крыс-самцов, вызванных воздействием электромагнитного излучения мобильного телефона (1745 МГц, ППЭ 0,2–20,0 мкВт/см<sup>2</sup>, 30 сут). Его применение приводит к увеличению количества сперматогоний, повышению жизнеспособности эпидидимальных сперматозоидов, нормализации их продукции и андрогенного статуса у облученных животных.

**Введение.** Беспрецедентное внедрение в жизнь различных слоев населения подвижной сотовой радиосвязи, радикально изменило ситуацию техногенного электромагнитного (ЭМ) загрязнения внешней среды и значительно увеличило воздействие ЭМП радиочастот (РЧ) на население [2]. Несмотря на низкую интенсивность этого вида излучения, воздействие которого носит нетепловой характер, оно обладает высокой биологической активностью [9], и важно исследовать, понимать и отслеживать любые неблагоприятные последствия этого воздействия для организма.

Определяющее значение в формировании патологических изменений [7] в репродуктивной системе (РС) при ЭМ воздействии мобильного телефона (МТ) во многом связывают с развертыванием процесса, получившего название окислительного стресса, возникающего в клетках в результате гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) [11]. АФК в тестикулярной ткани и сперме играет физиологическую роль в регулировании нормальной функции сперматогенеза, тогда как высокие уровни АФК вызывают повреждения ДНК и, как результат, снижение качества сперматозоидов. Кроме того, АФК способны повреждать многие биополимеры, в том числе нуклеопротеиды, ферменты, липиды и белки [8].

В связи с вышеизложенным, актуальным является поиск средств, обладающих антиоксидантными свойствами и способных корригировать изменения в репродуктивной системе, вызванные влиянием ЭМИ системами сотовой связи.

**Цель работы** — Разработать защитное средство, способное препятствовать развитию морфофункциональных изменений в репродуктивной системе крыс-самцов, вызванных влиянием ЭМИ МТ и оценить его протекторную эффективность.

**Материалы и методы исследования.** Исследования выполнены на 48 белых крысах-самцах линии Вистар в возрасте 50–52 сут. и массой  $190,2 \pm 1,8$  г на начало эксперимента. Все животные были разделены на четыре группы ( $n=6$ ): 1. — Контроль; 2 ЭМИ — животные, подвергнутые воздействию ЭМИ МТ на протяжении 30 сут; 3. БАВ — животные, получавшие комп-

лекс БАВ; 4. ЭМИ+ БАВ — подвергнутые влиянию ЭМП МТ и получавшие комплекс БАВ на протяжении всего срока облучения. Комплекс БАВ животные получали перорально утром натощак ежедневно с небольшой дозой каши (2,0 г индивидуально) в течение 30 дней. Анализ состояния репродуктивной системы крыс-самцов проводили на 1-е и 30-е сутки после прекращения воздействий.

Все животные содержались в оптимальных условиях (с обеспечением температурного, светового режима, полноценного питания, защиты от инфекций, шума и других помех окружающей среды) вивария Института радиобиологии НАН Беларуси согласно санитарным правилам норм 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Источником ЭМИ являлся мобильный телефон распространенной марки, подключенный к компьютеру с сервисной программой WinTesla, позволяющей управлять его работой. Условия облучения животных: несущая частота 1745 МГц, 8 час/день, фракциями по 30 мин с интервалом в 5 мин, в режиме имитации разговора, т.е. воздействие близкое по своим характеристикам к ЭМИ МТ, воздействующему на пользователя стандарта GSM 1800 в режиме разговора. Телефон размещался в центральной части рабочей зоны (1Ч0,7 м), в которой находились 4 пластиковые клетки с животными. Во время облучения осуществлялся дистанционный контроль наличия электромагнитного поля. Плотность потока электромагнитной энергии (ППЭ) в клетке измерялась прибором ПЗ-41 и находилась в пределах 0,2 — 20,0 мкВт/см<sup>2</sup>, (в зависимости от удаленности до антенны МТ), составляя в среднем — 7,5±0,34 мкВт/см<sup>2</sup>.

На 1 и 30 сутки после прекращения воздействий предварительно взвешенных животных декапитировали, после чего производили забор крови, выделяли семенники, эпидидимисы и семенные пузырьки. Содержание тестостерона в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ООО «Хема-Медика», РФ), используя микропланшетный фотометр TECAN SAFEIRE (Австралия). Массу репродуктивных органов измеряли на аналитических весах (Ohaus EX, Switzerland, с точностью 0,1 мг) — абсолютная масса семенников, эпидидимисов и семенных пузырьков (АМС, АМЭ, АМСП), с последующим расчетом их относительной массы (ОМ).

Источником сперматогенных клеток являлся левый семенник, который освобождали от туники и кровеносных сосудов и получали суспензию клеток. Определение их количества проводили с помощью проточного цитометра (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США) как описано ранее в работе Suresh R. (1992) [7]. Различные типы половых клеток, выявленных с помощью соответствующей интенсивности флуоресценции, содержащейся в них ДНК, были обозначены как «С» значения. В качестве диплоидного стандарта использовали лейкоциты периферической крови. По содержанию ДНК клетки были классифицированы как сперматогонии (2С), прелептотенные сперматоциты (сперматоциты в S-фазе), сперматоциты I порядка (4С), круглые (1С), удлинённые (НС1) и продолговатые сперматиды (НС2).

Из эпидидимиса выделяли сперматозоиды, количество которых подсчитывали в камере Горяева, определяли их жизнеспособность методом суправитального окрашивания эозин-нигрозинном [7]. Анализировали структуру хроматина сперматозоидов на наличие одно- и двухцепочечных разрывов цепи ДНК путем окрашивания акридиновым оранжевым — метод SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) по Evenson D. P. (2016).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием электронных таблиц Microsoft Office Excel 2016 и пакета статистических программ Graph Pad Prism 6.05.

Разность в значениях переменной отклика в группах оценивалась с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Множественные попарные сравнения осуществлялись с помощью процедуры Тьюки (Tukey's test). В статье данные по характеру распределения признаков в выборочных совокупностях представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ( $M \pm Sd$ ). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5% ( $p < 0,05$ ).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Для защиты и снижения эффектов влияния низкоинтенсивного ЭМИ диапазона РЧ на морфофункциональное состояние мужской РС, проведен поиск БАВ, и, разработана оригинальная рецептура препарата [5], содержащего на 1 кг массы тела животного 3 мг О-ацетил-L-карнитина, 20 мг витамина С, 20 мг сукцината Na и 100 мг фруктозы, обладающих антиоксидантными свойствами и способных корригировать метаболические нарушения в тканях [6, 1].

Первичная реакция РС экспериментальных животных оценивалась по изменению как их массы тела, так абсолютной и относительной массы семенников, эпидидимисов и семенных пузырьков. Статистический анализ полученных данных не показал значимых различий в исследуемых группах на 1 и 30 сутки после прекращения воздействия ЭМИ МТ и приема БАВ, что в данном случае подтверждает безопасность применения препарата в рекомендуемой дозировке отсутствием побочных и токсических эффектов.

Тем не менее, необходимо отметить просматриваемую тенденцию в повышении массы тела, абсолютных масс семенников и семенных пузырьков у животных в группе облучения. Введение комплексного препарата животным на протяжении всего срока воздействия ЭМИ МТ приводило к частичной нормализации массы указанных органов. Выявленные модифицирующие свойства исследуемого защитного средства сохранялись и в отдаленный период — 30 дней — после прекращения применения препарата и облучения животных.

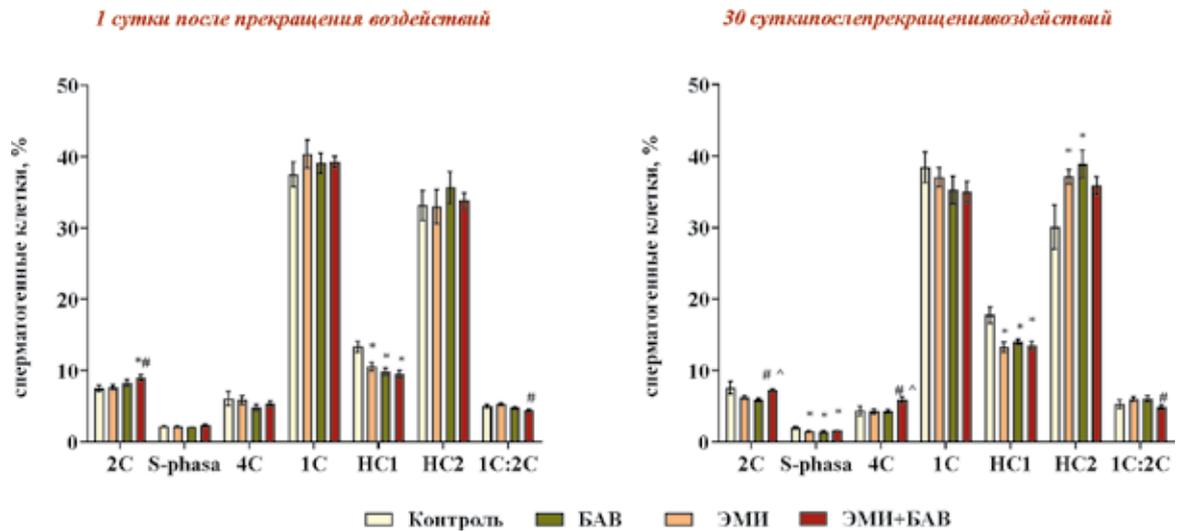
Выявление и анализ стадий клеточного цикла сперматогенеза позволяет исследовать фундаментальные закономерности жизни клеток, выявлять патологии, а также оценивать терапевтическую эффективность разрабатываемых препаратов, что имеет большое значение при изучении процессов роста, дифференцировки, старения, апоптоза клеток, а также при исследовании процесса канцерогенеза [3, 10].

Анализ количества сперматогенных клеток на стадиях дифференцировки, созревания и формирования, включающих митотическое и мейотическое деления, в условиях воздействия ЭМИ МТ указывает на нарушения процесса сперматогенеза более значительные на 30 сутки после прекращения облучения (рис. 1). Так, на 1 сутки после прекращения воздействия ЭМИ МТ в течение 30 дней обнаружено статистически значимое падение количества удлинённых сперматид на 21,1% ( $p=0,02$ ) по отношению к контролю, что указывает на торможение процессов трансформации сперматид в зрелые половые клетки.

В отдаленный срок — 30 суток после прекращения ЭМ экспозиции наблюдалось сохранение эффектов влияния данного фактора, характеризующихся снижением количества клеток начального звена сперматогенеза — сперматоцит в прелептотене на 26,0% ( $p=0,05$ ), а также удлинённых сперматид на 25,4% ( $p=0,002$ ) относительно контроля.

При изучении модифицирующих свойств разработанного нами комплекса БАВ было установлено, что при введении данного препарата в рацион питания самцам на протяжении 30 дней наблюдалось снижение количества удлинённых сперматид на 26,1% ( $p=0,003$ ) и не статистически значимое увеличение количества сперматогоний — клеток начального звена сперматогенеза — на 10,9%, что указывает на активацию пролиферирующей активности сперматогенного

эпителия. Спустя 30 суток после окончания введения препарата были обнаружены значительные изменения в количественном распределении клеток сперматогенного эпителия. Так, при значительном падении количества клеток начального звена сперматогенеза — сперматоцит в прелептотене (на 15,9%,  $p=0,03$ ), обнаружены нарушения в процессе трансформации удлинённых сперматид в продолговатые, количество которых соответствовало 78,9% ( $p=0,02$ ) и 129,2% ( $p=0,03$ ) по отношению к контрольному значению.



**Рисунок 1 — Количество сперматогенных клеток различных популяций на 1 и 30 сут после воздействия ЭМИ МТ и приема комплекса БАВ**

Примечание: здесь и далее \* — статистически значимые отличия от контроля, # — статистически значимые отличия к группе облучения, ^ — статистически значимые отличия к группе БАВ при  $p < 0,05$ , критерий Тьюки (Tukey's test)

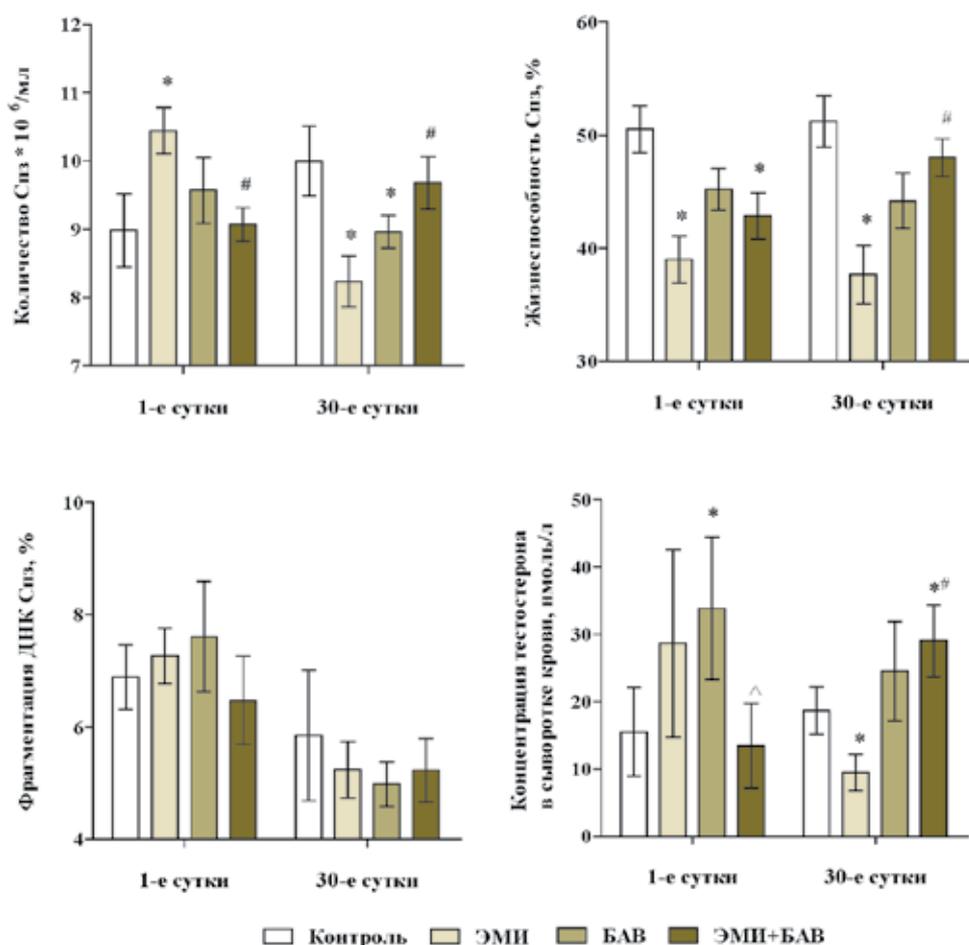
Введение комплекса БАВ животным на протяжении всего срока облучения приводило к активации пролиферирующей активности клеток начального этапа сперматогенеза, характеризующееся статистически значимым повышением количества сперматогоний на 17,9 ( $p=0,03$ ) при сравнении с группой облучения. Выявленная тенденция сохранялась и на 30 сутки после прекращения воздействий. Например, процент тетраплоидных клеток — сперматоцит I порядка — превышал количество таковых по сравнению с группой животных, подвергнутых только облучению, на 37,7% ( $p=0,05$ ) а сперматогоний — на 16,2% ( $p=0,009$ ).

Расчет индекса сперматогенеза как соотношение количества сперматогоний к круглым сперматидам (1C:2C) отражающий кинетику всего сперматогенного цикла указывает на значительные модифицирующие свойства БАВ (рис. 1). Отмечено, что введение в рацион питания защитного средства на протяжении всего срока воздействия ЭМИ МТ на организм крыс-самцов приводило к снижению индекса сперматогенеза как на 1 сутки (на 16,8%,  $p=0,02$ ), так и в отдаленный срок (на 18,6%,  $p=0,04$ ) после прекращения воздействий — 30 суток.

При изучении продукции зрелых половых клеток установлено статистически значимое увеличение количества сперматозоидов на 18,0% ( $p=0,05$ ) по сравнению с контрольной группой животных (рис. 2). Напротив, в отдаленный период — 30 суток, в группе облучения выявлено угнетение спермиогенеза на 17,6% ( $p=0,02$ ). Обнаружено падение жизнеспособности зрелых половых клеток как на 1, так и на 30 сутки, что составляло, соответственно 77,2 ( $p=0,003$ ) и 73,6% ( $p=0,003$ ) по отношению к контрольной группе.

Введение в рацион питания комплекса БАВ животным на протяжении всего срока облучения способствовало нормализации как продукции, так и качества сперматозоидов (рис. 2). На это указывает количество эпидидимальных сперматозоидов, которое приближалось к контрольному значению, и по отношению к группе облучения установленное снижение являлось статистически значимым, что соответствовало 100,4 (p=0,04) и 96,8% (p=0,04) на 1 и 30 сутки после прекращения применения препарата и облучения.

Введение животным БАВ на протяжении всего срока воздействия ЭМИ МТ способствовало повышению жизнеспособности сперматозоидов и наиболее значимо в отдаленный срок — 30 суток — на 27,4% (p=0,02) и при сравнении с группой облучения.



**Рисунок 2 — Количество, жизнеспособность, фрагментация ДНК сперматозоидов (Спз) и концентрация тестостерона в сыворотке крови крыс-самцов на 1 и 30 сутки после прекращения воздействия ЭМИ МТ и введения комплекса БАВ**

Электромагнитное воздействие в течение месяца приводило к незначительному увеличению (на 5,5 %) фрагментированных участков ДНК. Спустя 30 суток наличие поврежденной спермальной ДНК значительно ниже контрольного значения, что свидетельствует о недостаточности энергии излучения, чтобы вызвать прямое нарушение структуры ДНК в половых клетках. Введение в рацион питания комплекса БАВ облучаемым животным приводило к снижению фрагментации ДНК сперматозоидов, что обусловлено влиянием препарата, повышающего антиоксидантный статус и усиливающего защиту половых клеток от АФК.

Низкоинтенсивное ЭМИ МТ на протяжении 30 дней сказалось на усилении секреции тестостерона, проявляемое увеличением его концентрации в сыворотке крови на 85,2%, но

данное изменение не являлось статистически значимым. Напротив, в отдаленный срок - 30 суток, установлено значительное снижение данного показателя (на 49,1%), что указывает на влияние изучаемого стресс-фактора на работу клеток Лейдига, которые являются продуцентами тестостерона (рис. 2). Применение комплекса БАВ на протяжении всего срока облучения приводило к частичной нормализации уровня тестостерона при сравнении с контрольной группой животных. Так, если данный показатель на первые сутки составил 86,7% ( $p=0,03$ ), то на 30 сутки установлено его превышение на 55,9% ( $p=0,02$ ), а по отношению к группе облучения концентрация тестостерона увеличена более чем в 2 раза ( $p=0,0001$ ).

**Заключение.** Таким образом, применение, разработанного нами, комплекса биологически активных веществ, ежедневно в условиях влияния ЭМП МТ оказывало протекторное влияние на популяцию клеток начального этапа сперматогенеза, способствуя его восстановлению и улучшению качества зрелых половых клеток — сперматозоидов. Выявленная эффективность комплекса БАВ указывает на перспективность его использования для защиты мужской репродуктивной системы при воздействии электромагнитного излучения от средств коммуникаций, в том числе мобильной связи.

### Список литературы

1. Бажедомов, В. А. Нормализация акросомальной реакции сперматозоидов в результате комплексной терапии карнитином, фруктозой и лимонной кислотой / В. А. Бажедомов, М. А. Николаева, О. В. Теодорович // Проблемы репродукции. — 2003. — № 6. — С. 49–52.
2. Григорьев, Ю. Г. Мобильная связь и электромагнитная опасность для населения—современная оценка риска и прогноз на ближайшую перспективу / Ю. Г. Григорьев // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2018. — Т. 58, № 5. — С. 548–549.
3. Данилов, Р. К. Гистология человека в мультимедиа / Р. К. Данилов, А. А. Клишов, Т. Г. Боровая // Учебник для мед. вузов. — СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2003. — 362 с.
4. Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики терапии различных заболеваний / С. А. Шахмарданова [и др.] // Журнал фундаментальной медицины и биологии. — 2016. — № 3. — С. 16–30.
5. Радиопротекторное средство: пат. ВУ 13275 / Н. В. Чуешова, А. Е. Козлов, И. А. Чешик. — Оpubл. 30.12.2020.
6. Трухан, Д. И. Роль и место антиоксидантов в комплексной терапии мужского бесплодия / Д. И. Трухан, Д. Г. Макушин // Consilium medicum. — 2015. — Vol. 17, №. 7. — P. 37–43.
7. Чуешова, Н. В. Влияние электромагнитного излучения от мобильного телефона (1745 МГц) на состояние репродуктивной системы крыс-самцов в период их постнатального развития / Н. В. Чуешова, Ф. И. Висмонт, И. А. Чешик // Вес. нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. — 2019. — Т. 16, № 2. — С. 216–225.
8. Agarwal, A. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update / A. Agarwal, K. Makker, R. Sharma // American journal of reproductive immunology. — 2008. — Vol. 59, № 1. — P. 2–11.
9. Kesari, K. K. Radiations and male fertility / K. K. Kesari, A. Agarwal, R. Henkel // Reproductive Biology and Endocrinology. — 2018. — Vol. 16, №. 118. — P. 1–16.
10. Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients / J. Gual-Frau [et al.] // Human Fertility (Cambridge). — 2015. — Vol. 18, № 3. — P. 225–229.

11. Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation / I. Yakymenko [et al.] //Electromagnetic biology and medicine. — 2016. — Vol. 35, № 2. — P. 186–202.

## **EVALUATION OF THE PROTECTOR EFFICIENCY OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON THE STATE OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF RATS-MALES IN THE ENVIRONMENTAL INFLUENCE OF THE ELECTROMAGNETIC RADIATION OF THE MOBILE PHONE**

---

*Chueshova N., Cheshik I.*

*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Gomel, Republic of Belarus*

**Summary.** *Receiver has been developed based on O-acetyl-L-carnitine (3 mg/kg), vitamin C (20 mg/kg), fructose (100 mg/kg) and succinate Na (20 mg/kg) for effective correction and recovery disorders in the reproductive system of male rats caused by the impact of electromagnetic radiation of a mobile phone (1745 MHz, Pd 0,2-20,0  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , 30 days). Its use leads to an increase in the number of sperm, increasing the viability of epididymal spermatozoa, normalization of their products and androgenic status in irradiated animals.*

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ НА ФОНЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

*Шарафетдинов Х.Х., Плотникова О.А., Пилипенко В.В.,  
Кондратьева О.В., Ахматова Х.Р., Фролова Ю.В.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»,  
г. Москва, Российская Федерация*

**Резюме.** Исследованы показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) у пациентов с сахарным диабетом 2 типа на фоне гипокалорийной диеты с модификацией углеводного состава. Активность процессов ПОЛ оценивалось по уровню малонового диальдегида (МДА) и гидроперекисей липидов в сыворотке с определением ее антиоксидантной активности. В процессе комплексной терапии отмечено достоверное снижение содержания МДА в сыворотке крови в среднем на 25,3% от исходного уровня.

**Введение.** Результаты первого национального эпидемиологического кросс-секционного исследования NATION, проведенного в 8 федеральных округах РФ, охватившего 26620 человек, показали, что распространенность сахарного диабета (СД) 2 типа среди взрослого населения России составляет 5,4% (около 6 млн человек в данной возрастной группе), при этом более половины лиц, страдающих СД (54%), не знали о наличии у них заболевания [3]. РФ занимает седьмое место среди десяти стран с наибольшим количеством пациентов, страдающих СД.

Основными причинами фатальных событий у больных СД являются его поздние осложнения — нефропатия, ретинопатия, поражение магистральных сосудов сердца, головного мозга, периферических сосудов нижних конечностей [1].

Установлено, что ключевую роль в развитии макро- и микрососудистых осложнений, связанных с СД 2 типа играет оксидативный стресс [2, 8, 11, 13]. Свободнорадикальное окисление липидов является неотъемлемой частью таких жизненно важных процессов, как перенос электрона флавиновыми элементами, обновление состава липидов биомембран, окислительное фосфорилирование в митохондриях, митогенез, проведение нервного импульса и др. Как известно, радикалы гидроксила оказывают повреждающее, мутагенное или летальное воздействие на живые клетки из-за своей исключительно высокой реакционной способности. В биологических мембранах радикалы гидроксила инициируют реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), продуктами которых являются гидроперекиси липидов (ГПЛ) и малоновые диальдегиды (МДА). Избыточное образование продуктов ПОЛ оказывает повреждающее действие на уровне клеток, и их цитотоксичность связана с накоплением перекисей липидов в липопротеинах высокой плотности.

В последнее десятилетие пристальное внимание уделяется разработке персонализированных подходов к лечению СД 2 типа, в том числе путем использования в комплексной терапии специализированных пищевых продуктов (СПП) с оптимизированным химическим составом [5]. Создание СПП с модифицированным углеводным профилем, эффективность которых подтверждена результатами экспериментальных и клинических исследований, является важным

направлением диетологии и нутрициологии. Разработана рецептура СПП с модифицированным углеводным профилем, содержащего в своем составе пищевые ингредиенты, обладающие антиоксидантным действием.

Целью исследования было изучение показателей ПОЛ у пациентов с СД 2 типа в процессе комплексной терапии.

**Материалы и методы исследования.** Исследование выполнено на базе отделения болезни обмена веществ ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Все испытуемые были отобраны в соответствии с критериями включения и исключения. Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской Декларации. Протокол исследования был одобрен Комитетом по этике ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». От всех участников исследования было получено письменное информированное согласие.

Критерии включения: СД 2 типа; возраст от 35 до 69 лет; метаболическая субкомпенсация; отсутствие острых заболеваний желудочно-кишечного тракта и других острых состояний.

Критерии исключения: СД 1 типа; возраст менее 35 лет и старше 69 лет; метаболическая декомпенсация; инсулинопотребность; острые или обострения хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта и другие острые заболевания.

Обследованы 30 пациентов с СД 2 типа, которые были разделены на 2 однотипные по возрасту и длительности заболевания группы (по 15 чел. в каждой): основная группа и группа сравнения. У всех пациентов было выявлено ожирение различной степени. Ожирение I степени отмечалось — у 18,5% пациентов, у 25,9% - II степени и у 55,6% - III степени.

Клиническая характеристика включенных в исследование пациентов СД 2 типа представлена в табл. 1.

**Таблица 1 — Клиническая характеристика пациентов СД 2 типа (M±m)**

Показатель	Основная группа	Группа сравнения
Возраст, годы	60,3±1,86	61,1±3,50
Длительность заболевания, годы	8,0±0,89	7,85±0,76
Масса тела, кг	113,04±5,96	114,09±6,53
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	42,10±2,02	42,45±1,95
Базальная гликемия, ммоль/л	7,37±0,52	7,01±0,54
HbA1c, %	6,13±0,17	6,1±0,19

92,5% пациентов получали комбинированную пероральную сахароснижающую терапию метформином, ингибиторами дипептидилпептидазы-4, ингибиторами натрий-глюкозных ко-транспортеров 2-го типа, из них 54% находились на терапии метформином.

В течение 14 дней все пациенты получали стандартную гипокалорийную диету (1550 ккал/сут). Пациенты основной группы получали СПП в виде напитка (30 г сухой смеси на 150 мл воды) на второй завтрак вместо углеводсодержащего блюда. В состав СПП с модифицированным углеводным профилем включены мальтит, мононенасыщенные жирные кислоты, концентрат белка молочной сыворотки, молочный белок (казеин), среднецепочечные триглицериды, цитрат калия, комплекс полифенолов, лактат магния, карбонат кальция, инулин, пектин, ароматизатор натуральный «Клубника», ароматизатор натуральный «Ваниль», премикс витаминный (С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, РР, фолиевая кислота, пантотеновая кислота, А, D<sub>3</sub>, Е, К<sub>1</sub>, биотин), премикс минеральный (железо, цинк, медь, марганец, хром, селен, йод, молибден), краситель концентрат свекольного сока, подсластитель «Стевилия Е» (эритритол (Е968), экстракт стевии (Е960)).

Определение содержания ГПЛ в сыворотке крови проводили по методике [10]: к 100 мкл сыворотки приливали 900 мкл реактива FOX (0,25mM FeSO<sub>4</sub>, 25mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1mM ксиленол-оранж) и инкубировали при комнатной t в течение 30 мин при постоянном встряхивании. Далее реакцию смесь центрифугировали при 15000 g в течение 10 минут и определяли содержание гидроперекисей липидов в супернатанте спектрофотометрическим методом при длине волны 560 нм, используя калибровочную кривую H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

В основе методики определения содержания МДА в сыворотке крови лежит реакция между МДА и тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием триметинового комплекса. Определение содержания МДА в сыворотке крови проводили по методу [12]. В центрифужную пробирку, содержащую 0,2 мл сыворотки крови, добавляли 3,0 мл 2,0% ортофосфорной кислоты и 1,0 мл 0,8% раствора ТБК с последующим инкубированием на водяной бане при 100 °С в течение 45 мин. Далее пробы охлаждали, вносили по 3,0 мл н-бутанола и содержимое каждой пробирки тщательно встряхивали до образования белой суспензии с последующим центрифугированием в течение 25 мин при 4000 об/мин. Определение оптической плотности проводили в окрашенных супернатантах при длине волны 535 нм с коррекцией при длине волны 580 нм. В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции МДА  $\varepsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Антиоксидантную активность (АОА) оценивали по способности системы Fe<sup>3+</sup>-TPTZ восстанавливаться до формы Fe<sup>2+</sup>-TPTZ используя тест-систему FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) [6]. Исследуемый материал в количестве 62 мкл вносили в реакционную среду общим объемом 1,86 мл, содержащую 0,83 мМ 2,4,6-трипиридил-s-триазин (TPTZ) и 1,67 мМ FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O в 0,25 М ацетатном буфере рН 3,6 с последующим измерением оптической плотности при длине волны 593 нм в течение 4 мин.

Результаты исследования статистически обработаны с использованием программы SPSS 22.0 для Windows. Все результаты представлены в виде средних величин и их стандартной ошибки (M±m). Достоверность различий средних величин оценивали по критерию Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Динамика показателей ПОЛ у больных СД 2 типа на фоне лечения представлена в табл.2.

**Таблица 2 — Динамика показателей ПОЛ у больных СД 2 типа на фоне лечения (M±m)**

Показатель	Основная группа		Группа сравнения	
	1	2	1	2
ГПЛ, мкмоль/мл	0,080±0,045	0,082±0,04	0,100±0,02	0,095±0,023
МДА, мкмоль/л	2,734±0,276	2,042±0,231*	2,615±0,593	2,755±0,796
АОА, μM	1123,0±195,5	1146,8±203,1	1294,1±262,9	1350,9±324,7

Примечание: 1 — до лечения, 2 — после курса лечения; \* - p<0,05 изменение показателя по сравнению с исходным уровнем.

Из табл.2 следует, что в основной группе на фоне лечения отмечено достоверное снижение содержания МДА в сыворотке крови в среднем на 25,3% от исходного уровня (p<0,05); в группе сравнения динамика показателей ПОЛ была менее выраженной и статистически не значимой.

Отмеченный антиоксидантный эффект комплексной терапии у больных основной группы, по-видимому, связан с включением в состав СПП с модифицированным углеводным

профилем комплекса полифенолов, витаминов А и Е, оказывающих благоприятное влияние на факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний [7] и обладающих антиоксидантным действием [4, 9].

**Заключение.** Проведенные исследования позволяют заключить, что включение СПП с модифицированным углеводным профилем в гипокалорийный рацион сопровождается статистически значимым снижением уровня МДА у больных СД 2 типа, и, таким образом, позволяет снизить риск развития системных сосудистых осложнений при этом заболевании.

Научно-исследовательская работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания.

Конфликт интересов не заявляется.

### Список литературы

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. 9-й выпуск (дополненный). М.: 2019, DOI:10.14341/DM221S1.
2. Аметов, А.С., Владимиров, Ю.А., Проскурнина, Е.В., Прудникова, М.А. Клиническая эффективность фенофибрата в коррекции оксидативного стресса у пациентов с диабетической нейропатией и сахарным диабетом 2 типа. Эндокринология. Новости. Мнения. Обучение. 2016; 1 (14): 65-72.
3. Дедов, И.И., Шестакова, М.В., Галстян, Г.Р. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование NATION). Сахарный диабет. 2016; 19 (2): 104-112. doi.org/10.14341/DM2004116-17
4. Джафарова, Р.Э., Гараев, Г.Ш., Джафаркулиева, З.С. Действия экстракта листьев черники обыкновенной на течение патологического процесса аллоксан-индуцированного сахарного диабета. Фундаментальные исследования. 2010; 4: 36-43.
5. Тутельян, В.А., Шарафетдинов, Х.Х., Кочеткова, А.А. Теоретические и практические аспекты диетотерапии при сахарном диабете 2 типа. М.: БИБЛИО-ГЛОБУС, 2016. DOI 10.18334/9785990927896
6. Benzie, I.F.F. Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay. Anal. Biochem. 1996; 239 (1): 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
7. Chong, M.F.-F., Macdonald, R., Lovegrove, J.A. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. British Journal of Nutrition. 2010; 104 (Suppl.3): S28–S39. doi.org/10.1017/S0007114510003922
8. Giacco, F., Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res. 2010 Oct 29; 107 (9): 1058-1070. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
9. Huang, H.Y., Appel, L.J., Croft, K.D. et al. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr. 2002; 76 (3): 549-555. DOI: 10.1093/ajcn/76.3.549
10. Nourooz-Zadeh, J. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. Methods Enzymol. 1999; 300: 58-62. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)00113-5
11. Shah, M.S., Brownlee M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes Circ Res. 2016; 118 (11): 1808-1829. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306923
12. Uchiyama, M., Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal.Biochem. 1978; 86 (1): 271-278. doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1
13. Yan, L.-J. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. J. Diabetes Res. 2014; 2014: 137919. DOI: 10.1155/2014/137919

## CHANGE OF LIPID PEROXIDATION INDICATORS ON THE BACKGROUND OF COMPLEX TREATMENT OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS

---

*Sharafetdinov Kh.Kh., Plotnikova O.A., Pilipenko V.V.,  
Kondratieva O.V., Ahmatova Kh.R., Frolova Y.V.*

*Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety,  
Moscow, Russian Federation*

**Summary.** *The parameters of lipid peroxidation (LP) in patients with type 2 diabetes mellitus on the background of a hypocaloric diet with modified carbohydrate composition were studied. The activity of LP processes was assessed by the level of malondialdehyde (MDA) and lipid hydroperoxides in serum, with the determination of its antioxidant activity. In the course of complex therapy, a significant decrease in the MDA content in the blood serum was noted by an average of 25.3% from the initial level.*

## ТАУРИН И КАТИОНЫ ЦИНКА — МОДУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА И ЦИТОПРОТЕКТОРЫ

---

*Шейбак В.М., Шейбак Л.Н., Павлюковец А.Ю., Николаева И.В.*

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

**Резюме.** Таурин является одной из наиболее распространенных аминокислот в ЦНС и играет важную роль в интеграции таких физиологических процессов, как осморегуляция, нейропротекция и нейромодуляция. Цинк — необходимый микроэлемент для нормального роста клеток, их развития и дифференциации, является компонентом каталитического центра более чем 300 ферментов, определяет структуру факторов транскрипции, участвуя, таким образом, в синтезе ДНК, РНК, делении клеток. Сочетание в одном лекарственном средстве органической соли микроэлемента цинка (цинка диаспартат) и относительно незаменимой полифункциональной аминокислоты таурина биохимически и фармакологически обосновано. Предполагается, что входящие в его состав компоненты будут взаимно усиливать цитопротекторные и корректирующие метаболизм свойства друг друга, особенно при патологических состояниях, развивающихся в быстро обновляемых эпителиальных тканях.

В последние годы получены убедительные доказательства важной роли обеспеченности организма таурином для профилактики развития многих патологических процессов. Таурин оказывает позитивное действие при многих патологических процессах, благодаря осморегуляторной, антиоксидантной, мембраностабилизирующей и тормозной нейромедиаторной функции. Имеются данные о том, что таурин — важный регулятор функционирования эндотелия сосудов и тромбоцитов [13]. Дополнительное введение таурина предупреждает развитие гипертензии и атеросклероза. Потребление продуктов, содержащих большие количества таурина, снижает риск и частоту сердечно-сосудистых заболеваний и увеличивает продолжительность жизни. Доказано, что риски поражения сердечно-сосудистой системы существенно ниже у лиц с более высокой экскрецией с мочой таурина и магния. Таурин эффективен для предупреждения алкогольного и, особенно, неалкогольного стеатозогепатита [3].

Таурин — одна из наиболее распространенных внутриклеточных непротеиногенных аминокислот у человека. Частота эндогенной недостаточности таурина намного выше, чем это можно было предполагать, исходя из уровня этой аминокислоты в плазме крови. Организм человека ограничен в способности синтезировать таурин и при повышенной потребности в серосодержащих аминокислотах, он становится незаменимым нутриентом.

Поскольку таурин не включается в белки плазмы, его недостаточность не может оцениваться по азотистому балансу или другим косвенным методам оценки синтеза белка. Таурин выполняет широкий спектр биологических функций, как на клеточном, так и на субклеточном уровнях. Таурин модулирует различные физиологические функции, которые могут нарушаться при воспалительных и дистрофических состояниях: участвует в нейромодуляции, а на ранних этапах развития является нейротрансмиттерной аминокислотой; влияет на активность фоторецепторов, эндокринные функции (в первую очередь гипофиза и поджелудочной железы), проявляет антиоксидантную активность и осуществляет контроль за клеточной дифференциацией

и ростом. Антиоксидантное и осморегулирующее действие таурина играет важную роль в профилактике прогрессирования атеросклероза и диабетических ангиопатий [1].

Таурин непосредственно влияет на антиоксидантную систему клетки и за счет образования N-хлортаурина, что способствует удалению супероксидных радикалов. Таурина хлорамин высокоактивен в ингибировании образования супероксидных радикалов. Воздействуя на процессы фосфорилирования, хлортаурин способствует снижению продукции фактора некроза опухоли- $\alpha$ , синтеза NO в макрофагах и образования пероксинитрита. Помимо этого, таурин ингибирует синтез активных молекул перекисей и супероксидных анионов, образующихся под влиянием гомоцистеина. Он также устраняет блокирующий эффект гомоцистеина на активность  $Ca^{2+}$ -АТФазы и способствует оптимизации активности супероксиддисмутазы. Это значительно уменьшает выраженность окислительного стресса и вызываемого им повреждения тканей [9].

В настоящее время на основе таурина создан ряд лекарственных средств («таукард», «тауфон», таурин, «тавамин» и другие), широко используемых в медицине для лечения различных патологических состояний (поражения печени, почек, миокарда, сетчатки глаза, а также для лечения и профилактики метаболического синдрома и т.д.). Таурин — обязательный компонент питательных смесей для новорожденных и для парентерального питания [11]. Мозг плодов крыс с задержкой внутриутробного развития (ЗВУР), имеет низкий уровень таурина и добавка таурина беременным крысам способствует восстановлению мозга и уменьшает степень развития ЗВУР путем: активации сигнального пути PKA-CREB, увеличения экспрессии нейротрофических факторов и стимуляции пролиферации клеток, чтобы противодействовать потере нейронов, вызванной ЗВУР; снижением апоптоза нейронов у эмбрионов крыс со ЗВУР путем повышения соотношения Bcl-2/Bax и снижения регуляции экспрессии каспазы-3; улучшением пролиферации и дифференцировки стволовых клеток нейронов [5].

Комплексный анализ химических, биохимических и функциональных свойств цинка в организме млекопитающих указывает на то, что он является классическим цитопротектором. Цинк необходим для функционирования более чем 300 ферментов. В частности, он непосредственно участвует в катализе и способствует катализу ферментами, которые контролируют многие клеточные процессы, включая синтез ДНК, нормальный рост, развитие головного мозга, поведенческие реакции, репродукцию, развитие плода, стабильность мембран, образование костной ткани и регенерацию. Цинк-содержащие белки представлены 10% генома человека и до 30% генома прокариотов [4].

Цинк, вследствие своих физико-химических свойств, обеспечивает структуру белков, участвующих в репликации ДНК и обратной транскрипции. Катионы цинка необходимы для экспрессии генетической информации, хранения, синтеза и действия пептидных гормонов (инсулин, тимулин), сохранения структуры хроматина и целостности биомембран. Этот металл регулирует как ферментативную активность, так и конформацию белков. Для регуляции его динамической доступности у эукариот имеется компартментализованный цинк, и, одновременно, пара металлотионеин/тионеин, которые контролируют пико- и наномолярные концентрации метаболически активного внутриклеточного цинка. Цинк — модулятор процессов клеточной сигнальной трансдукции, а также нейротрансмиссии в Zn-содержащих нейронах переднего мозга [4].

Биологическая незаменимость цинка основана на существовании гомеостатических механизмов, которые регулируют его абсорбцию, распределение, клеточное потребление и экскрецию. Хотя катионы цинка непосредственно не способны связывать свободные радикалы, но,

стабилизируя структуры клеточных мембран, формируя активный центр супероксиддисмутазы и сохраняя тканевые концентрации металлотионеина, повышает антиоксидантный потенциал клеток. В целом, цинк осуществляет защиту биологических структур от повреждения свободными радикалами путем: 1) поддержания высокого уровня металлотионеина (скэвенджер свободных радикалов); 2) активации супероксиддисмутазы; 3) сохранения тиолов и предупреждения взаимодействия между химическими группами и железом с образованием свободных радикалов [12].

Поскольку цинк необходим для стабилизации ДНК, поэтому его содержание в ядре выше, чем в других органеллах и цитозоле. Возможно, что внутриклеточные уровни цинка повышаются и вытесняют железо из нуклеопротеинов, что препятствует повреждению ДНК свободными радикалами. Есть мнение, что канцерогенное действие некоторых тяжелых металлов обусловлено вытеснением цинка из цинк-фингерных факторов транскрипции. Высвобождающиеся свободные радикалы повреждают ДНК. Показано, что замещение цинка железом из двух Zn-фингеров в транскрипционном факторе рецептора эстрогена в присутствии  $H_2O_2$  и аскорбата, генерирует высокоактивные свободные радикалы, вызывающие расщепление ДНК в участках, несущих информацию о рецепторе [12].

Недостаточность цинка вследствие длительного его низкого поступления в организм или чрезмерных некомпенсируемых потерь, снижает устойчивость организма к окислительному стрессу. Она также сопровождается активацией липопероксидации в мембранах эндоплазматического ретикулума и митохондрий, оказывает негативное действие на плазматические мембраны.

Апоптоз индуцируется рядом внеклеточных и внутриклеточных сигнальных механизмов, среди которых важное значение имеет  $Zn^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ . Дисрегуляция апоптоза занимает центральное место в патогенетических механизмах многих заболеваний, включая поражение печени, задержку внутриутробного развития плода, нейродегенеративные заболевания, СПИД, аутоиммунные состояния и злокачественные новообразования. Ускорение процессов апоптоза *in vivo* может быть прямым или непрямым следствием снижения внутриклеточной концентрации цинка. Недостаточность металла приводит к повышению активности апоптоз-специфических протеаз (каспаз), которые могут активировать апоптотические эндонуклеазы, вызывающие типичную межнуклеосомную фрагментацию ДНК [15].

Цинк является важным фактором для иммунной системы. Он транспортируется в связанном с белками виде, преимущественно с альбумином,  $\alpha_2$ -макроглобулином, трансферрином. Биологически активен только свободный  $Zn^{2+}$ . Функция  $\alpha_2$ -макроглобулина регулируется самим  $Zn^{2+}$ . Цинк изменяет структуру  $\alpha_2$ -макроглобулина и повышает степень его взаимодействия с цитокинами, протеазами, и, таким образом, опосредованно влияет на иммунитет.

Нарушения иммунитета — неизбежные последствия недостаточности цинка, являются наиболее частой причиной вторичного иммунодефицита у человека и животных. Сниженный хемотаксис нейтрофилами и моноцитами, нарушения клеточно-опосредованных иммунных реакций (включая эндокринную активность тимуса) и активности натуральных киллеров, продукции цитокинов — неизбежные спутники недостаточности цинка. Снижается также активность внетимических печеночных НК-клеток при старении, поскольку основное количество  $Zn^{2+}$  связано в печеночными металлотионеинами. Особенно важен  $Zn^{2+}$  для функционирования гормона тимуса тимулина, участвующего в созревании и дифференцировке Т-клеток [10].

Недостаточность цинка вызывает нарушения гемостаза, вследствие торможения агрегации тромбоцитов, снижения числа Т-лимфоцитов и ответа Т-лимфоцитов на фитомитогены. Недо-

статочность цинка сопутствует многим заболеваниям желудочно-кишечного тракта и почек, анемии и алкоголизму, некоторым типам опухолей и СПИД, ожогам и т.д. При старении нарушение иммунитета может иметь целый ряд причин, среди которых важную роль играют нарушения нейроэндокринной функции и активация регулируемого цинком апоптоза [10].

Клинические наблюдения показывают, что концентрация цинка в плазме пациентов с эзофагитом снижена. В желудке недостаточность цинка приводит к повышению объема желудочной секреции, кислотности и количества пепсина. Это способствует развитию стрессовых язв желудка. Кроме того, системный дефицит цинка способствует развитию повреждения мукозы желудка за счет повышения секреции тучными клетками гистамина, что стимулирует высвобождение соляной кислоты и пепсина.

Низкая биодоступность цинка наряду с недостаточным потреблением, характерна для пожилых людей. Это является фактором риска возникновения инфекций. Поскольку цинк влияет на рецепторы к тиреоидным гормонам и модулирует функции головного мозга (синаптическая трансмиссия), очевидно, что низкая биодоступность цинка может способствовать нарушению когнитивных функций.

Несомненно, что эффективность добавок цинка зависит от дозы и длительности приема. Длительный прием высоких доз цинка приводит к его кумуляции с повреждением клеток иммунной системы. С другой стороны, физиологические уровни цинка (12 мг  $Zn^{2+}$  в день) в течение короткого периода (1 мес.) восстанавливают иммунную функцию при синдроме Дауна и СПИД. Вероятность возникновения оппортунистических инфекций при этом значительно снижается. Очевидно, что добавки цинка могут быть полезны для снижения частоты инфекционных осложнений и восстановления функционирования иммунной системы в неонатальном и пожилом возрасте. Кроме того, это препятствует развитию дегенеративных состояний лиц у пожилого возраста [2].

В настоящее время зарегистрированных и внесенных в фармакопеи соединений цинка относительно немного. Среди них наиболее известны окись цинка, цинка сульфат и цинка диаспартат. Вместе с тем, лекарственных средств, содержащих соединения цинка в виде дополнительных компонентов, достаточно много и показания к их применению чрезвычайно широкие [4].

Цинка карнозин, цинк-метионин и цинка аспартат, медленно гидролизующиеся органические комплексные соединения цинка, являются эффективными цитопротекторами. Серия подобных исследований начиналась с цинка сульфата, позже изучены цинка хлорид, цинка аспартат и цинка глицинат.

Показано, что длительное назначение цинк-дефицитным морским свинкам рациона, обогащенного цинка сульфатом или цинком, связанным с аминокислотами (глицин, гистидин, метионин), равноэффективно нормализует концентрации этого микроэлемента в плазме и органах животных. Однако цинк-аминокислотные комплексы гораздо эффективнее нормализуют иммунный статус организма, чем  $ZnSO_4$ . Цинка аспартат был одним из четырех тестируемых органических солей цинка, который не ингибировал регрессию роста опухоли человека, индуцированную радиотерапией, а также ксенотрансплантата у иммуносупрессивных мышей [15].

Несмотря на большой объем информации о биологических свойствах цинка, возможности практического использования его препаратов явно недооцениваются. Одной из причин является отсутствие комплексного нетоксичного полифункционального препарата, назначение которого явилось бы эффективным дополнением к специфической терапии. Многие из клинических

проявлений у длительно и тяжело болеющих пациентов обусловлены системной недостаточностью двух полифункциональных соединений — таурина и цинка. Очевидно, что, контролируя и/или модулируя разнообразные физиологические клеточные процессы, включая основные сигнальные системы с участием  $\text{Ca}^{2+}$ , цинк и таурин не могут не взаимодействовать на уровне конкретных молекулярных клеточных механизмов.

Действительно, в последние годы показано существование ферментов, регуляция активности которых в клетках зависит от концентрации цинка и таурина. Эти две молекулы совместно осуществляют цитопротекцию, регулируя потоки кальция в клетке, обеспечивая функционирование рецепторов и препятствия апоптозу [7,8].

Применение цинк-аминокислотного комплекса позволяет реализовать специфические метаболические функции цинка на уровне отдельных тканей организма. В частности, при болезни Альцгеймера обнаружено снижение уровня цинка в гиппокампе. Использование цинк-аминокислотного комплекса, который проникает в ЦНС, предупреждает синтез амилоидного белка, нейротоксичность других катионов, изменения структуры ДНК, а также регулирует активность цинк-содержащих ферментов нейрональной детоксикации и метаболизм нейротрансмиттеров. Постулировано существование цинк-тауринового комплекса, с высоким сродством цинка в качестве промежуточного интермедиата между глутаматдегидрогеназой и кальций-связывающими белками, что объясняет ряд, на первый взгляд неожиданных биохимических и физиологических эффектов таурина [6, 14].

Таким образом, сочетание в одном лекарственном средстве органической соли микроэлемента цинка (цинка диаспартат) и относительно незаменимой полифункциональной аминокислоты таурина биохимически и фармакологически обосновано. Предполагается, что входящие в его состав компоненты будут взаимно усиливать цитопротекторные и корригирующие метаболизм свойства друг друга, особенно при патологических состояниях, развивающихся в быстро обновляемых эпителиальных тканях.

### Список литературы

1. Острый эффект однократного введения таурина: специфический или неспецифический? // В.М. Шейбак [и др] // Вестник Витебского государственного медицинского университета. — 2019. — Т. 18, № 2. - С. 37-43.
2. Шейбак, В. М. Биологическая роль цинка при алкогольном и вирусном поражении печени (обзор литературы) / В.М. Шейбак, М.В. Горецкая, А.Ю. Павлюковец // Проблемы здоровья и экологии. — 2013. — Том 36, №2. — С.14-20.
3. Шейбак, В.М. Биосинтез и обмен таурина. / В.М. Шейбак, Л.Н. Шейбак // Журнал ГрГМУ — 2015. - №1. — С. 9-12.
4. Шейбак, В.М. Биологическое значение и регуляция гомеостаза цинка у млекопитающих / В.М. Шейбак // Проблемы здоровья и экологии. — 2016. — Том 50, №. 4. — С. 11-16.
5. Antenatal taurine supplementation improves cerebral neurogenesis in fetal rats with intrauterine growth restriction through the PKA-CREB signal pathway. / J. Liu [et al.] // Nutr Neurosci. — 2013. — Vol. 16. — P.282–287.
6. Combination of taurine with zinc diaspertate for correction of metabolism disturbances in nephrons and renal function in rats with contrast-induced nephropathy. / O.N. Basalai [et al.] // Eksp Klin Farmakol. — 2015. Vol 78., N11. — P. 12-14.
7. Dietary taurine reduces zinc-induced toxicity in male Wistar rats. / Y.H. Yeh [et al.] // J Food Sci. — 2011. — Vol. 76, N4. — P.90-98.

8. Gastroprotective effect of taurine zinc solid dispersions against absolute ethanol-induced gastric lesions is mediated by enhancement of antioxidant activity and endogenous PGE2 production and attenuation of NO production. / C. Yu [et al.] // Eur J Pharmacol. — 2014. — Vol. 740. — P.329-336.
9. Jong CJ, Azuma J, Schaffer S. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. / C.J. Jong, J. Azuma, S. Schaffer // Amino Acids. — 2012. — Vol. 42, N6. — P. 2223-2232.
10. Kogan, S. Zinc and Wound Healing: A Review of Zinc Physiology and Clinical Applications. / S. Kogan, A. Sood, M.S. Garnick // Wounds. — 2017. — Vol. 29, N4. — P.102-106.
11. Metabolomic Research on Newborn Infants With Intrauterine Growth Restriction / J.Liu [et al.] // MD, PhD Medicine (Baltimore). — 2016. — Vol.95, N17. — P. 35-64.
12. The role of zinc in the prevention of diabetic cardiomyopathy and nephropathy./ B. Li [et al.] // Toxicol Mech Methods. — 2013. — Vol. 23, N1. — P.27-33.
13. Physiological role of taurine--from organism to organelle. // I.H. Lambert [et al.] // Acta Physiol (Oxf). — 2015. — Vol. 213, N1. — P. 191-212.
14. Taurine zinc solid dispersions attenuate doxorubicin-induced hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats. / Y. Wang [et al.] // Toxicol Appl Pharmacol. — 2015. — Vol. 289. — P.1-11.
15. Zinc and Its Transporters in epigenetics. / Brito S. [et al.] // Mol Cells. — 2020. — Vol. 43, N4. — P.323-330.

## **TAURINE AND ZINC CATIONS - METABOLISM MODULATORS AND CYTOPROTECTORS**

---

***Sheibak V.M., Sheibak L.N., Pavlyukovets A.Yu., Nikolaeva I.V.***

*Grodno State Medical University, Republic of Belarus*

***Summary.*** Taurine is one of the most abundant amino acids in the central nervous system and plays an important role in the integration of physiological processes such as osmoregulation, neuroprotection, and neuromodulation. Zinc is an essential trace element for the normal growth of cells, their development and differentiation, is a component of the catalytic center of more than 300 enzymes, determines the structure of transcription factors, thus participating in the synthesis of DNA, RNA, and cell division. The combination in one drug of an organic salt of a trace element zinc (zinc diaspertate) and a relatively irreplaceable polyfunctional amino acid taurine is biochemically and pharmacologically justified. It is assumed that its constituent components will mutually enhance the cytoprotective and metabolism-correcting properties of each other, especially in pathological conditions developing in rapidly renewing epithelial tissues.

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ДЕЙСТВИИ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПЕРОКСИСОМ

*Шляхтун А.Г.<sup>1</sup>, Радута Е.Ф.<sup>1</sup>, Сутько И.П.<sup>1</sup>, Богдевич Е.В.<sup>1</sup>,  
Каспер Е.В.<sup>1</sup>, Семененя И.Н.<sup>1</sup>, Турсунходжаева Ф.М.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие  
«Институт биохимии биологически активных соединений*

*Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь*

*<sup>2</sup>Институт химии растительных веществ имени академика С.Ю. Юнусова  
Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент, Республика Узбекистан*

**Резюме.** Исследовано влияние некоторых агонистов рецепторов пролиферации пероксисом на функциональное состояние митохондрий синаптосомальной фракции больших полушарий головного мозга при хронической алкогольной интоксикации у крыс. Полученные данные показывают, что исследованные агонисты PPAR рецепторов оказывают протекторное действие на митохондрии при алкогольной интоксикации, сохраняя скорости митохондриального дыхания и активности комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий на уровне контрольных значений.

**Введение.** Проблемы алкогольной зависимости и неумеренного потребления алкоголя остаются актуальными для Республики Беларусь. Чрезмерное потребление этанола дозозависимо вызывает двигательные и поведенческие изменения в результате депрессивного воздействия на ЦНС и системы нейромедиации [8]. Известно, что на клеточном уровне этанол нарушает передачу сигналов нейротрансмиттеров [7], увеличивает выработку активных форм кислорода и азота [3], а также инициирует процессы нейровоспаления [4]. Однако лишь в незначительном количестве работ рассматривается связь между развитием и тяжестью алкогольной интоксикации с митохондриальной дисфункцией в тканях головного мозга. Клетки головного мозга содержат, по крайней мере, две субпопуляции митохондрий, включая несинаптические митохондрии нейронов и глии, и синаптические митохондрии, напрямую образующиеся на клеточных окончаниях [10]. Митохондрии регулируют выработку АТФ, окислительно-восстановительный баланс и гомеостаз кальция в нейроне, а синаптические митохондрии обеспечивают энергетические потребности синапсов — то есть поддерживают всю нейромедиацию, перенос сигнала от нейрона к нейрону.

Ранее нами показано, что некоторые агонисты PPAR $\alpha$  рецепторов, в частности, некоторые фибраты, а также метформин, смешанный активатор  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta/\delta$  подтипов PPAR рецепторов, активирующий PPAR через АМФ-активируемую протеинкиназу, вызывают значительное снижение уровня добровольного потребления этанола у крыс [2]. Механизмы, лежащие в основе данного феномена, не до конца понятны и требуют детального изучения. Учитывая, что PPAR рецепторы вовлечены в регуляцию митохондриального биогенеза и функционального состояния митохондрий, и то, что агонисты PPAR рецепторов влияют на нейромедиаторные системы вовлеченные в механизмы подкрепления при алкогольной интоксикации различной длитель-

ности [1] целесообразно изучить влияние агонистов рецепторов пролиферации пероксисом на функциональное состояние синаптической фракции митохондрий головного мозга при алкогольной интоксикации.

Цель работы заключалась в исследовании влияния агонистов  $\alpha$  и  $\gamma$  рецепторов пролиферации пероксисом, а именно, агониста PPAR $\alpha$  рецепторов фенофибрата, агониста PPAR $\gamma$  рецепторов пиоглитазона, а также смешанного активатора  $\alpha$ ,  $\gamma$  и  $\beta/\delta$  типов PPAR рецепторов метформина на функциональное состояние митохондрий головного мозга крыс при хронической алкогольной интоксикации.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали реактивы и растворители квалификации «химически чистый». Буферные растворы готовили с использованием деионизированной воды, полученной на системе Ultra (Hydrolab, Польша). Для алкоголизации крыс использовали спирт-ректификат марки «Люкс». В работе использовали спектрофотометры BMG Spectrostar Nano (Германия) и Thermo Scientific Multiscan Sky (США). Измерения проводились в лунках стандартных 96-луночных планшетов в 2 повторностях.

Исследования проводили на крысах самцах линии Wistar. Возраст животных на начало эксперимента — 2,0–2,5 месяца, масса 180–200 г. Для изучения влияния агонистов PPAR рецепторов на выраженность метаболических нарушений, вызванных хронической алкогольной интоксикацией, использовали алкоголизацию животных на протяжении 21 сут 30 % в/о раствором этанола в дозе 5 г/кг/сут. Животные были разделены на 5 экспериментальных групп по 8 особей в каждой: контрольную, хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ), ХАИ+Фенофибрат, ХАИ+Метформин, ХАИ+Пиоглитазон. На фоне алкогольной интоксикации животные соответствующих групп внутрижелудочно получали фенофибрат в дозе 150 мг/кг/сут, метформин в дозе 150 мг/кг/сут и пиоглитазон в дозе 10 мг/кг/сут. Препараты вводились с первого дня эксперимента. По окончании эксперимента крыс эвтаназировали путем декапитации, после 12 ч голодания. После декапитации животных отделы головного мозга выделяли без перфузирования, на льду, препарировали отделы мозга. Для выделения синаптосомально-митохондриальной фракции из больших полушарий использовали свежую, незамороженную ткань мозга. Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования. Образцы для биохимических исследований хранили до исследования при  $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$  в морозильнике глубокого холода. Скорость митохондриального дыхания регистрировали полярографически по изменению содержания кислорода в суспензии митохондрий с помощью электрода Кларка, встроенного в термостатируемую герметичную полярографическую ячейку при  $25^{\circ}\text{C}$  [6]. Среда дыхания содержала 0,125 М сахарозы, 20 мМ HEPES, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 20 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 2 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 1 мг/мл БСА, pH 7,4. В качестве субстратов дыхания использовали смесь сукцинат+глутамат+малат (по 5 мМ). Калибровку проводили по известным зависимостям растворения кислорода в воде и с добавлением дитионита натрия для установки нулевой линии. Активности комплексов I (НАДН-дегидрогеназа), II (сукцинатдегидрогеназа) и IV (цитохром c оксидаза), а также активность цитратсинтазы оценивали ранее описанными методами [5]. Содержание белка в митохондриальной фракции из тканей больших полушарий головного мозга определяли по методу Петерсон [9]. При проведении экспериментов руководствовались этическими нормами, принятыми в международной практике биомедицинских исследований, в частности, соблюдались требования, установленные «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях». Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием Prism v. 8.0 (GraphPad, США). Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для выявления значимости

отличий между экспериментальными группами использовали дисперсионный анализ и *post-hoc* тест 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 значения.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Установлено, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождалась значительным нарушением функционального состояния митохондрий головного мозга крыс, наблюдалось снижение, практически в 2 раза, скоростей субстрат-зависимого и АДФ-стимулированного дыхания, а также снижение ферментативных активностей митохондриальных комплексов (таблицы 1, 2). Введение животным фенофибрата и метформина на фоне алкоголизации сопровождалось сохранением скоростей митохондриального дыхания на уровне контрольных значений, в то время как пиоглитазон не оказывал значимого эффекта по сравнению с группой ХАИ (таблица 1).

**Таблица 1 — Показатели функционального состояния синаптических митохондрий больших полушарий головного мозга крыс при введении агонистов PPAR на фоне ХАИ**

Скорость потребления кислорода, нмоль*мин	Группы				
	Контроль	ХАИ	ХАИ+ Фенофибрат	ХАИ+ Метформин	ХАИ+ Пиоглитазон
Скорость субстрат-зависимого дыхания (сукцинат+глутамат+малат)	44,4±0,9	21,3±1,4 <sup>a</sup>	40,0±2,8 <sup>b</sup>	41,2±1,3 <sup>b</sup>	28,3±2,2
Скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием (после внесения АДФ)	56,2±2,8	29,9±2,6 <sup>a</sup>	54,6±2,6 <sup>b</sup>	53,19±3,4 <sup>b</sup>	36,3±2,6
Скорость дыхания при разобщении ЭТЦ	58,4±1,4	38,6±2,4 <sup>a</sup>	56,4±2,9 <sup>b</sup>	55,1±2,8 <sup>b</sup>	47,1±2,2

Примечание — а —  $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе, b —  $p < 0,05$  по отношению к группе ХАИ.

Введение животным агониста PPAR $\alpha$  рецепторов фенофибрата и метформина, активатора  $\alpha$ ,  $\gamma$  и  $\beta/\delta$  подтипов PPAR рецепторов, сопровождалось сохранением активностей НАДН-дегидрогеназы (комплекс I), СДГ (комплекс II) и цитохром *c* оксидазы (комплекс IV) в ткани больших полушарий головного мозга алкоголизованных животных на уровне контрольной группы. Введение животным пиоглитазона сопровождалось еще более выраженным снижением активности митохондриальной СДГ в ткани мозга, чем у алкоголизованных крыс (таблица 2). Активность цитратсинтазы в ткани больших полушарий в группах животных, получавших фенофибрат и метформин была выше в среднем в 1,3–1,6 раза по сравнению с группой алкоголизованных животных и сохранялась на уровне контрольных значений. Введение крысам на фоне алкоголизации пиоглитазона не сопровождалось значимым изменением активностей цитратсинтазы в ткани больших полушарий по сравнению с алкоголизованными животными. Сохранение цитратсинтазной активности на контрольном уровне под влиянием агониста PPAR $\alpha$  рецепторов фенофибрата и активатора различных PPAR рецепторов, метформина, может свидетельствовать о митопротекторном действии фенофибрата и метформина при хронической алкогольной интоксикации, а также об усилении или модуляции биогенеза синаптических митохондрий в нервной ткани при алкогольной интоксикации.

**Таблица 2 — Влияние агонистов PPAR на активности цитратсинтазы и некоторых комплексов ЭТЦ митохондрий синаптосомально-митохондриальной фракции больших полушарий головного мозга крыс при ХАИ**

Ферментативная активность	Группы				
	Контроль	ХАИ	ХАИ+ Фенофибрат	ХАИ+ Метформин	ХАИ+Пиоглитазон
НАДН-оксидоредуктаза (I комплекс), нмоль НАДН /мин/мг	160,5±3,1	121,7±2,1 <sup>a</sup>	144,9±2,6 <sup>b</sup>	154,5±2,8 <sup>b</sup>	153,5±4,0
СДГ (II комплекс), нмоль/мин/мг	140,0±6,5	124,5±5,4 <sup>a</sup>	138,3±6,0 <sup>b</sup>	160,6±7,9 <sup>b</sup>	114,0±6,5 <sup>a</sup>
Цитохром <i>c</i> оксидаза (IV комплекс), нмоль/мин/мг	120,0±3,5	104,5±5,4 <sup>a</sup>	118,3±6,0 <sup>b</sup>	166,6±7,9 <sup>b</sup>	101,0±5,5 <sup>a</sup>
Цитратсинтаза, нмоль/мин/мг	70,8±2,4	50,6±5,8 <sup>a</sup>	80,9±3,2 <sup>b</sup>	65,9±2,6 <sup>b</sup>	54,3±2,8

Примечание — а —  $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе, b —  $p < 0,05$  по отношению к группе ХАИ.

**Заключение.** Хроническая алкогольная интоксикация сопровождается значимым нарушением функционального, и вероятно, структурного состояния митохондрий больших полушарий головного мозга крыс, что проявляется в существенном снижении скоростей митохондриального дыхания и ферментативных активностей митохондриальных комплексов. Введение животным в условиях хронической алкогольной интоксикации агониста PPAR $\alpha$  рецепторов фенофибрата и метформина, активатора  $\alpha$ ,  $\gamma$  и  $\beta/\delta$  подтипов PPAR рецепторов, сопровождается сохранением скоростей митохондриального дыхания и активностей НАДН-дегидрогеназы (комплекс I), СДГ (комплекс II) и цитохром *c* оксидазы (комплекс IV) на уровне контрольных значений. Полученные данные об активности цитратсинтазы (маркера митохондриальной массы) в ткани больших полушарий головного мозга при хронической алкогольной интоксикации могут свидетельствовать об уменьшении количества функционирующих митохондрий. Сохранение активностей цитратсинтазы на уровне контрольных значений при введении фенофибрата и метформина свидетельствует либо о протекторном действии последних на синаптические митохондрии, либо об увеличении количества митохондрий в ткани мозга, предположительно, путем активации пути PPAR/PGC-1 $\alpha$ .

### Список литературы

1. Влияние агонистов PPAR рецепторов на нейрохимические изменения в отделах головного мозга при субхронической алкогольной интоксикации у крыс / А. Г. Шляхтун [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. Выпуск 4. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии / под общ. ред. И. Н. Семенени: сб. науч. ст. — Минск: ИВЦ Минфина, 2019. — С. 244–250.
2. Влияние агонистов альфа- и гамма- 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. — С. 341–345.
3. Albano, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage / E. Albano // The Proceedings of the Nutrition Society. — 2006. — Vol. 65. — P. 278–290.

4. Brain atrophy in alcoholics: Relationship with alcohol intake; liver disease; nutritional status, and inflammation / E. Garcia-Valdecasas-Campelo [et al.] // Alcohol and Alcoholism. — 2007. — Vol. 42. — P. 533–538.
5. Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: Implications for Parkinson's disease / F. H. Khan [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — Vol. 1741. — P. 65–74.
6. Li, Z. Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode / Z. Li, B. H. Graham // Methods Mol Biol (Mitochondrial Disorders: Biochemical and Molecular Analysis). — 2012. — Vol. 837. — P. 63–72.
7. McCool, B.A. Ethanol modulation of synaptic plasticity / B.A. McCool // Neuropharmacology. — 2011. — Vol. 61. — P. 1097–1108.
8. Mukherjee, S. Alcoholism and its effects on the central nervous system / S. Mukherjee // Current Neurovascular Research. — 2013. — Vol. 10. — P. 256–262.
9. Peterson, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall / G. L. Peterson // Anal Biochem. — 1979. — Vol. 100, Iss. 2. — P. 201–220.
10. Proteomic profiling of neuronal mitochondria reveals modulators of synaptic architecture / L. C. Graham [et al.] // Mol. Neurodegener. — 2017. — Vol. 12. — e: 77.

## **INFLUENCE OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION AND PPAR AGONISTS ON BRAIN MITOCHONDRIAL FUNCTION IN RATS**

---

*Shlyahatun A.H.<sup>1</sup>, Raduta E.F.<sup>1</sup>, Sutsko I.P.<sup>1</sup>, Bogdevich E.V.<sup>1</sup>, Kasper E.V.<sup>1</sup>,  
Semenenya I.N.<sup>1</sup>, Tursunhodzhaeva F.M.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Republican Scientific Research Unitary Enterprise «Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus», Grodno, Republic of Belarus*

<sup>2</sup> *Institute of the Chemistry of Plant Substances named acad. S. Yu Yunusov of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan*

**Summary.** *The effects of some agonists of PPAR receptors on the functional parameters of synaptosomal mitochondria of cerebral hemispheres during chronic alcohol intoxication in rats were studied. The data obtained show that PPAR receptor agonists exert a protective effect on mitochondria during alcohol intoxication, maintaining the rates of mitochondrial respiration and the activities of the mitochondrial electron transport chain complexes at the of control levels.*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛДГ-ТЕСТА, ОПРЕДЕЛЕНИЯ CD 95 И 7-ААД ПРИ ОЦЕНКЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МАТРИКСА БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ

---

**Ярец Ю.И.**

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»,  
г. Гомель, Республика Беларусь*

**Резюме.** Проведена сравнительная оценка цитотоксичности матрикса бактериальной биопленки на культуру фибробластов кожи человека на основании проведения ЛДГ-теста, определения количества 7-ААД-положительных клеток и экспрессии CD 95. Наиболее высокую цитотоксичность по результатам ЛДГ-теста проявлял матрикс биопленки *P. aeruginosa*. Биопленка Г– бактерий (*P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*) в большей степени, чем Г+ бактерий (*S. aureus*, *E. faecalis*) способствовала развитию апоптоза (по CD 95) и гибели (по 7-ААД) фибробластов.

**Введение.** Изучение биологической активности различных веществ на начальном этапе предполагает оценку их токсичности. Оценка цитотоксичности на культуре клеток позволяет установить характер биологической активности изучаемых соединений непосредственно на клеточном уровне, а также дает возможность проецировать полученные данные на организм человека [5]. Под цитотоксичностью понимают появление патологических изменений в клетках при действии различных агентов. В зависимости от силы и мишени воздействия возможен широкий спектр изменений, ограниченный, с одной стороны, цитостатическим эффектом, нарушающим прохождение клетки по клеточному циклу, а с другой стороны — цитоцидным эффектом, ведущим клетку к гибели [14]. Если рассматривать клеточную гибель как конечный результат цитотоксического действия различных агентов, то под цитотоксичностью можно понимать разнообразные нарушения, имеющие с одной стороны запуск механизмов апоптоза, с другой — включение процессов некроза [13].

Для оценки цитотоксичности используют определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культуральной среде и клетках монослоя. ЛДГ присутствует в цитоплазме живых клеток и выделяется в среду клеточной культуры через протечки через мембраны мертвых или умирающих клеток, нарушенных под воздействием токсического агента. Культуральную среду можно извлекать в различные промежутки времени после химической или холодовой обработки клеток для измерения высвобожденной ЛДГ и определять временной характер цитотоксичности. По мере выделения ЛДГ происходит общая оценка цитотоксичности [4]. Кроме ЛДГ, используют определение количества жизнеспособных и апоптотических клеток. С этой целью применяют флуоресцирующий ДНК-краситель 7-ААД (7-амино-актиномицин). Он позволяет оценить проницаемость цитоплазматической мембраны в результате потери транспортной функции в процессе поздней стадии апоптоза, сопровождаемой некрозом клеток. 7-ААД позволяет отличить живые клетки от мертвых, а также от клеток, находящихся в ранних проапоптотических изменениях. 7-ААД используют для оценки жизнеспособности при проведении проточ-

ной цитофлуориметрии. Дополнительно определяют экспрессию рецепторов и лигандов клеточной смерти, например CD 95, CD95L, TNFRI, DR4 TRAIL и т. п. [1].

Бактериальные биопленки состоят из ряда структур, в число которых входят клетки и окружающий их внеклеточный матрикс. Биопленочный матрикс определяют как биохимически активную систему, представляющую собой «резервуар ферментов», которые используются бактериями для адгезии/колонизации, инвазии и агрессии. Высвобождаясь во внутреннее пространство биопленки, ферменты микробной агрессии адсорбируются структурами матрикса, создавая тем самым инвазивный потенциал биопленки, роль которого еще не до конца изучена. Это открывает перспективное поле в исследовании патогенеза инфекционного процесса [8].

Известно, что в основе нарушения процессов репарации дермы, формирования хронической раны лежат фундаментальные изменения, ассоциированные с фибробластами. Фибробласты в норме контролируют состав и структуру межклеточного матрикса; секретируют различные биологические вещества, регулирующие состояние других клеток. Немаловажную роль фибробласты дермы играют в регуляции иммунного ответа в качестве «сторожевых» клеток, организующих ответы соединительной ткани на инфекцию или повреждение. Нарушение физиологического баланса в клеточной популяции фибробластов приводит к значительным изменениям нормального процесса репаративной регенерации [9].

**Цель исследования** — провести сравнительную оценку цитотоксичности матрикса биопленки грамположительных (Г<sup>+</sup>) и грамотрицательных (Г<sup>-</sup>) бактерий на культуру фибробластов на основании результатов ЛДГ-теста, определения 7-AAD и CD 95.

**Материал и методы исследования.** В работе использовались образцы здоровой кожи (n = 20), утилизируемые в процессе проведения пластических операций (блефаропластика). Протокол исследования утвержден локальным этическим комитетом ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ» (протокол № 3 от 06.06.2019). Культивирование фибробластов выполнялись в условиях клинико-диагностической лаборатории ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ». Для получения первичных культур использовали метод эксплантатов [7]. Образцы кожи, измельченные до размеров примерно 1–3 мм<sup>2</sup>, переносили на культуральные чашки Петри размером 35 мм, накрывали покровным стеклом и культивировали в 1 мл среды, состоящей из 90 % DMEM, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, с добавлением антибиотиков (100 мгк/мл гентамицина, 100 мгк/мл ванкомицина, 50 мгк/мл амфотерицина В). Смена среды проводилась каждые 2–3 дня. Радиальный рост клеток по периметру кожных фрагментов наблюдался в среднем на 5–10-е сутки, с формированием монослоя через 14–20 суток. На этом этапе проводили субкультивирование фибробластов. Для перевода клеток в суспензию монослой обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина с 0,025 % раствором Версена (1:3). Для посева культуры применяли суспензию с концентрацией клеток  $5 \times 10^4$ /мл. Пассажи проводили при достижении клетками 75–100%-й конфлюэнтности, для пассажей использовали питательную среду без добавления антибиотика. Для исследования применяли культуру клеток 4–5 пассажа, которая по литературным данным, соответствует по своим характеристикам молодым фибробластам. Культура, подготовленная к эксперименту, представляла собой монослой с типичным рисунком в виде «завитков». Кариотипирование показало, что клетки являются диплоидными и имеют 46 хромосом.

Для получения матрикса биопленки использовали клинические штаммы *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* из рабочей коллекции, сохраненные в растворе криопротектора (10 % раствор глицерина в питательном бульоне в соотношении 1:1) при температуре –70 °С. Штаммы бактерий характеризовались выраженной способностью формировать биопленку, анализ которой предварительно проводили по собственной методике (Патент Республики

Беларусь № 20326). Штаммы восстанавливали путем культивирования в жидкой питательной среде, затем производили высеив на плотную питательную среду с выделением чистой культуры. Для моделирования формирования биопленки использовали стерильные предметные стекла, которые помещали вертикально во флаконы с питательной средой. Во флакон вносили 1 мл бульонной культуры в концентрации  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл, инкубировали 3 ч при температуре 37 °С и после этого добавляли питательную среду в объеме 40 мл. Биопленку выращивали в течение 72 ч. После окончания культивирования стекла из флаконов извлекали пинцетом, трижды промывали от не прикрепившихся клеток в буферном растворе. Для получения матрикса биопленку соскабливали с поверхности покровного стекла с помощью скребка для клеточных культур, добавляли минимальный объем изотонического раствора хлорида натрия. Полученную суспензию фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм [2, 3].

Для проведения эксперимента в чашки Петри помещали культуры фибробластов в посевной дозе  $5 \times 10^4$ /мл ( $5\ 000/\text{см}^2$ ). В питательную среду для фибробластов добавляли 0,150 мл фильтрата матрикса биопленки. В качестве контроля использовали фибробласты такого же пассажа, но без добавления матрикса. Длительность эксперимента составила 7 дней. Состояние клеток контролировали ежедневно, основные показатели экспериментального исследования представляли по результатам культивирования 3-х и 7-х суток. Культуры исследовали прижизненно на инвертированном микроскопе (Nicon, Япония) с применением методов светлого поля при увеличении  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Количество клеток оценивали с помощью анализатора *Cell Dyn Ruby* («Abbott», США).

Оценку цитотоксичности матрикса биопленки проводили по разнице активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культуральной среде и клетках монослоя. Культуральную среду отбирали в эппендорфы и центрифугировали. Сохранившиеся на носителе клетки разрушали путем двукратного замораживания-оттаивания. Отбирали по 1 мл культуральной среды и лизата клеток. Для определения ЛДГ использовали диагностические наборы производства *Abbott Laboratories*. Исследования выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе *Architect C 8000*, («Abbott» США). Количество поврежденных клеток выражали как процентное отношение активности ЛДГ в среде к суммарной активности ЛДГ в лизате и в ростовой среде:

$$\text{ПК (\%)} = (\text{ЛДГ}_c / \text{ЛДГ}_л + \text{ЛДГ}_c) \cdot 100,$$

где ПК — количество поврежденных клеток; ЛДГ<sub>с</sub> — активность ЛДГ в среде; ЛДГ<sub>л</sub> — активность ЛДГ в лизате [6].

Определение иммунофенотипа получаемых клеток выполняли с помощью проточной цитофлуориметрии. Клеточную суспензию фибробластов в количестве  $3,5 \times 10^6$  кл/1 мл фосфатно-солевого буфера инкубировали с панелью конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. Измерения выполняли с помощью проточного цитофлуориметра *FACSCanto II* с программным обеспечением *FACSDiva* («Becton Dickinson», США). Предварительно проводили оценку подлинности культур фибробластов, по результатам иммунофенотипирования анализируемые клетки имели фенотип: CD 31-/CD 34-/CD 45/CD 14-/HLA-DR-; CD44+/CD90+/виментин+/CD73+/CD10+/CD105+.

Оценку жизнеспособности культивированных фибробластов выполняли с использованием флуоресцирующего ДНК-красителя 7-AAD (Exbio). Дополнительно оценивали экспрессию маркера апоптоза CD95.

В работе были применены общепринятые методы выражения результатов с использованием встроенных модулей лицензионной программы «STATISTICA 6.1» (StatSoft Inc., США,

регистрационный номер GS-35F-589). Результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха (Ме [25-й; 75-й процентиля]). Для проверки равенства медиан нескольких выборок применяли критерий Краскела – Уоллиса.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Результаты ЛДГ-теста показали, что доля поврежденных клеток в присутствии матрикса биопленки отличается от таковой в контрольной культуре на всех сроках культивирования, что говорит о цитотоксичности матрикса биопленки Г+ и Г– бактерий. Максимальное относительное содержание поврежденных клеток выявлено при совместном культивировании с матриксом *P. aeruginosa*. Значения, полученные после постановки опыта с секретлируемыми компонентами *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, были сходными (табл.).

**Таблица — Результаты ЛДГ-теста при определении цитотоксичности матрикса биопленки Г+ и Г– бактерий**

Показатель	Активность ЛДГ в среде, ЕД/л	Активность ЛДГ в лизате клеток, ЕД/л	Процент поврежденных клеток в чашке Петри, Ме
	Ме [25-й; 75-й процентиля]		
3-и сутки			
Контрольная группа	35 [28; 43]	220 [190; 250]	14 %
<i>K. pneumoniae</i>	<b>110 [100; 140]</b>	<b>225 [230; 320]</b>	<b>32,8 %</b>
<i>P. aeruginosa</i>	<b>170 [160; 180]*</b>	<b>249 [240; 310]*</b>	<b>40,5 %*</b>
<i>S. aureus</i>	97 [90; 120]	232 [220; 243]	29,5 %
<i>E. faecalis</i>	86 [82; 95]	225 [205; 230]	27,6 %
7-е сутки			
Контрольная группа	39 [30; 45]	250 [220; 270]	13,5 %
<i>K. pneumoniae</i>	<b>135 [135; 156]</b>	255 [235; 300]	<b>34,6 %</b>
<i>P. aeruginosa</i>	<b>196 [171; 210]*</b>	255 [240; 285]	<b>43,5 %*</b>
<i>S. aureus</i>	135 [125; 144]	255 [218; 270]	34,6 %
<i>E. faecalis</i>	108 [99; 118]	258 [224; 271]	29,5 %

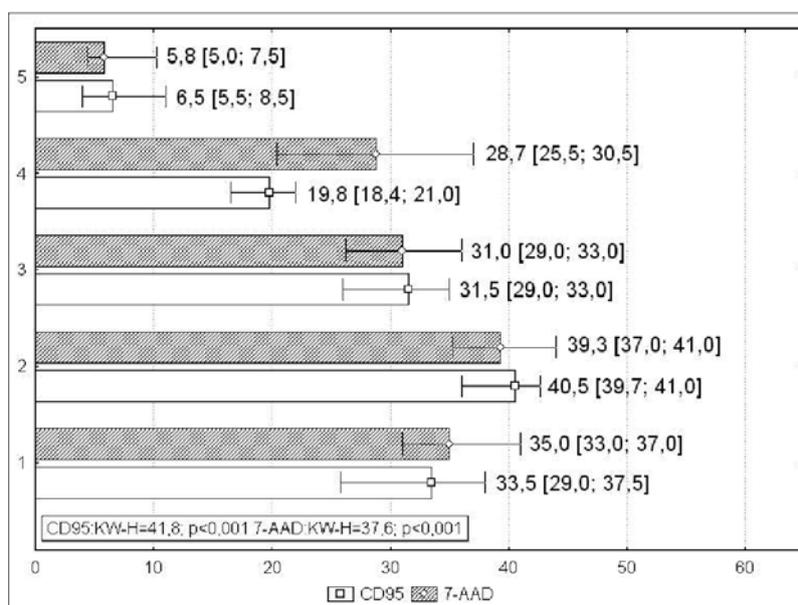
*Примечание:* \* — отмечены наибольшие значения среди сравниваемых групп, жирным шрифтом выделены значимые различия по сравнению с контрольной группой,  $p < 0,05$ .

В ходе опыта регистрировалось увеличение количества 7-AAD положительных клеток и уровня апоптоза по CD95. Биопленка Г– бактерий (*P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*) в большей степени, чем Г+ бактерий (*S. aureus*, *E. faecalis*) способствовала развитию апоптоза и гибели фибробластов. На 3 сутки опыта с *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* относительное содержание 7-AAD положительных фибробластов составляло 35,0 % [33,0; 37,0] и 39,3 % [37,0; 41,0], соответственно. Уровень апоптоза (по экспрессии CD 95) был сходным. Влияние на жизнеспособность и апоптоз фибробластов биопленки Г+ бактерий в ранние сроки исследования было выражено в меньшей степени. Минимальное влияние оказывал матрикс биопленки *E. faecalis*: на 3 сутки количество нежизнеспособных клеток составляло 28,7 % [25,5; 30,5], клеток в апоптозе – 19,8 % [18,4; 21,0] (рис.).

С увеличением сроков культивирования до 7 суток относительное содержание поврежденных фибробластов и потеря поверхностных CD маркеров увеличивалось.

В настоящее время доказано, что хронические раны являются типичной патологией, ассоциированной с биопленкой. Достаточное количество публикаций доказывают трансформацию бактерий из планктонной формы в биопленку, и ее первостепенную патогенетическую роль в задержке раневого заживления [11]. Для хронической раны характерно состояние пролонгированного патологического воспаления, нарушение эпителиальной миграции и рос-

та грануляционной ткани, что обусловлено повреждающим действием компонентов бактериальной биопленки на клетки соединительной ткани [12]. Несмотря на доказанное присутствие биопленки в хронических ранах, ее роль в патогенезе нарушения репарации остается неясной. Учитывая колонизацию раны биопленкой, представляется актуальным исследование эффектов биопленки на фибробласты. В аналогичных исследованиях ранее было показано действие биопленки *S. aureus* на миграцию, жизнеспособность, морфологию и индукцию апоптоза фибробластов [10].



**Рисунок — Изменение степени экспрессии CD 95 и 7-AAD на фибробластах после культивирования с матриксом биопленки Г+ и Г– бактерий (3 суток):**

1, 2, 3, 4, 5 — обозначения для результатов, полученных при культивировании с матриксом биопленки *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, и контроля соответственно; KW-H — критерий Краскела – Уоллиса, p — уровень значимости различий между группами

**Заключение.** В результате проведенного эксперимента установлена цитотоксичность матрикса биопленки Г+ и Г– бактерий на культуру фибробластов здоровой кожи при проведении совместного культивирования *in vitro*, степень выраженности которой варьировала в зависимости от вида бактерии. Наиболее высокую цитотоксичность по результатам ЛДГ-теста проявлял матрикс биопленки *P. aeruginosa*. Биопленка Г– бактерий (*P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*) в большей степени, чем Г+ бактерий (*S. aureus*, *E. faecalis*) способствовала развитию апоптоза (по CD 95) и гибели (по 7-AAD) фибробластов.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) по теме НИР «Жизнеспособность и функциональная активность фибробластов при взаимодействии с матриксом бактериальных биопленок» (договор № M19-007 от 02.05.2019), № госрегистрации 20191399 от 19.06.2019).

### Список литературы

1. Войткова, В.В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии (обзор литературы) / В.В. Войткова // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. — 2010. — Т. 76, № 6. — С. 220–225.
2. Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок / И.Р. Симонова [и др.] // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Сер. Естественные науки. — 2017. — № 1. — С. 73–79.

3. Роль компонентов матрикса во взаимодействии бактериофагов с бактериями биопленок / Г.В. Тец [и др.] // Практическая пульмонология. — 2017. — № 3. — С. 55–57.
4. Романова, М.А. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток / М.А. Романова, А.Ш. Додонова // Молодой ученый. — 2016. — Т. 122, № 18. — С. 110–113.
5. Скулачев, В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В.П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — № 6. — С. 4–10.
6. Тестирование аддитивных материалов на культурах клеток фибробластов человека / Г.П. Котельникова [и др.] // Журнал имени академика Б.В. Петровского. — 2018 — Т. 6, № 2. — С. 67–73.
7. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практ. рук. / Р.Я. Фрешни; пер. с англ. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. — С. 221–226.
8. Чеботарь, И.В. Матрикс микробных биопленок / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Н.А. Маянский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2016. — Т. 18, № 1. — С. 9–19.
9. Шурыгина, И.А. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин // Сибирский медицинский журнал. — 2012. — № 3. — С. 8–12.
10. Differential effects of planktonic and biofilm MRSA on human fibroblasts / K.R. Kirker [et al.] // J. Wound Repair Regen. — 2012. — № 20. — P. 253–261.
11. Kirker, K.R. In vitro studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review / K.R. Kirker, G.A. James // APMIS. — 2017. — № 125. — P. 344–352.
12. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro / J.R. Marano [et al.] // Scientific reports. — 2015. — Vol. 5, № 1. — P. 1–11.
13. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease / C.B. Thompson // J. Science. — 1995. — P. 1456–1462.
14. Zimmerman, H. J. Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. — 789 p.

---

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RESULTS OF THE LDH TEST,  
DETERMINATION OF CD 95 AND 7-AAD IN ASSESSMENT  
OF THE CYTOTOXICITY OF THE MATRIX OF BACTERIAL BIOFILMS  
IN THE CULTURE OF FIBROBLASTS**

---

*Yarets Y.I.*

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

**Summary.** *A comparative assessment of the cytotoxicity of the matrix of bacterial biofilms on the culture of human skin fibroblasts was carried out on the basis of the LDH test, determination of the number of 7-AAD-positive cells and expression of CD 95. The highest cytotoxicity according to the results of the LDH test was shown by the matrix of P. aeruginosa biofilm. Biofilm of G-bacteria (P. aeruginosa and K. pneumoniae) to a greater extent than G + bacteria (S. aureus, E. faecalis) promoted the development of apoptosis (according to CD 95) and death (according to 7-AAD) of fibroblasts.*

## СОВРЕМЕННЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДИАГНОСТИКИ ЭНДОКРИННЫХ ГИПЕРТЕНЗИЙ

*Ярец Ю.И., Русаленко М.Г.*

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Республика Беларусь*

**Резюме.** Эндокринная патология является частой причиной развития артериальной гипертензии. Правильно поставленный диагноз эндокринной артериальной гипертензии дает клиницистам возможность применять хирургические методы лечения либо использовать специфическую фармакотерапию для достижения оптимального контроля артериального давления. В статье представлена информация о современных лабораторных тестах диагностики эндокринных причин артериальной гипертензии. Обращается внимание на вопросы диагностической информативности и интерпретации полученных результатов.

**Введение.** Распространенность артериальной гипертензии (АГ) по данным различных авторов находится в диапазоне от 30 до 40% [4]. В большинстве случаев АГ является первичной (или эссенциальной), однако около 15% пациентов с АГ имеют вторичную гипертензию, среди которой особое значение придается АГ эндокринного генеза [2]. АГ может быть начальным проявлением не менее 15 эндокринных заболеваний. Среди эндокринных нарушений первичный гиперальдостеронизм (ПГА) и феохромоцитома являются наиболее частыми причинами эндокринных АГ [9, 10].

### *Первичный гиперальдостеронизм*

Синдром АГ является классическим проявлением первичного гиперальдостеронизма. Классические лабораторные признаки ПГА составляют известную триаду: гипокалиемия, повышение концентрации альдостерона плазмы, снижение активности ренина. Длительное время считалось, что уровень калия выше 3,5 ммоль/л исключает диагноз ПГА [5]. В настоящее время считается, что сочетание АГ и гипокалиемии характерно только для наиболее тяжелых форм ПГА, при которых произошли необратимые изменения в почках и сердечно-сосудистой системе [6]. Так, по данным литературы, частота нормокалиемического варианта ПГА может достигать 75–80 % [1]. В целом гипокалиемия встречается лишь у 20% пациентов, поэтому определение концентрации калия в плазме не обладает достаточной чувствительностью как тест для скрининга. Самостоятельное определение уровня альдостерона также имеет низкую чувствительность, а ренина — низкую специфичность.

Наиболее информативным лабораторным показателем для диагностики ПГА считается альдостерон/рениновое соотношение (АРС). Данный показатель более специфичен, чем ренин (который обычно снижен при ПГА), и более чувствителен, чем калий плазмы.

Существует вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов расчета АРС, которые возможны по следующим причинам [8]:

- гипокалиемия может быть ассоциирована с ложноотрицательным АРС;
- ложноотрицательные результаты АРС могут быть следствием стимуляции секреции ренина следующими факторами: ограничение употребления поваренной соли; сопутствующая

злокачественная или реноваскулярная АГ; беременность (высокий уровень прогестерона); лечение диуретиками (в том числе спиронолактоном), антагонистами кальция (дигидропиридиновые препараты), ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента, блокаторами рецепторов ангиотензина II;

- ложноположительные результаты возможны у женщин до наступления менопаузы в лютеиновую фазу, у женщин, принимающих эстрогенсодержащие контрацептивы (при определении прямой активной концентрации ренина, а не активности ренина);

- ложноположительные результаты могут быть получены у пациентов с нарушением функции почек, у пациентов пожилого возраста;

- ложноположительные результаты могут вызывать  $\beta$ -адреноблокаторы,  $\alpha$ -метилдопа, клонидин, нестероидные противовоспалительные средства, которые подавляют ренин.

Перед определением АРС необходимо отменить диуретики за 4 недели до проведения анализа, а также другие лекарственные препараты, влияющие на АРС. Учитывая влияние положения тела и времени суток на результат анализа, рекомендуется производить забор крови в положении сидя, в середине утра. До этого 2–4 ч пациент должен находиться в вертикальном положении (сидеть, стоять, ходить), что максимально повышает чувствительность теста. Непосредственно перед забором крови пациент должен находиться в покое (в положении сидя) в течение 5–15 мин.

Диагностические значения АРС зависят от определяемых показателей (прямая концентрация ренина или активность ренина плазмы), методики определения, единиц измерения и др. Пороговые значения АРС, предлагаемые авторами, в настоящее время обсуждаются. Несмотря на различные референсные интервалы и значения cut-off, выявление уровня альдостерона более 10 нг/дл в сочетании с активностью ренина плазмы менее 1 нг/мл/ч является показанием для проведения подтверждающих исследований. Пороговые значения АРС для диагностики ПГА в зависимости от методов определения и единиц измерения альдостерона и ренина представлены в таблице 1 [2].

**Таблица 1 — Пороговые значения АРС для диагностики ПГА**

Показатель	Активность ренина плазмы, нг/мл/ч	Активность ренина плазмы, пмоль/л/мин	Прямой ренин (прямая концентрация ренина), мЕД/л	Прямой ренин (прямая концентрация ренина), нг/л
Альдостерон, нг/дл*	20–40 и более	1,6–3,1 и более	2,4–4,9 и более**	3,8–7,7 и более
Альдостерон, пмоль/л	750–1000 и более 550–1100 и более	60–80 и более	91–122 и более 66–135 и более	144–192 и более 105–210 и более

Примечание: \* — 1 нг/дл=10 пг/мл=27,7 пмоль/л. При определении альдостерона в пг/мл и прямой концентрации ренина в мкМЕд/мл (технология LIAISON DiaSorin) в качестве порогового диагностического значения АРС рекомендуется использовать 12 пг/мл: мкМЕд/мл (пг/мкМЕд). \*\* — В недавних исследованиях, проведенных с использованием прямого ренина, определенного с помощью хемилюминесцентного иммунного анализа, предлагаются более низкие пороговые значения АРС — от 1,12 до 3,7 нг/дл: мЕД/л.

#### *Другие варианты гиперпродукции или гиперэффекта минералокортикоидов*

Причиной АГ могут быть ряд состояний, ассоциированных с избытком минералокортикоидов (МК) — дезоксикортикостерона (ДОК) или кортизола. Такие заболевания необходимо исключать при выявлении низких уровней альдостерона и ренина у пациентов с АГ и гипокалиемией. Многие из указанных причин носят врожденный характер и обычно диагностируются в детском возрасте. Однако частичные дефекты ферментов могут вызывать АГ у взрослых.

Для подтверждения диагноза редких синдромов применяют генетическое тестирование. В таблице 2 приведены лабораторные показатели функций надпочечников у пациентов с альдостероннезависимым избытком минералокортикоидов [2].

**Таблица 2 — Результаты лабораторных показателей функции надпочечников у пациентов с альдостероннезависимым избытком минералокортикоидов\***

Показатель	Кортизол в суточной моче	Соотношение кортизол / кортизол / зонв моче	ДОК**	11-дезоксикортизол	Андростендион	ДГЭА-с
Дефицит 11β-гидроксилазы	С	-	ЗП	ЗП	ЗП	ЗП
Дефицит 17α-гидроксилазы*	С	-	МП	МП	С	С
ДОК-продуцирующая опухоль	-	-	ЗП	-	-	-
Первичная резистентность к кортизолу	УП	-	МП	МП	МП	МП
Синдром мнимого избытка МК	РП	РП	МП	-	-	-

\* — у всех пациентов выявляются низкие или неопределяемые уровни альдостерона и ренина. Для подтверждения диагноза применяют генетическое тестирование. С — снижение, МП — минимальное повышение, УП — умеренное повышение, ЗП — значительное повышение, «-» - нет изменений; МК — минералокортикоиды; ДОК — дезоксикортикостерон; ДГЭА-с — дегидроэпиандростендион-сульфат; \* — характерно снижение уровня 17-ОН-прогестерона; \*\* — суточная экскреция кортизола с мочой резко повышена, если мнимый избыток минералокортикоидов обусловлен тяжелым синдромом Кушинга (например, при синдроме эктопической секреции адренкортикотропного гормона).

#### *Феохромоцитома (ФХ) и паранглиома (ПГ)*

Это редкие нейроэндокринные хромаффинно-клеточные опухоли, продуцирующие катехоламины, которые развиваются из мозговой ткани надпочечников (80–85%) или из паравerteбральных ганглиев симпатической цепочки (15–20%). Существует 2 биохимических типа катехоламинпродуцирующих опухолей — адренергические и норадренергические. Адренергические опухоли локализуются в мозговом веществе надпочечника. Норадренергические опухоли могут локализоваться в надпочечнике либо вне надпочечника. Норадренергические опухоли чаще ассоциируются с мутациями гипоксического сигнального пути (синдром Гиппель–Линдау, мутации сукцинатдегидрогеназы). Адренергические опухоли чаще ассоциируются с мутациями киназного сигнального пути (синдром множественных эндокринных неоплазий 2-го типа, нейрофиброматоз 1-го типа). Клинически адренергические опухоли проявляются пароксизмальными симптомами чаще, чем норадренергические [7].

В большинстве случаев биохимические исследования должны предшествовать применению визуализирующих методик диагностики ФХ/ПГ. Первым биохимическим тестом для исключения/подтверждения ФХ/ПГ должно быть определение свободных метанефринов в плазме крови или фракционированных метанефринов в суточной моче. В связи с высокой чувствительностью данных тестов получение нормальных значений позволяет с большой надежностью исключить ФХ/ПГ. Другие доступные биохимические тесты, такие как определение катехоламинов в плазме или моче, концентрации ванилилминдальной кислоты и хромогранина А в моче, имеют более низкую диагностическую ценность.

Взятие крови для определения уровня метанефринов рекомендовано проводить в положении лежа после 30-минутного горизонтального положения с использованием соответствующих референтных интервалов. Это обусловлено быстрым клиренсом метаболитов катехоламинов и выраженным влиянием активации симпатической нервной системы при вертикальном положении

нии на стимуляцию выработки норадреналина. Однако забор крови в положении лежа отнимает больше времени, поэтому, когда по какой-то причине выполнить указанную рекомендацию не удастся, альтернативным вариантом является исследование фракционированных метанефринов мочи [3].

Уровень свободных метанефринов плазмы, превышающий верхнюю границу референсного интервала более чем в 3 раза, или концентрация фракционированных метанефринов суточной мочи, превышающая верхнюю границу референсного интервала более чем в 2 раза, с большой надежностью позволяют подтвердить диагноз ФХ/ПГ. Таким образом, правильно диагностируются около 75% всех ФХ/ПГ. В таких случаях риск ложноположительного результата очень низок, поэтому клиницисты должны направить такого пациента на визуализирующие и генетическое обследование [2].

Значимой проблемой интерпретации положительного результата теста являются невысокие показатели метанефринов, в которые попадают и четверть пациентов с ФХ/ПГ, и в гораздо большей степени пациенты без опухоли или с опухолью надпочечника иного происхождения. В таких случаях повышенный уровень фракционированных метанефринов не является полностью специфичным для ФХ/ПГ и поэтому не всегда служит доказательством ее наличия. Согласно ретроспективному анализу, проведенному R. Yu и M. Wei на 1896 пациентах, ложноположительные результаты составляют 19–21% [11]. Основной причиной ложноположительного результата является нарушение техники проведения исследования, что требует повторного определения. Если же при повторном тестировании вновь получен положительный результат с невысокими показателями метанефринов, одним из методов дифференциальной диагностики является подавляющий тест с клонидином с измерением норметанефрина плазмы [3].

**Заключение.** Назначение лабораторных исследований для исключения эндокринных заболеваний, одним из первых симптомов которых является АГ, является сложной задачей для практикующих врачей. В связи с этим информационные разделы, посвященные вопросам диагностически значимых тестов, условиям проведения исследований и интерпретации результатов лабораторных исследований имеют важное практическое значение. Несомненно, вопросы назначения, выбора, интерпретации диагностических тестов решаются индивидуально, в зависимости от возможности и эффективности специфического лечения в каждой конкретной клинической ситуации.

### Список литературы

1. Бельцевич, Д.Г. Дифференциальная диагностика первичного гиперальдостеронизма и показания к операции / Д.Г. Бельцевич, Н.С. Кузнецов, А.Р. Ирмякова // Проблемы эндокринологии. — 2007. — Т. 53, № 6. — С. 48–50.
2. Вайчулис, И.А. Основные положения международных рекомендаций по выявлению эндокринных гипертоний // И.А. Вайчулис, И.И. Шапошник // Кардиология. — 2019. Т. 59, №10. — С. 88–96. doi: 10.18087/cardio.2019.10.2669.
3. Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике и лечению феохромоцитомы/параганглиомы / Г.А. Мельниченко, Е.А. Трошина, Д.Г. Бельцевич, Н.С. Кузнецов [и др.] // Эндокринная хирургия. — 2015. — Т. 9, №3. — С. 15–33.
4. Луценко, Л.А. Артериальные гипертензии надпочечникового генеза: аспекты лабораторного обследования / Л.А. Луценко // Международный эндокринологический журнал. — 2015. — Т. 67, №3. — С. 117–121.

5. Павленко, А.К. Диагностика первичного гиперальдостеронизма / А.К. Павленко, В.В. Фадеев, Г.А. Мельниченко // Проблемы эндокринологии. — 2001. — Т. 47, № 2. — С. 15–25.
6. Чихладзе, Н.М. Симптоматическая артериальная гипертензия при первичном и вторичном гиперальдостеронизме / Н.М. Чихладзе, И.Е. Чазова // Consilium Medicum. Артериальная гипертензия. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 10–14.
7. Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma / G. Eisenhofer, K. Pacak, T.T. Huynh, N. Qin, [et. al] // Endocrine Related Cancer. — 2010. — Vol. 18. No 1. P. 97–111. doi: 10.1677/ERC-10-0211.
8. Factors Affecting the Aldosterone/Renin Ratio / M. Stowasser, A. Ahmed, E. Pimenta, P. Taylor, R. Gordon // Hormone and Metabolic Research. — 2012. — Vol. 44, No 3. — С. 170–176. doi: 10.1055/s-0031-1295460.
9. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline / J.W. Funder, R.M. Carey, F. Mantero, M.H. Murad [et. al] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 2016. — Vol. 101, No 5. — P. 1889–916. doi: 10.1210/jc.2015-4061.
10. Thomas, R.M. Endocrine hypertension: An overview on the current etiopathogenesis and management options // World Journal of Hypertension. — 2015. — Vol. 5, No 2. P. 14–27. doi: 10.5494 / wjh.v5.i2.14.
11. Yu, R. False positive test results for pheochromocytoma from 2000 to 2008. / R. Yu, M. Wei // Exp Clin Endocrinol Diabetes. — 2010. — Vol. 118. — P. 577–585. doi: 10.1055/s-0029-1237699.

## **MODERN LABORATORY BIOMARKERS FOR DIAGNOSTICS OF ENDOCRINE HYPERTENSION**

---

***Yarets Y.I., Rusalenko M.G.***

*State Institution «Republican Research Center for Radiation Medicine  
and Human Ecology», Gomel, Belarus*

***Summary.** Endocrine pathology is a common cause of the development of arterial hypertension. A properly diagnosed endocrine arterial hypertension gives clinicians the opportunity to use surgical treatments or specific pharmacotherapy to achieve optimal blood pressure control. The article provides information on modern laboratory tests for diagnostics of endocrine causes of arterial hypertension. Attention is paid to the issues of diagnostic information content and interpretation of the results obtained.*

## FEATURES OF NUTRITION CORRECTION IN OVERWEIGHT PATIENTS

---

*Ali Adeeb Hussain Ali, Loseva L.P., Krupskaya T.K.*

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

**Summary.** The article provides a detailed analysis of the quantitative content of bioelements in various types of flour and premixes based on secondary raw materials of the oilseed and algae origins. One of the most optimal ways to solve the problem of micronutrient deficiency is enrichment of mass production foodstuffs. The possibility of introducing enriched bread into the diet of overweight persons as a prophylaxis of polydysmicroelementoses using the example of the city of Grodno and the Grodno region is presented.

**Introduction.** Globally, overweight and obesity are currently the fifth leading risk factor for premature death. Almost three million adults die every year. Obesity is mainly caused by a combination of excessive food intake, lack of physical activity and genetic predisposition. Prevention of obesity involves changes in diet, exercise and other activities. In many countries of the world, the prevention and control of obesity has been actively launched since the 1990s. So, in 1992, Singapore implemented the National Program for a Healthy Lifestyle. The goal of the fight against obesity is to implement the educational campaigns aimed at a healthy diet and physical activity [1–3]. To solve this problem, new, advanced research methods are needed. In the last decade, according to research results, deviations from modern principles of healthy nutrition towards micronutrient deficiency are observed in the food consumption structure (despite the vast foodstuffs market), which negatively affects the population health. The worldwide and domestic experience indicates that the most effective and economical way to improve the micronutrient supply of the population is regular inclusion of specialized enriched mass market foodstuffs in the diet.

Today, the food industry is faced with the issue of creating products with a therapeutic effect. This issue can be resolved by developing technologies of combined food products with vegetal materials. In this regard, production of new types of food products with a high content of biologically valuable substances, due to the selection of vegetal materials, is relevant [4–9].

Bakery products have been and remain to be one of the staple foodstuffs of the country's population. The daily ubiquitous consumption of bread allows us to consider it one of the most important food products, the nutritional value of which is of paramount importance. It provides more than 50 % of the daily energy requirement and up to 75 % of the vegetal protein requirement. Therefore, creation of functional bakery products is of great importance for improving the diets of the population at risk, which allows to reduce the calorie intake in general. Based on the data of X-ray fluorescence analysis, in the process of studying the food products and secondary raw materials of food industry available on the market analysis, the following conclusions are made:

- a) oilseed meal is rich in potassium, calcium, iron, manganese, copper, zinc, sulfur;
- b) the available bakery products do not provide the population with the necessary daily dose of essential elements;
- c) using the studied secondary food raw materials as physiologically functional ingredients, there were created enriched food products that provide at least 30 % of the daily dose for bioelements in various population groups.

The purpose of this work was to evaluate the possibility of using a mass-produced product — bread, to compensate for the necessary level of bioelements in food regime.

**Materials and research design.** It is analyzed varieties of flour and physiologically functional food ingredients for bread based on oilseed meal and algae.

As a research method, an X-ray fluorescence analysis was taken in conjunction with the method of measuring MVI. MH3272–2009 [10–11].

**Research results and discussion.** The obtained data on the bioelements quantitative content in bakery products by X-ray fluorescence analysis of products are presented in Tables 1–3.

**Table 1 — The quantitative content of copper in bakery products, µg/g**

Product	The Cu concentration, (dried mass)	The Cu concentration, (native foodstuff)
French bread»Nemanskyi»	5.2589	2.42
Bread «Spadar from Grodno»	2.8027	1.68
Bread «Grodzenskiy yeast free special»	3.1901	1.1
Bread «Rumlevskiy» with sunflower seeds	3.2253	1.93
Bread «Gelenovskiy for diabetic patients»	2.3693	1.53

**Table 2 — The quantitative content of iron in bakery products, µg/g**

Product	The Fe concentration, (dried mass)	The Fe concentration, (native foodstuff)
French bread»Nemanskyi»	27.5261	12.66
Bread «Spadar from Grodno»	19.0756	10.88
Bread «Grodzenskiy yeast free special»	17.0216	10.21
Bread «Rumlevskiy» with sunflower seeds	20.0544	11.97
Bread «Gelenovskiy for diabetic patients»	17.0199	10.98

**Table 3 — The quantitative content of zinc in bakery products, µg/g**

Product	The Zn concentration, (dried mass)	The Zn concentration, (native foodstuff)
French bread»Nemanskyi»	24.134	11.14
Bread «Spadar from Grodno»	16.4688	9.39
Bread «Grodzenskiy yeast free special»	14.0134	8.41
Bread «Rumlevskiy» with sunflower seeds	15.9084	8.66
Bread «Gelenovskiy for diabetic patients»	4.5849	2.95

As can be seen from the data presented in Tables 1–3, the concentration of copper in the finished product does not exceed 2.42 mg/g, iron — 12.66 µg/g, that of zinc — 11.14 µg/g. Thus, the use of these types of bakery products does not cover 30 % of the daily need for the studied elements [12–13]. Tables 4–7 show data from a study of the quantitative content of bioelements in premixes for bread enrichment.

**Table 4 — The bioelements composition in various functional food ingredients, µg/g**

Functional food ingredient	K	Ca	Cr	Mn	Fe	Cu	Zn
Spirulina( <i>Spirulinaplantensis</i> )	7420.7	878.7	0.5	10.8	297.9	0.3	22.4
Chlorella ( <i>Chlorellavulgaris</i> )	7144.1	1411.1	1.7	45.3	288.6	3.2	15.5
Oilseed meal:							
Soya	4964.2	15 600.8	0.6	47.8	299.0	927.1	69.4
Rape	4717.7	3471.5	2.3	31.7	86.7	29.0	47.3
Sunflower	7295.9	2379.2	4.2	32.1	133.6	83.9	88.4

According to the data presented in Table 4, the functional food ingredients contain essential elements at higher concentrations than various bakery products.

**Table 5 — The content of bioelements in bread with the addition of sunflower meal, µg/g**

Bioelement	Concentration	Average Statistical Error
Ca	1027.0320	± 59.30700
Cr	3.9901	± 1.34680
Cu	13.7717	± 1.77460
Fe	40.0399	± 2.76300
K	2387.5160	± 105.13000
Mn	9.1585	± 1.77350
Mo	2.3119	± 0.41976
S	2061.4430	± 398.37000
Se	0.6550	± 0.07068
Zn	37.1837	± 2.12990

**Table 6 — The content of bioelements in bread with the addition of rape meal, µg/g**

Bioelement	Concentration	Average Statistical Error
Ca	1562.6540	± 68.46800
Cr	3.9328	± 1.25060
Cu	10.2095	± 1.43120
Fe	46.1588	± 2.77680
K	2091.7590	± 92.10400
Mn	10.0489	± 1.73760
Mo	1.6628	± 0.33329
S	1666.8050	± 335.61000
Se	1.1956	± 0.08939
Zn	24.0459	± 1.60350

**Table 7 — The content of bioelements in bread with the addition of soya meal, µg/g**

Element	Concentration	Average Statistical Error
Ca	4558.0490	± 123.02000
Co	3.3550	± 0.72262
Cr	2.4182	± 1.03640
Cu	98.6359	± 14.75000
Fe	70.4004	± 3.60780
K	1911.0220	± 92.61300
Mn	14.8291	± 2.22160
Mo	0.3034	± 0.14963
S	3084.0350	± 479.70000
Se	0.5434	± 0.06341
Zn	550.0304	± 8.06730

The results of statistical processing of the obtained data on bioelements in flour and functional food ingredients comparative content are presented in Figures 1–3.

The data presented in Figures 1–3 demonstrate that the proposed functional ingredients (algae and oilseed meal) have a balanced elemental composition. They contain essential elements (copper, iron, zinc) at higher concentrations than the basis of bread — various flour. For the enrichment of bakery products with copper, the optimal functional ingredient is soybean meal, iron — algae, soybean meal and sunflower meal, zinc — soybean meal. All this made it possible to create recipes for bakery products based on STB 639–95 [14] with the introduction of functional ingredients (algae and oilseed meal).

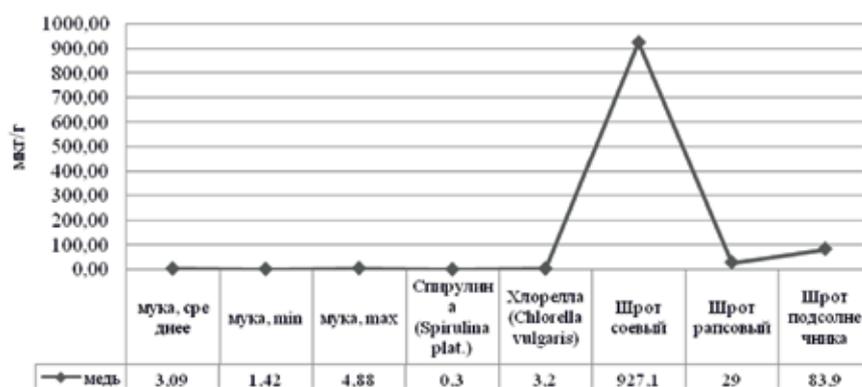


Figure 1 — The comparative content of cuprum in flour and functional food ingredients

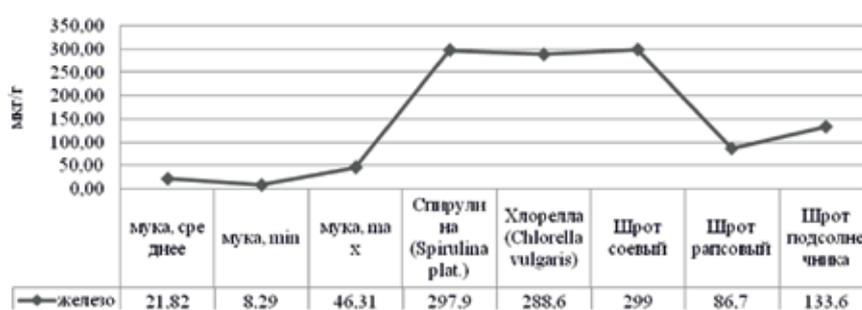


Figure 2 — The comparative content of iron in flour and functional food ingredients

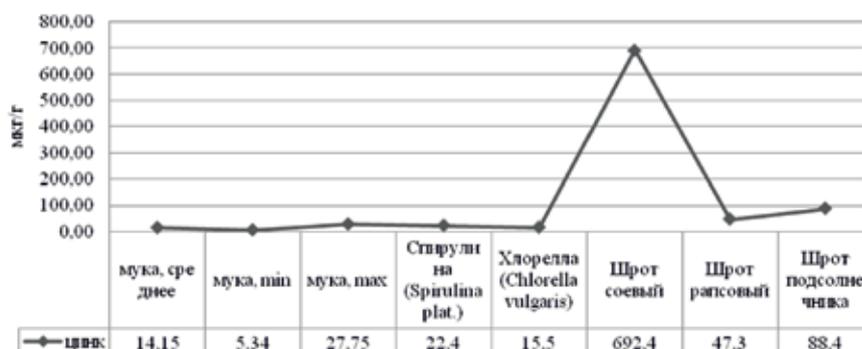


Figure 3 — The comparative content of zinc in flour and functional food ingredients

**Conclusion.** Introduction to the diet and the systematic use of enriched mass food products with natural functional ingredients containing essential elements in an easily accessible form for the body will significantly reduce the risks associated with overweight and help in nutritional correction.

The study confirmed the high bioelements' value of secondary food raw materials (algae and oilseed meal), which allowed them to be used as functional ingredients in the enrichment of mass-market foods, taking into account the most common disturbances in the nutrient balance of the body.

The developed bakery products can provide at least 30 % of the daily need of essential elements for all age and sex groups of the population of the Republic of Belarus.

## References

1. Fedorova, O.V. Looking for the possible ways of obesity prevention / O.V. Fedorova // Bul. S. Petersburg therapists association. 2005. — Ch. 2. — P. 79–80.
2. The overweight and obesity. Prophylaxis, diagnostics and treatment / G. Daniel [et al.]. — M.: BINOM, 2004. — 240 p.
3. Krupskaya, T.K. Regional particularities of micronutrient balance disturbances on children in Grodno and Grodno region / T.K. Krupskaya, L.P. Loseva // The letter of Belarusian Foundation for Fundamental Research. — 2018. — № 1. — P. 94–103
4. Gabdukaeva, L.Z. The characteristics of actual market of bakery products for functional diet / L.Z. Gabdukaeva, E.S. Sorokina // The letters of Technological University. — 2017. — Ch.20. — № 1. — P. 151–154.
5. Matveeva, T.V. Physiologically Functional Food Ingredients for Bakery / T.V. Matveev, S.Ya. Koreachkina. — Orel: State University, 2012. — P. 947.
6. Development and justification of the technology of functional bakery products / I.V. Matseichik [et al.] // The technologies of food and processing industries — products for healthy diet. 2016. — № 4. — P. 43–51.
7. Dracheva, L.V. The ways and methods of bakery products enrichment / L.V. Dracheva // The Russian bakery technology. — 2002. — № 2. — P. 20–21.
8. Smertin, E.S. New functional bakery products / E.S. Smertin, T.K. Kalenik, L.N. Fedeanina // The letters of TSEU. — 2009. — № 3. — P. 53–59.
9. Patent 4621504617, from 03/02/2015 «Elaboration and implementation of premixes with Se on the basis of Spirulina biomass» / L.P. Loseva [et al.].
10. Krupskaya, T.K. Possibilities of the method of an x-ray fluorescence analysis when evaluating essential element concentrations in food raw materials of plant origin. / T.K. Krupskaya, L.P. Loseva, S.S. Anufrik // Papers on Anthropology. — 2015. — № 1 — P. 101–106.
11. Loseva, L.P. X-ray fluorescent analysis as control method for microalgae biomass enriched with microelements obtaining / L.P. Loseva [et al.] // 4<sup>th</sup> International Baltic Sea Forum. — Kaliningrad, 2015. — P. 87.
12. The physiologic need norms in food elements and energy in various groups of population. — M., 1991. — 24 p.
13. Pokrovskiy, A.A. Metabolic aspects of pharmacology and food toxicology / A.A. Pokrovskiy. — M.: Medicine, 1979. — 184 p.
14. STB 639–95/ State Standards of Belarus. Belarusian bread. General technical norms. — State standard., 2010. — 31 p.

## ОСОБЕННОСТИ КОРРЕКЦИИ ПИТАНИЯ У ЛИЦ С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА

---

*Али Адиб Нуссейн Али, Лосева Л.П., Крупская Т.К.*

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

**Резюме.** В статье дан подробный анализ количественного содержания биоэлементов в муке различных видов и премиксах на основе вторичного сырья масличных культур и водорослей. Одним из наиболее оптимальных путей решения проблемы микронутриентного дефицита является обогащение пищевых продуктов питания массового производства. Показана возможность введения в рацион питания лиц с избыточной массой тела обогащенного хлеба в качестве профилактики полидисмикрозлементозов на примере г. Гродно и Гродненской области.

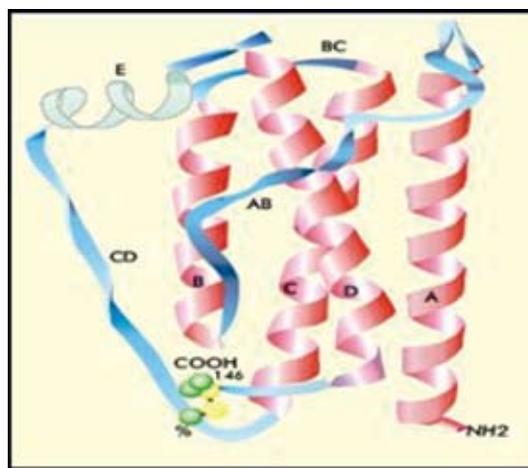
## THE DIRECT EFFECT OF LEPTIN HORMONE ON TYPE 2 DIABETES

*Alomer Rwad Ali Jebur*

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

**Summary.** Diabetes is considered to be the second type of disease that people are exposed to as a result of several reasons. Among these reasons is neglect of health due to excess or imbalance in the amount of sugar in the blood that results from several backgrounds of insulin defects in addition to the presence of some influencing hormones that contributed to the imbalance. Among these hormones is the hormone leptin known as the milk hormone, which is found in many women in men and its role in the direct and indirect effect on type 2 diabetes patients and find the value of the effect of this study. The prevalence of type 2 diabetes has multiplied during the past thirty years, despite the presence of other factors, but there is a strong relationship between eating a large amount of sugar and the risk of developing diabetes. Obesity, associated with a strong relationship with the consumption of sugar, is considered to be the greatest risk for developing diabetes, as obesity and diabetes are related to each other, as eating sugar in large quantities results in insulin resistance, which leads to the cells not being able to absorb the sugar present in the blood, which leads to high blood sugar, which may lead to diabetes mellitus is a gathering of metabolic ailments described by hyperglycemia coming about because of imperfections in insulin discharge, insulin activity, or both.

**Introduction.** Two significant types of diabetes were distinguished, type 1 and type 2. The absence of or a serious decrease in insulin emission because of the immune system or viral devastations of  $\beta$  cells is liable for type 1 diabetes, which represents 510 % of diabetic patients. The more predominant structure, type 2 diabetes, represents over 90 % of cases Type 2 diabetes generally starts as insulin opposition, a turmoil where the cells don't utilize insulin appropriately. As the requirement for insulin rises, the pancreas slowly loses its capacity to create it The absence of insulin activity or potentially emission in type 2 diabetes instigates hepatic glucose yield by hindering glycogen combination and animating glycogenolysis and gluconeogenesis then expanded paces of hepatic glucose creation bring about the advancement of unmistakable hyperglycemia, particularly fasting hyperglycemia.



**Figure 1 — Structure of leptin**

**Materials and research design.** Through practical study in the laboratory 20 samples were taken from people with type 2 diabetes and 10 samples were taken for people without the disease and the effect of leptin hormone on people with type 2 diabetes and people without the disease was studied.

**Research results and discussion.** This study was the first to demonstrate the level of leptin and its relationship to blood glucose levels as well as some biochemical parameters in the blood among females with diabetes. In addition to the evaluation of leptin, contributing risk factors were examined in addition to some biochemical features of type 2 diabetes mellitus and compared with those of controls. Understanding the role of leptin in diabetes as well as identifying risk factors and metabolic modifications will be beneficial in managing and controlling the disease although there is a significant correlation between diabetes and diet, but about a third of patients did not follow a diet. This calls for launching educational programs to show the importance of diet in controlling disease. The result that more than half of patients (55.5 %) have diabetes for less than 5 years confirm the idea that type 2 diabetes. Blood glucose levels were significantly higher in diabetic patients than controls, although diabetics were under treatment.

**Table 1 — Serum cholesterol and triglycerides in population**

Lipid Profile (mg/dl)	Controls	diabetics
Cholesterol	193.3 ± 33.2	199.2 ± 49.5
Triglycerides	118.3 ± 72.7	187.7 ± 103.2

**Table 2 — Leptin in population**

Sample Serum leptin	Serum leptin Controls	Serum leptin Diabetics
1	14.5	8.7
2	16.2	12.3
3	15.1	10.2
4	14.8	8.9
5	14.9	9.2
6	15.4	10.4
7	15.2	9.9
8	16.1	12.2

**Conclusion.** Diabetes is linked to history, household and that the ratio of leptin is low when are positive, diabetic patients, and there is an inverse correlation between the level of blood sugar and fat tripartite between leptin and the coefficient of body mass, cholesterol, high-density Oz t patients coining Z higher levels of, while creatine did not change in poop and the ratio of albumin to creatine was high in and blood of patients.

### References

1. Smyth, S, Heron A. Diabetes and obesity: The twin epidemics / S. Smyth, A. Heron // J. Nat. Med. — 2006. — Vol. 12. — P. 75–80.
2. Chen, L. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives / L. Chen, D.J. Magliano, P.Z. Zimmet // J. Nat. Rev. Endocrinol. — 2011. — Vol. 8. — P. 228–236.
3. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2007 / J. Diabetes Care. — 2008. — Vol. 31. — P. 96–615.

4. Standards of medical care in diabetes — 2011: Diabetes Care. — 2011. — Vol. 34, № 1. — P. 11–61.
5. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects / S.E. Kahn [et al.] // Evidence for a hyperbolic function. Diabetes. — 1993. — Vol. 42. — P. 1663–1672.
6. Devendra, D. Type 1 diabetes: Recent developments / D. Devendra, E. Liu, G.S. Eisenbarth // BMJ. — 2004. — Vol. 328. — P. 750–754.
7. Weight gain associated with intensive therapy in the diabetes control and complications trial. The DCCT research group. The DCCT research group // J. Diabetes Care. — 1988. — Vol. 11. — P. 567–573.
8. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The diabetes control and complications trial research group // N. Engl. J. Med. — 1993. — Vol. 329. — P. 977–986.
9. Hypoglycemia in the diabetes control and complications trial. the diabetes control and complications trial research group // J. Diabetes. — 1997. — Vol. 46. — P. 271–286.
10. Bluestone J.A, Herold K., Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. Nature. — 2010. — Vol. 464. — P. 1293–1300.
11. Yki-Jarvinen, H. Combination therapies with insulin in type 2 diabetes / H. Yki-Jarvinen // J. Diabetes Care. — 2001. — Vol. 24. — P. 758–767.
12. Riddle, M.C. The treat-to-target trial: Randomized addition of glargine or human NPH insulin to oral therapy of type 2 diabetic patients / M.C. Riddle, J. Rosenstock, J. Gerich // J. Diabetes Care. — 2003. — Vol. 26. — P. 3080–3086.
13. Lebovitz, H.E. Type 2 diabetes mellitus-current therapies and the emergence of surgical options / H.E. Lebovitz // J. Nat. Rev. Endocrinol. — 2011. — Vol. 7. — P. 408–419.
14. Schwartz, M.W. Jr Diabetes, obesity, and the brain / M.W. Schwartz, D. Porte // Science.
15. Morton, G.J. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism / G.J. Morton, M.W. Schwartz.

## **ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕПТИНА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА**

---

*Аломер Рвад Али Джебур*

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

**Резюме.** *Считается, что диабет является вторым типом заболевания, которому люди подвержены по нескольким причинам, в том числе из-за пренебрежения здоровьем из-за избытка или дисбаланса в количестве сахара в крови, вызванного несколькими факторами: дефектами инсулина, в дополнение к наличию некоторых влияющих гормонов, которые способствуют дисбалансу. Среди этих гормонов есть гормон лептин, известный как гормон молока, который встречается у многих женщин и мужчин и его роль в прямом и косвенном воздействии на пациентов с диабетом типа 2 и нахождение значения эффекта этого исследования. Распространенность диабета типа 2 увеличилась за последние тридцать лет, несмотря на наличие других факторов, но существует тесная связь между употреблением большого количества сахара и риском развития диабета. Ожирение, связанное тесной связью с потреблением сахара, считается самым большим риском развития диабета, так как ожирение и диабет связаны друг с другом и употребление сахара в больших количествах приводит к резистентности к инсулину. Это приводит к тому, что клетки не способны поглощать сахар, присутствующий в крови, что приводит к высокому уровню сахара.*

## THE EFFECT OF NIACIN AND ITS METABOLITES ON THE EXERCISE OF TRYPSIN ACTIVITY

---

*Andrievskii A.M.<sup>1</sup>, Yagupova Yu.V.<sup>1</sup>, Ryzhko I.L.<sup>2</sup>, Petrov S.A.<sup>1</sup>*

*Odessa I. I. Mechnikov National University, Faculty of Biology;*

*<sup>1</sup>Department of Biochemistry;*

*<sup>2</sup>Department of Hydrobiology and General Ecology,  
Odessa, Ukraine*

**Summary.** Niacin metabolites could act as protectors of enzymes and proteins, preventing their degradation by trypsin. This direction of research will help to find out the possibilities of interaction of the niacin derivatives with proteolytic enzymes providing the initial stage of metabolism of food protein.

**Objective:** To evaluate the effect of nicotinic acid and its metabolites on trypsin activity in its hydrolysis of the specific substrate  $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) in the *in vitro* system.

**Methods:** The activity of trypsin in the presence of niacin and its main metabolites was determined by spectrophotometry using a specific substrate, benzoylarginine-p-nitroanilide. The statistical analysis was carried out using the Student — Fisher method.

**Results:** In the *in vitro* system, nicotinic acid has been found to have a weak effect on enzyme activity. At the same time, nicotinamide and methylnicotinamide exhibit a significant activating effect on peptide hydrolase. The oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide, as well as the reduced form, has little effect on the manifestation of trypsin activity. High concentrations of the phosphorylated nicotine adenine dinucleotide have a weak activating effect on the activity of the peptide hydrolase.

**Conclusion:** The study revealed that low molecular weight derivatives of nicotinic acid had a weak or moderate activation effects on trypsin under conditions of its hydrolysis of the BAPNA substrate *in vitro*. High molecular weight metabolites of niacin were unequal in interaction with trypsin.

**Introduction.** High molecular weight metabolites of nicotinic acid occupy key positions in providing many metabolic processes controlled by oxidoreductases. In this case, they are co-enzymes or carriers of hydrogen ions, binding, in particular of glucose oxidation, citrate cycle, oxidative phosphorylation reactions into a single chain. It is these — coenzyme — functions of niacin derivatives that have now been comprehensively and deeply studied [1, 2, 3]. However, interest in studying other non-enzyme functions of vitamins and their metabolites has not diminished over the last few decades [4, 5, 6]. Thus, very recent studies have been aimed at studying the effects of certain oxidoreductants (in particular niacin derivatives) on proteolytic enzymes of the mammalian circulatory system [7]. As a result of experiments carried out in the *in vitro* system, effects of activation of plasmin by niacin in proteolysis of fibrin were found.

Antitumor properties of metal alloyed complexes with nicotinic acid [8] were found in a separate work. Lee and Yang [9] have shown that nicotinamide riboside reduces the level of neuroinflammatory

process, restores cognitive function, and reduces the expression in the brain of amyloid protein precursor in experimental diabetes in mice.

The most interesting results from our point of view are presented in the work [10]. The authors investigated the protective effect of NAD<sup>+</sup> and NADP on liver dehydrogenases and quail muscles in the case of proteolysis of these enzymes by trypsin in an *in vitro* experiment. It turned out that the niacin metabolites used could act as protectors of enzymes and proteins, preventing their degradation by trypsin.

Unfortunately, research into the direct effects of nicotinic acid metabolites on proteolytic enzymes (in particular trypsin) in the gastrointestinal tract of mammals and humans has not been found in the literature available to us. We believe that this direction of research is relevant and will help to find out the possibilities of interaction of niacin derivatives with trypsin, as well as with other proteolytic enzymes providing the initial stage of metabolism of food protein.

That is why this study was conducted to evaluate the effect of nicotine acid and its metabolites on trypsin activity in its hydrolysis of the specific substrate  $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) in the *in vitro* system.

In order to achieve the above object, the following goals were solved: 1) to determine trypsin activity in the presence of nicotine acid; 2) to analyze the activity of trypsin in the presence of nicotinamide and methylnicotinamide; 3) to investigate trypsin activity in the presence of oxidized and reduced forms of NAD<sup>+</sup>; 4) to determine trypsin activity in the presence of NADP.

**Materials and research design.** An enzyme preparation of bovine pancreatic trypsin («Serva,» Germany) was used, which was prepared by diluting 2 mg of the dry preparation in 2 ml of 0.1 M glycine-NaOH buffer pH 9.0 (final concentration in the incubation medium: 33  $\mu$ g/ml).

Trypsin activity was determined as follows. To the test samples containing 0.1 ml of trypsin solution were added 2.3 ml (in the case of effector) or 2.4 ml of glycine-NaOH buffer pH 9.0, after which 0.1 ml of nicotinic acid or its metabolite was added and maintained for 5–10 minutes at 37 °C. Thereafter, 0.5 ml of a 1 mM aqueous solution of BAPNA («Serva,» Germany) was added to the samples, and the extinction value ( $\lambda = 382.5$  nm) was immediately determined at «zero» time against the total control sample, which contained only the trypsin buffer and substrate and was indicative of the spontaneous hydrolysis of BAPNA. Further substrate cleavage was recorded after 30 and 60 minutes of incubation. The dynamics of the extinction index ( $\Delta E$ ) were determined from the said time intervals. In all experiments, the effects of the vitamin and its metabolites on the spontaneous hydrolysis of the used substrate were separately determined, for which purpose samples without enzyme were prepared under equal conditions, but with the maximum amount of vitamin or its metabolite, using their initial solutions.

The final concentrations of active ingredients — vitamin and its metabolites — in the incubation medium were: 1) nicotinic acid-Na («Sigma,» USA) — 228  $\mu$ M; 22.8  $\mu$ M; 2.28  $\mu$ M; 0.228  $\mu$ M; 2) nicotinamide («Sigma,» USA) — 273  $\mu$ M; 27.3  $\mu$ M; 2.73  $\mu$ M; 0.273  $\mu$ M; 3) methylnicotinamide («Sigma,» USA) — 193  $\mu$ M; 19.3  $\mu$ M; 1.93  $\mu$ M; 0.193  $\mu$ M; 4) nicotinamide adenine dinucleotide oxidized («AppliChem,» Germany) — 47  $\mu$ M; 4.7  $\mu$ M; 0.47  $\mu$ M; 0.047  $\mu$ M; 5) nicotinamide adenine dinucleotide reduced («AppliChem,» Germany) — 47  $\mu$ M; 4.7  $\mu$ M; 0.47  $\mu$ M; 0.047  $\mu$ M; 6) nicotinamide adenine dinucleotide phosphorylated-Na («AppliChem,» Germany) — 43.6  $\mu$ M; 4.36  $\mu$ M; 0.436  $\mu$ M; 0.044  $\mu$ M.

The relative activity of trypsin was calculated by the formula:

$$RA = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 1000}{v \cdot t \cdot k},$$

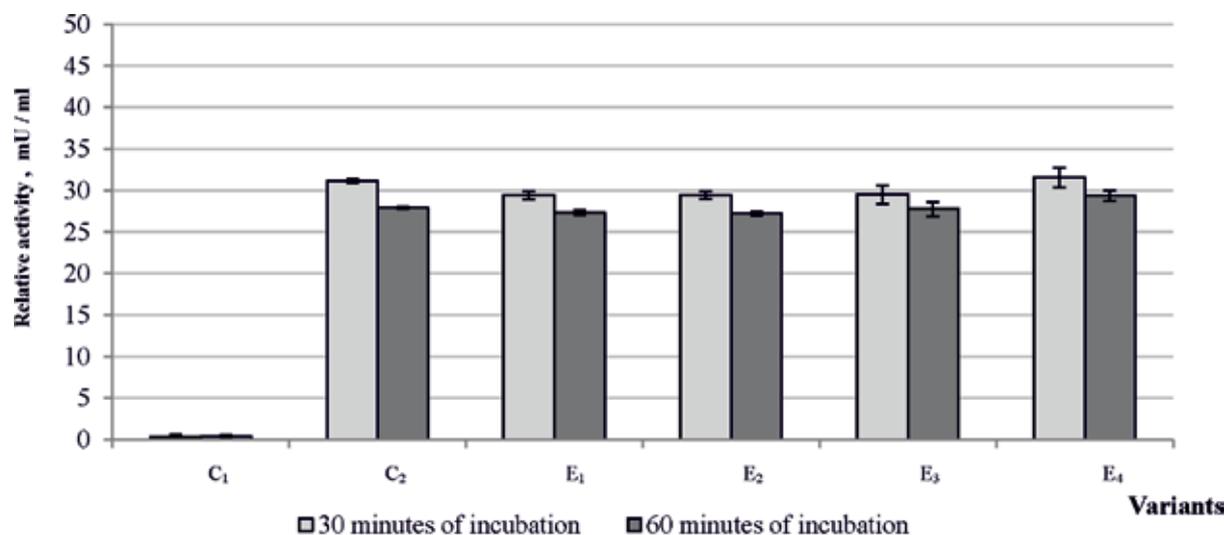
where RA is the relative activity of the enzyme expressed in milliunits (mU) attributed to 1 ml of trypsin solution. The amount of peptide hydrolase was taken as 1 mU activity, which resulted in the formation of 1  $\mu\text{m}$  of p-nitroaniline in 1 minute at 37 °C;  $\Delta E$  is the difference between the extinction values for 30 and 60 minutes of incubation and at «zero» time; 1000 is the conversion factor of units in milliliters; V is the volume of incubation medium (ml); v is the volume of enzyme solution in the incubation medium (ml); t is the duration of enzymatic hydrolysis of the substrate (min); k is the coefficient of conversion of extinction units into micromoles of p-nitroaniline formed by the hydrolysis of BAPNA (in this case  $k = 10$ ).

Statistical data processing was performed according to the Student — Fisher method. Calculations were made using the «Microsoft ® Excel» package.

**Research results and discussion.** Despite differences in structure and reactivity, none of the nicotinic acid metabolites used, as well as the acid itself, do not practically affect the spontaneous hydrolysis of BAPNA in the alkaline medium. This can be seen in all histograms (Figures 1–6), where the results for variant «C<sub>1</sub>» are given.

The experimental data obtained by us allow one to analyze the effect of a number of derivatives of vitamin PP group on trypsin during manifestation of its activity towards BAPNA.

Thus, the nicotinic acid in all the selected concentrations proved to be indifferent to trypsin during the first 30 minutes of incubation, and only by the end of the incubation period in samples with maximum niacin content an activating effect was observed in the work of the proteolytic enzyme (Figure 1).

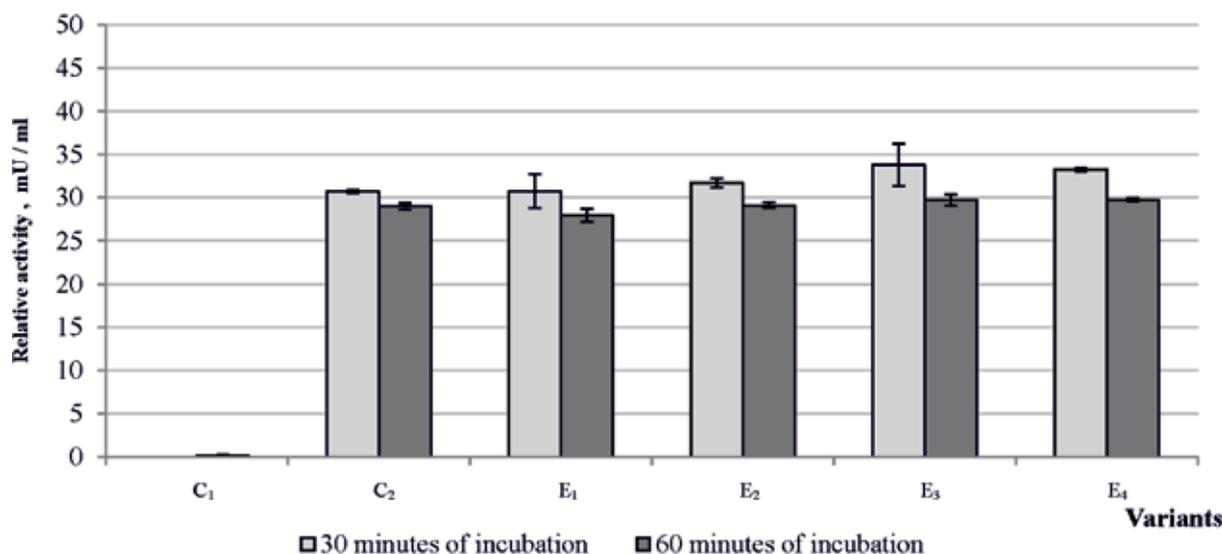


**Figure 1 — Effect of nicotinic acid on trypsin activity:**

C<sub>1</sub> — starting solution of nicotinic acid (228  $\mu\text{M}$ ); C<sub>2</sub> — trypsin; E<sub>1</sub> — trypsin with nicotinic acid (0.228  $\mu\text{M}$ ); E<sub>2</sub> — trypsin with nicotinic acid (2.28  $\mu\text{M}$ ); E<sub>3</sub> — trypsin with nicotinic acid (22.8  $\mu\text{M}$ ); E<sub>4</sub> — trypsin with nicotinic acid (228  $\mu\text{M}$ );  $n = 3$

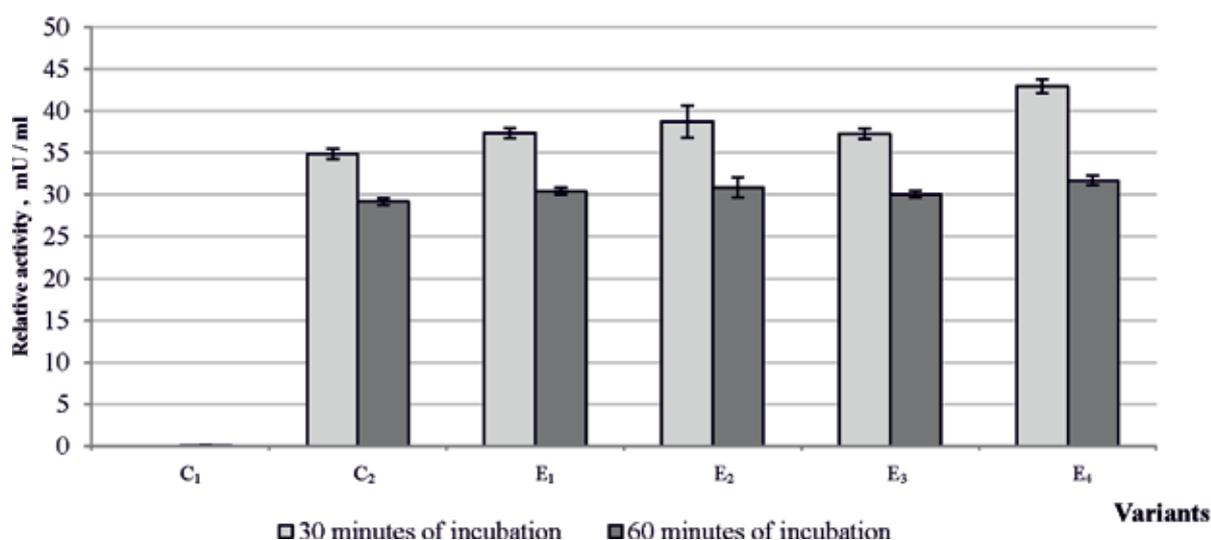
There was a weak tendency for the metabolite to have a positive effect on trypsin activity during the first 30 minutes of incubation (Figure 2).

In contrast to nicotine, the methyl derivative proved to be more effective: during the first 30 minutes of exposure, a gradual increase in trypsin activity was observed in the presence of this metabolite (Figure 3).



**Figure 2 — The effect of nicotinamide on trypsin activity:**

C<sub>1</sub> — starting solution of nicotinamide (273  $\mu$ M); C<sub>2</sub> — trypsin; E<sub>1</sub> — trypsin with nicotinamide (0.273  $\mu$ M); E<sub>2</sub> — trypsin with nicotinamide (2.73  $\mu$ M); E<sub>3</sub> — trypsin with nicotinamide (27.3  $\mu$ M); E<sub>4</sub> — trypsin with nicotinamide (273  $\mu$ M); n = 3

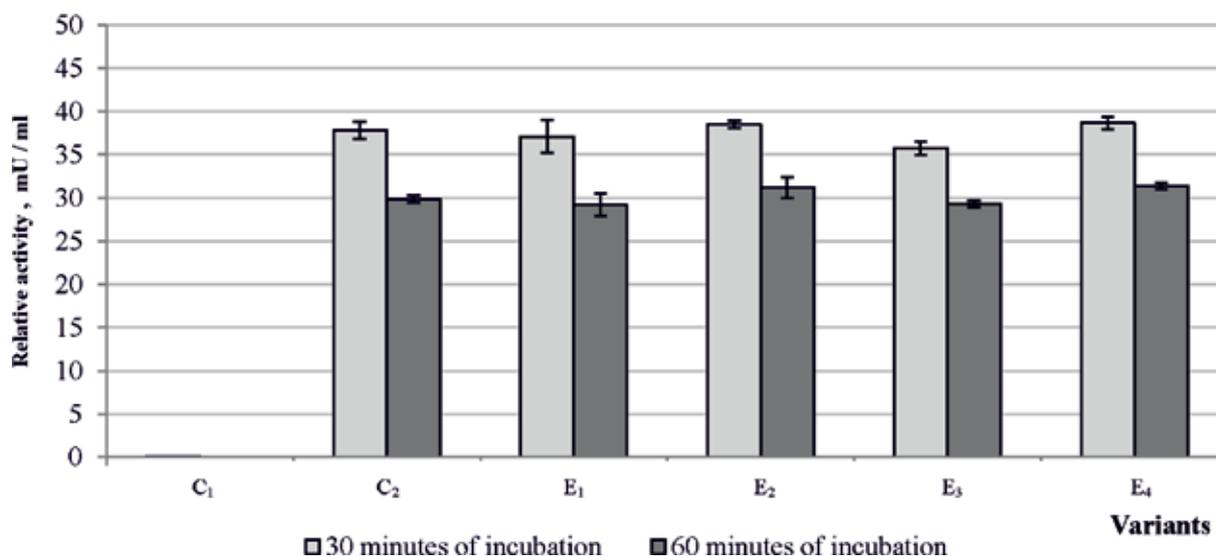


**Figure 3 — Effect of methyl nicotinamide on trypsin activity:**

C<sub>1</sub> — starting solution of methyl nicotinamide (193  $\mu$ M); C<sub>2</sub> — trypsin; E<sub>1</sub> — trypsin with methyl nicotinamide (0.193  $\mu$ M); E<sub>2</sub> — trypsin with methyl nicotinamide (1.93  $\mu$ M); E<sub>3</sub> — trypsin with methyl nicotinamide (19.3  $\mu$ M); E<sub>4</sub> — trypsin with methyl nicotinamide (193  $\mu$ M); n = 3

It is interesting to note that under the conditions of our experiments one of the most complex metabolites of nicotinic acid — nicotinamide adenine dinucleotide in oxidized form — turned out to be completely inert to the active enzyme. At the same time, the presence of a low concentration reduced nicotinamide adenine dinucleotide somewhat stimulated peptide hydrolase, which was observed throughout the incubation period (Figure 4 and Figure 5).

Finally, the phosphorylated form of nicotinamide adenine dinucleotide under conditions of incubation with trypsin showed a weak enzyme activation effect, especially at high metabolite concentrations (Figure 6).

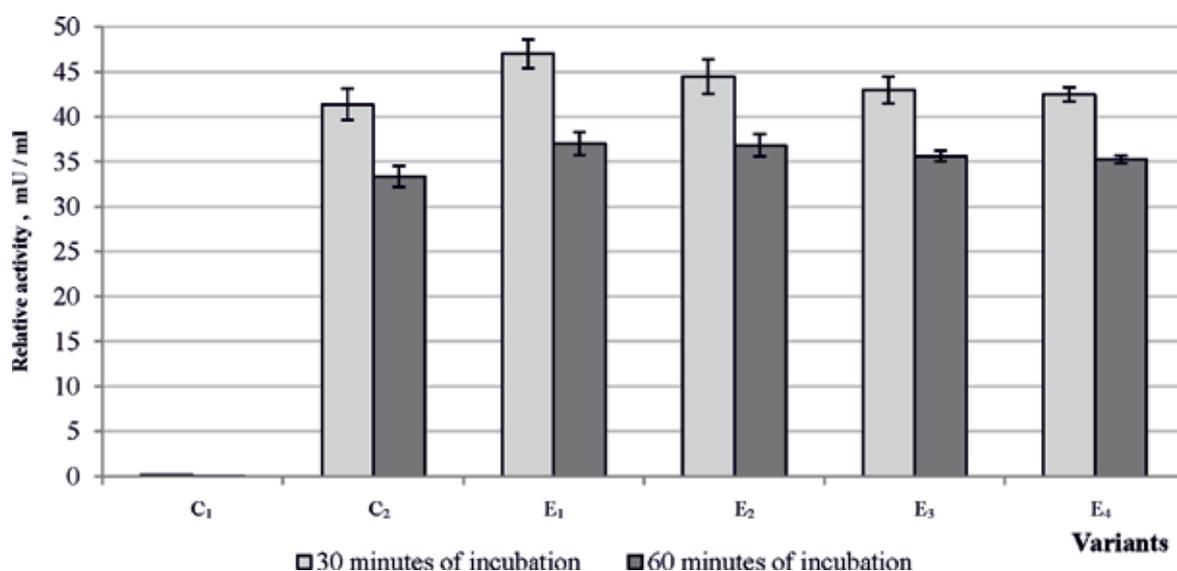


**Figure 4 — Effect of nicotinamide adenine dinucleotide oxidized on trypsin activity:**

C<sub>1</sub> — starting solution NAD<sup>+</sup> (47 μM); C<sub>2</sub> — trypsin; E<sub>1</sub> — trypsin with NAD<sup>+</sup> (0.047 μM);

E<sub>2</sub> — trypsin with NAD<sup>+</sup> (0.47 μM); E<sub>3</sub> — trypsin with NAD<sup>+</sup> (4.7 μM);

E<sub>4</sub> — trypsin with NAD<sup>+</sup> (47 μM); n = 3



**Figure 5 — Effect of nicotinamide adenine dinucleotide reduced on trypsin activity**

C<sub>1</sub> — starting solution NADH (47 μM); C<sub>2</sub> — trypsin; E<sub>1</sub> — trypsin with NADH (0.047 μM);

E<sub>2</sub> — trypsin with NADH (0.47 μM); E<sub>3</sub> — trypsin with NADH (4.7 μM);

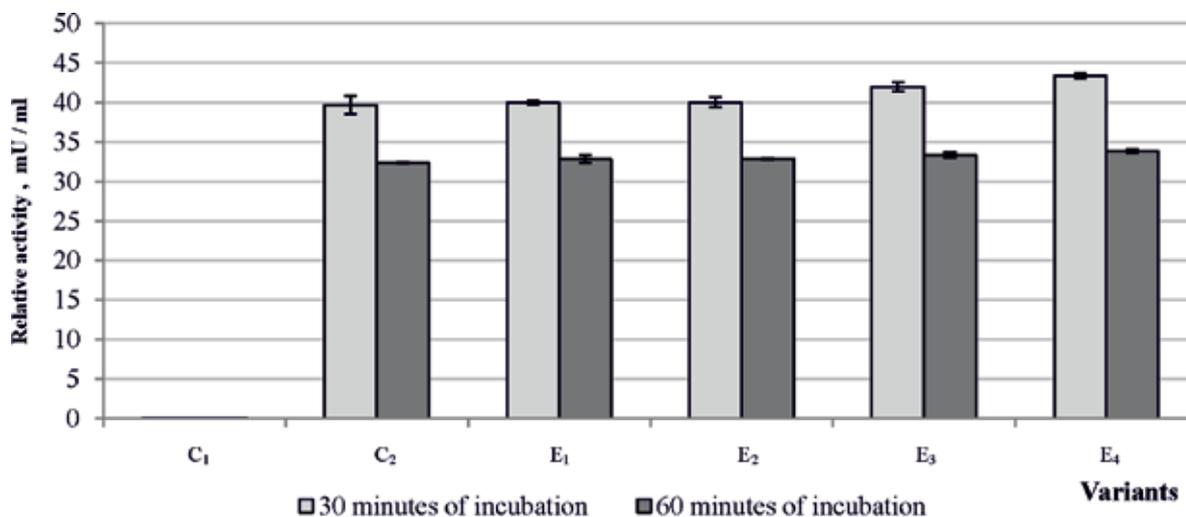
E<sub>4</sub> — trypsin with NADH (47 μM); n = 3

Thus, the results we obtained on the one hand indicate a low reactivity of the compounds of group PP to trypsin reaction groups, and on the other hand indicate a high level of resistance of the peptide hydrolase to niacin metabolites. As for the observed weak effects of trypsin activation, they are most likely related to the non-specific interaction of these compounds with hydrophobic regions of the polypeptide chain of the enzyme, resulting in a change in the conformation of the enzyme and, as a consequence, an increase of its activity.

However, it should be noted that in our study the effects of niacin and its metabolites were observed at the same weight ratios; the concentrations of low molecular weight metabolites were 5 times lower than the concentrations of high molecular weight metabolites. In this regard, the results

of the study of the effect on trypsin of nicotinic acid and its metabolites, at similar (equimolar) concentrations aligned with nicotinic acid may be interesting.

Unfortunately, our study does not yet allow us to judge the natural non-enzyme function of nicotine acid and its metabolites — in this case regulatory with respect to trypsin — but it encourages us to investigate phylogenetic related trypsin-like enzymes, as well as to compare their response to metabolites with that of chymotrypsin, the active center of which is adapted to interact with aromatic or cyclic groups of radicals of amino acids and other organic compounds.



**Figure 6 — Effect of nicotine-imide adenine dinucleotide phosphorylated on trypsin activity:**

C<sub>1</sub> — starting solution NADP (43.6 μM); C<sub>2</sub> — trypsin; E<sub>1</sub> — trypsin with NADP (0.044 μM);

E<sub>2</sub> — trypsin with NADP (0.436 μM); E<sub>3</sub> — trypsin with NADP (4.36 μM);

E<sub>4</sub> — trypsin with NADP (43.6 μM); n = 3

**Conclusions.** 1. Niacin and its metabolites do not affect the spontaneous hydrolysis of the specific substrate of trypsin — BAPNA.

2. Low molecular weight derivatives of nicotinic acid have a weak or moderate activation effect on trypsin under conditions of its hydrolysis of the BAPNA substrate *in vitro*.

3. High molecular weight metabolites of niacin— NAD<sup>+</sup>, NADH and NADP — are unequal in interaction with trypsin: NAD<sup>+</sup> — indifferent, NADH and NADP at these concentrations manifest themselves as weak peptide hydrolase activators.

**Ethics Approval and Consent to Participate.** No humans or animals were used for this study.

**Human and Animal Rights.** No humans or animals were used for this study.

**Consent for Publication.** Not necessary.

**Availability of Data and Materials.** The data submitted has not been previously published.

**Funding.** The research is carried out with the financial support of Odessa I. I. Mechnikov National University.

**Conflict of Interest.** The authors do not have any conflict of interest.

**Acknowledgements.**

## References

1. Halmuradov, A.G. Membrane transport of coenzyme vitamins and coenzymes / A.G. Halmuradov, V.N. Totsky, R.V. Chagovets. — Kiev: Naukova Dumka. — 1982. — P. 280.

2. Halmuradov, A.G. New in the study of the exchange of niacin and nicotinamide coenzymes / A.G. Halmuradov, T.G. Gulyamova // Questions of medical chemistry. — 1992. — Vol. 38, № 4. — P. 11–14.
3. Scherbakov, D.L. Peroxide metabolism of cells and subcellular structures under stress under aging conditions and its correction / D.L. Scherbakov, V.N. Meshchaninov // Health, demography, ecology of Finno-Ugric peoples. — 2017. — Vol. 3. — P. 77–80.
4. Rozanov, A.Ya. The influence of thiamine and its metabolites on the activity of pepsin and trypsin / A.Ya. Rozanov, I.V. Gavriilyuk, S.A. Petrov // J. Ukr. biochem. — 1990. — Vol. 62, № 1. — P. 102–104.
5. Sergeeva, L.A. The role of DNA repair enzymes in the implementation of genetic damage and cell death / L.A. Sergeeva // Problems of cybiol. — 1998. — Vol. 4. — P. 31–36.
6. Sobolev, D.T. Indicators of protein and carbohydrate metabolism in the blood serum of cows when using premix enriched with niacin, biotin and cyanocobalamin in their diets / D.T. Sobolev, N.P. Razumovsky, V.F. Soboleva // Scientific notes of UO VGAVM. — 2018. — Vol. 54, № 3. — P. 47–50.
7. Nikandrov, V.N. The effect of oxidoreductants on proteolytic processes *in vitro* / V.N. Nikandrov, N.S. Pyzhova // Bulletin of the Polesie State University. Series of Natural Sciences. — 2019. — Vol. 1. — P. 12–28.
8. Shu, L. Niacin-Ligated Platinum (IV)-Ruthenium (II) Chimeric Complexes Synergistically Suppress Tumor Metastasis and Growth with Potentially Reduced Toxicity in Vivo / L. Shu [et al.] // Chem Commun (Camb). — 2020. — Vol. 56, № 16. — P. 64–68.
9. Lee, H.J. Supplementation with Nicotinamide Riboside Reduces Brain Inflammation and Improves Cognitive Function in Diabetic Mice / H.J. Lee, S.J. Yang // International journal of molecular sciences. — 2019. — Vol. 20, № 17. — P. 4196–4206.
10. Park, I.K. Effects of nicotinamide coenzymes on the stability of enzyme activities and proteins in niacin-deficient quail tissues against trypsin treatment / I.K. Park, Y.H. Koh // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. — 2001. — Vol. 128, № 1. — P. 99–107.

## ЭФФЕКТ НИАЦИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ НА ПРОЯВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА

---

*Андриевский А.М.<sup>1</sup>, Ягунова Ю.В.<sup>1</sup>, Рыжко И.Л.<sup>2</sup>, Петров С.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,  
г. Одесса, Украина;*

<sup>2</sup>*Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, факультет биологии,  
г. Одесса, Украина*

**Резюме.** *Метаболиты ниацина могут выступать в качестве протекторов ферментов и белков, предотвращая их деградацию под действием трипсина. Данное направление исследований поможет обнаружить возможность взаимодействия производных ниацина с протеолитическими ферментами, обеспечивающими начальную стадию метаболизма пищевых белков.*

**INFLUENCE OF A BIOLOGICAL PRODUCT BASED ON THE BACILLUS THURINGIENSIS MELANINOGENIC STRAIN ON GERMINATING CAPACITY AND MORPHOLOGY OF *VERBASCUM THAPSUS L.*, *VERBASCUM NIGRUM L.*, *CENTAUREA SCABIOSA L.*, *BETONICA OFFICINALIS L.*, AND *VISCARIA VULGARIS* BERNH**

---

*Bashilov A.V.<sup>1</sup>, Shutava H.G.<sup>1</sup>, Ovsepyan A.S.<sup>2</sup>, Avetisyan S.V.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus;*

<sup>2</sup>*Arbiotechnology of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia,  
Yerevan, Armenia*

**Summary.** The germinating capacity, length of seedlings and roots during germination of *Verbascum thapsus L.*, *Verbascum nigrum L.*, *Centaurea scabiosa L.*, *Betonica officinalis L.*, and *Viscaria vulgaris* Bernh. seeds, treated with various concentrations of the stimulator, were evaluated. The effect of the melanin bacterial preparation on the morphological parameters of plants was species- and dose-specific in nature. The optimal concentration for use on the studied plants should include concentrations of up to 0025 %.

**Introduction.** The rapid development of cities in recent decades has led to a partial loss of the «green» stability of urban ecosystems and the formation of a faceless landscape with the lost potential of the functions assigned to it. At the same time, for many years, imported, mostly annual species and varieties of plants, for which significant budgetary funds are spent annually, have been traditionally used for landscaping of cities. Caring for such plantings is time-consuming, requires attraction of significant human and material resources for annual planting, care, removal of plants that have lost their decorativeness in autumn. At the same time, over the years, the tendency towards the most active involvement of native flora species in the landscaping of urban spaces has been observed throughout the world [1, 2]. Moreover, perennial species are most actively used which for several years can maintain high decorativeness in plantings, which means that they can significantly reduce the cost of procurement and care.

The limiting factor for the industrial-scale cultivation of highly decorative species of perennial plants is the lack of effective technologies for producing high-quality planting material. Recently, the possibilities of using biopreparations regulating the cascade of processes involved in increasing the stability of species have been actively investigated. The use of new types of biopreparations with a phytostimulating effect in the landscaping technology will make it possible to obtain high-quality planting material with high decorative value in the required volumes. The biopreparations are characterized by complex immunomodulatory and phyto regulatory properties, stimulate plant growth and development, increase stress resistance and do not negatively affect the environment. Currently, the efforts of scientists are aimed at developing ways to use environmentally friendly growth stimulators obtained by biotechnological methods, including those based on microorganisms. One of these preparations, which at the same time exhibits protective properties, is melanin [3]. However, information on the use of melanin-containing preparations as active plant growth regulators is limited.

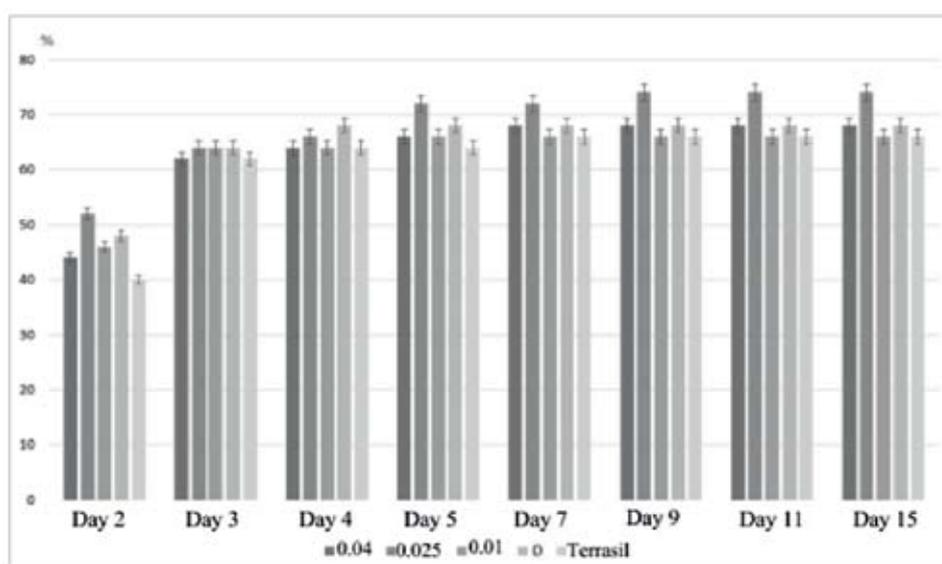
The study objective was to study the effect of a biopreparation based on the melaninogenic strain of *Bacillus thuringiensis* on the germinating capacity and morphological parameters of highly decorative species of the flora of Belarus, promising for urban environment landscaping.

**Materials and research design.** For a trial establishment we used seeds of bullock’s lungwort (*Verbascum thapsus L.*), dark mullein (*Verbascum nigrum L.*), scabiose centaury (*Centaurea scabiosa L.*), common betony (*Betonica officinalis L.*), and red German catchfly (*Viscaria vulgaris Bernh.*), collected in 2019. The seeds in an amount of 100 pcs. were sprouted in Petri dishes on filter paper where water (as a control) and bacterial preparation at concentrations of 0.04, 0.025, and 0.01 % were added. For a comparative evaluation of the effectiveness, Terrasil was used at a concentration of 0.01 %, which is approved for use in Belarus. The microscopic examination was performed using a LOMO MSP 1 microscope equipped with a TCA-5.0 digital camera. The bacterial preparation of melanin supplied by SPC «Armbiotechnology» of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia was used. The obtained results were processed using the M.Excel statistical software package.

**Research results and discussion.** The morphological parameters of bullock’s lungwort, dark mullein, scabiose centaury, common betony, and red German catchfly treated with various concentrations of stimulator were assessed during germination. According to the classification of types of organic rest of seeds by M.G. Nikolaeva [4] there is no organic rest of seeds in mullein plants, scabiose centaury, red German catchfly. Seeds germinate in 6–10 days. The germs of the seeds of the common betony, as a rule, are in a state of deep physiological rest, therefore this plant is characterized by low germinating capacity and slow germination of seeds.

Thus, to study the effectiveness of the use of the melanin-containing preparation, plant seeds with different types of rest were selected, which makes it possible to objectively evaluate the prospects of using bacterial melanin to obtain high-quality planting material.

Figure 1 shows the germinating capacity rate of a scabiose centaury. Compared to the control, an increase in germinating capacity was observed for a 0.025 % concentration of the melanin preparation. 0.04 and 0.01 % melanin concentrations did not contribute to an increase in the germinating capacity of this taxon in comparison with the control.



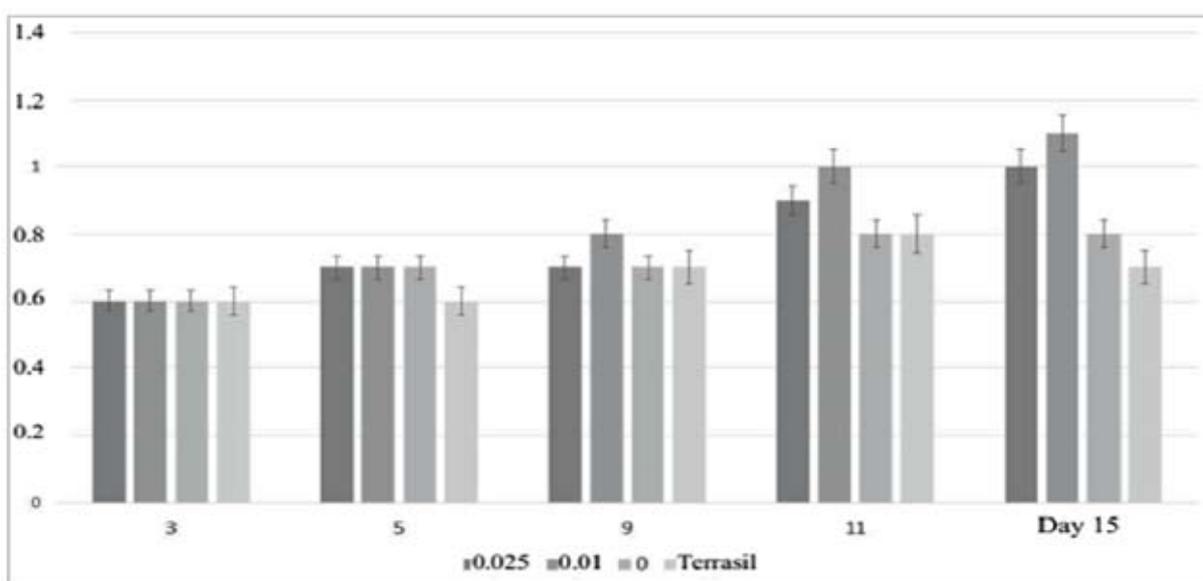
**Figure 1 — Germinating capacity of scabiose centaury seeds when using different concentrations of stimulator**

Figure 2 presents the results of measuring the length of scabiose centaury seedlings, from which it can be seen that the concentrations of 0.025 and 0.01 % positively influenced this morphological parameter.

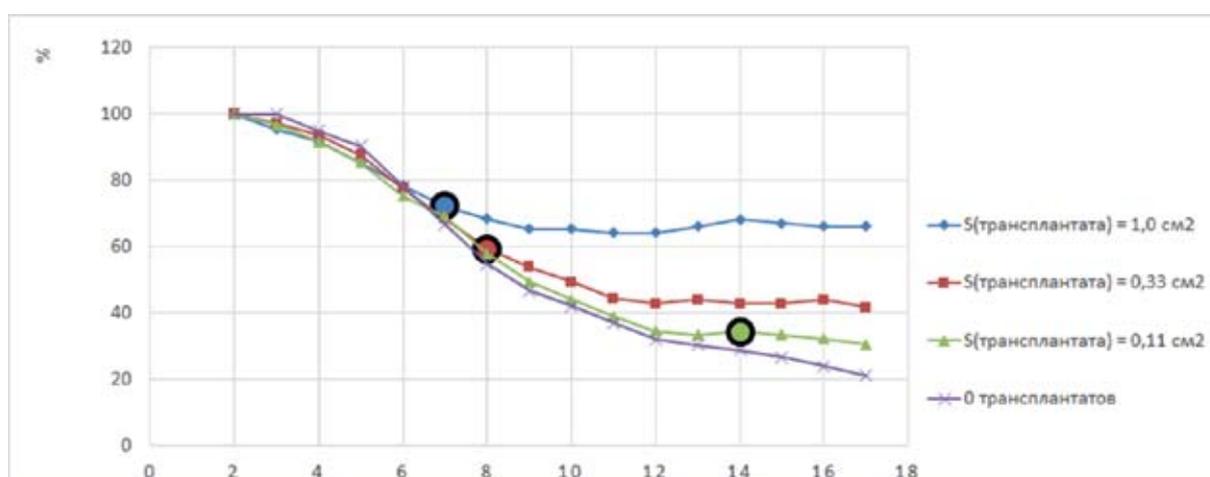
An increase in the length of the main root was observed for dark mullein up to 5 days in comparison with the control when soaked in a stimulator solution with a concentration of 0.025 and 0.01 %. However, the positive effect was leveled subsequently (Figure 3). It is also noted that the use of the 0.025 % concentration of the melanin preparation allows for an increase in germinating capacity on the 3rd day after soaking.

For the common betony, a positive effect on the germinating capacity rate was shown at the 0.025 % concentration of the melanin preparation (Figure 4).

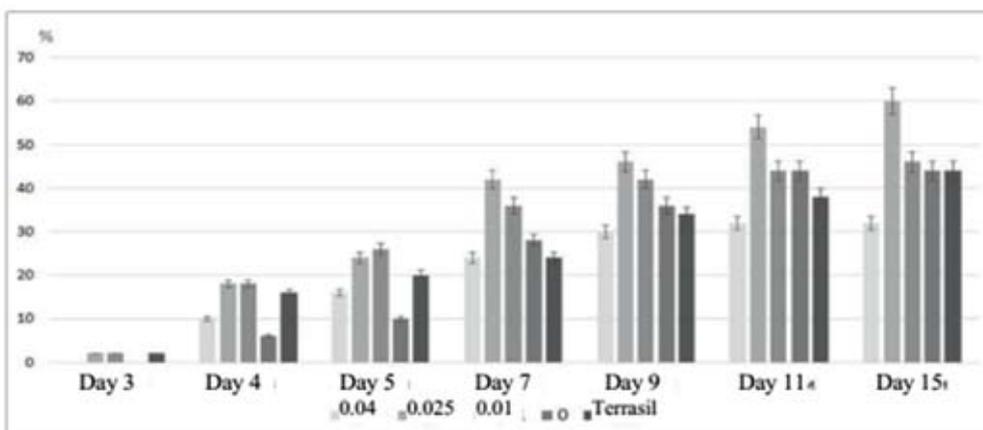
Figure 5 shows the average length of common betony roots depending on the concentration of the melanin preparation. The preparation concentrations of 0.025 and 0.01 % had a pronounced stimulating effect on the length of the roots.



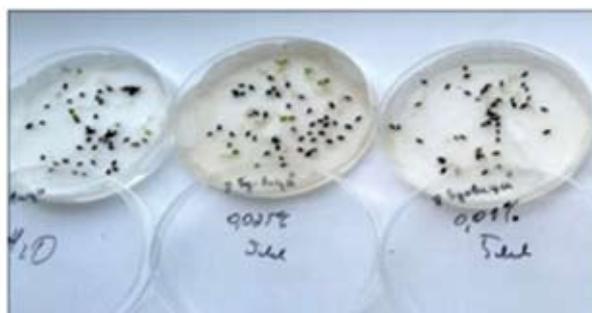
**Figure 2 — The average length of e scabiose centaury seedlings (cm) depending on the concentration of the stimulator ( % )**



**Figure 3 — The average length of the dark mullein main root, depending on the concentration of the stimulator ( % )**

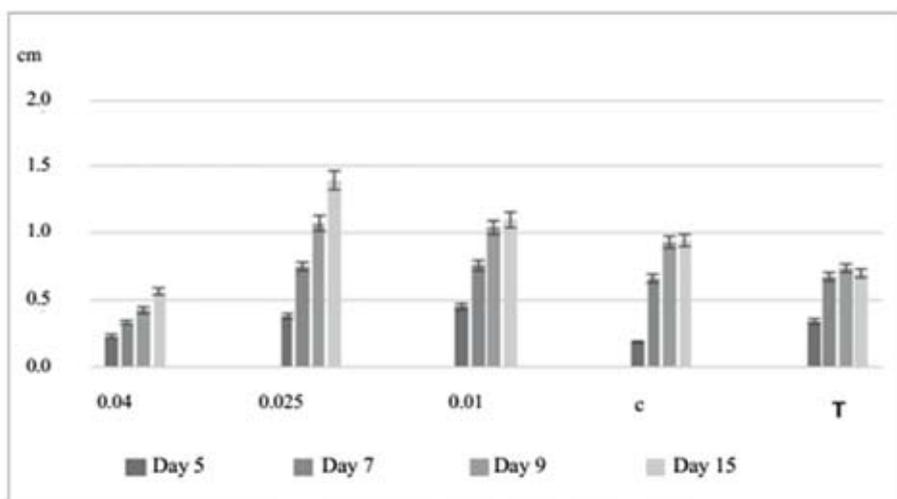


a



b

**Figure 4 — Germinating capacity (a) and appearance (b) of common betony seeds depending on the concentration of the stimulator ( % )**

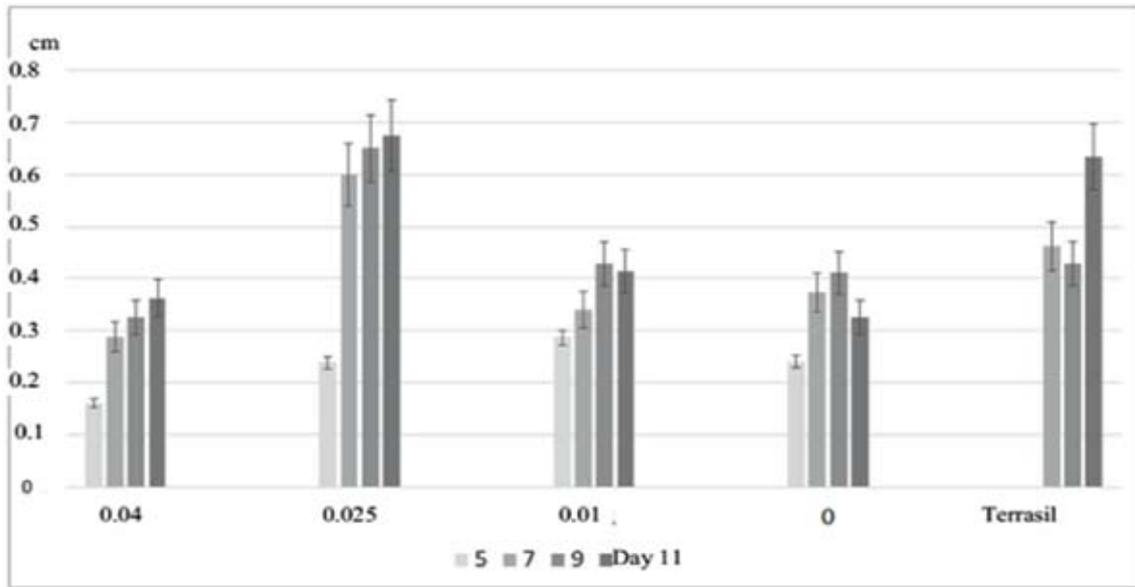


**Figure 5 — Average length of common betony roots depending on the concentration of the stimulator ( % ) (c — control, T — Terrasil, 001 %)**

From Figure 6, where the results of evaluation of the average length of the bullock's lungwort roots are presented, it can be seen that for the concentration of 0.025 %, a significant increase in the indicator was observed on days 7–11.

The root morphology was also studied using a light microscope with an integrated camera. It was noted that the use of the melanin preparation at concentrations of 0.01 and 0.025 % led to appearance of numerous root fibrillas in the absorption zone of the common betony seeds due to the effect of

melanin on the process of epiblema growth, which was not observed to such an extent in control plants (Figure 7). At the same time, an increase in the concentration to 0.04 % for scabiose centaury led to a decrease in the number of root fibrillas (Figure 8).



**Figure 6 — The average length of the bullock's lungwort roots depending on the concentration of the stimulator ( %)**

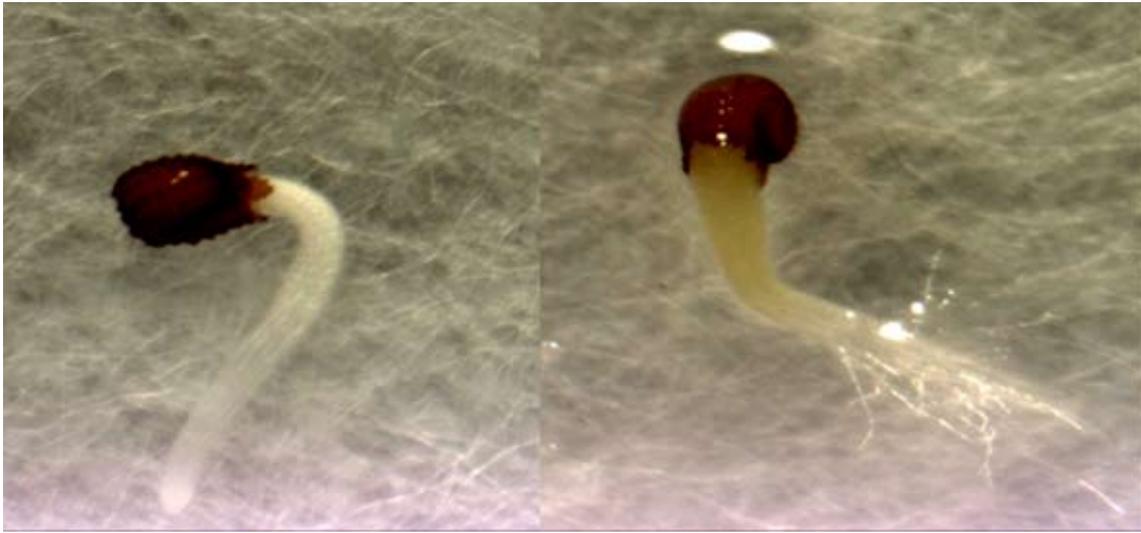


**Figure 7 — Germination of common betony seeds with the usage of melanin preparation at a concentration of 0.01 % (left) and in control (water) on the right**



**Figure 8 — Germination of scabiose centaury seeds with the usage of melanin preparation at concentrations of 0.04 % (left) and 0.025 % (right)**

For red German catchfly, the use of a melanin concentration of 0.04 % led to appearance of numerous secondary roots and indicated the beginning of secondary root growth, while in plants in the control, only the central root grew in length (Figure 9). At the same time, root growth in length stopped when the melanin preparation was added.



**Figure 9 — Germination of red German catchfly seeds when using the melanin preparation (control, water — on the left) at a concentration of 0.04 % (on the right)**

**Conclusion.** The effect of the melanin bacterial preparation on the morphological parameters of plants was species- and dose-specific in nature. Concentrations of up to 0.025 % should be attributed to optimal for use on highly decorative flora plants since the concentration of 0.04 % during prolonged (up to 15 days) use did not lead to a positive effect, and in some cases reduced the main morphological parameters. The most pronounced effect of the use of the preparation was revealed on the first days of seed sprouting, which allows the use of bacterial melanin to increase the seedling vigor. It should also be noted that the preparation had a more pronounced positive effect on seeds with a longer germination period.

This study was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research.

### References

1. Hrapko, O.V. Prirodnyy akcent v gorodskom ozelenenii / O.V. Hrapko, A.V. Kopeva, O.G. Ivanova // *Sovremennye problemi nauki i obrazovaniya*. — 2015. — № 5. — Mode of assec: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22537>. — Date of access: 24.02.2020.
2. Landscaping with native plants in the UAE: A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture* / A. Hasnain [et al.]. — 2017. — Vol. 29, № 10. — P. 729–741.
3. Azaryan, K.G. Rost i razvitie nekotorykh bobovykh kultur pri obrabotke bakterialnim melanim. *Biologicheskii jurnal Armenii* / K.G. Azaryan, A.S. Ovsepyan, D.A. Zaproshyan. — 2008. — Vol. 60, № 3. — P. 12–18.
4. Nikolarva, M.G. Spravochnik po proraschivaniyu pokoyaschikhsya semian / M.G. Nikolarva, M.V. Razumova, V.N. Gladkova. — L: Science, 1985. — 348 p.

**ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ  
МЕЛАНИНОГЕННОГО ШТАММА BACILLUS THURINGIENSIS  
НА ВСХОЖЕСТЬ И МОРФОЛОГИЮ VERBASCUM THAPSUS L.,  
VERBASCUM NIGRUM L., CENTAUREA SCABIOSA L.,  
BINONICA VALCARGIS BERNH**

---

*Башилов А.В.<sup>1</sup>, Шутава А.Г.<sup>1</sup>, Овсеян А.С.<sup>2</sup>, Аветисян С.В.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Государственное научное учреждение  
«Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»,  
г. Минск, Республика Беларусь;*

*<sup>2</sup>Национальная академия наук Республики Армения,  
г. Ереван, Республика Армения*

***Резюме.** Оценены всхожесть, длина проростков и корней при прорастании семян *Verbascum thapsus* L., *Verbascum nigrum* L., *Centaurea scabiosa* L., *Betonica officinalis* L., *Viscaria vulgaris* Bernh., обработанных различными концентрациями стимулятора. Воздействие бактериального препарата меланина на морфологические показатели растений носило видо- и дозаспецифический характер. К оптимальным для применения на изученных растениях следует отнести концентрации до 0,025 %.*

## CHANGES IN SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD UNDER DIFFUSE DISEASE OF THE LIVER

*Shanshool Estabraq Tareq Shanshool*

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

**Summary.** The aim of the work was to study the activity of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), bilirubin levels and total cholesterol in people with diffuse liver changes. It was found that in 65 % of patients with diffuse changes in the liver and increased body mass index (BMI), cholesterol metabolism was impaired. The increase in waist size with the slight increase in subcutaneous abdominal fat (less than 3 centimeters) suggests an increase in visceral abdominal fat.

**Introduction.** Normally fat is stored in subcutaneous fat in a healthy person. Nevertheless, disorders such as type 2 diabetes mellitus and obesity contribute to fatty liver degeneration as a layer of fat is developed in its cells. The fat content in hepatocytes is usually no more than 5 %, but with fat degeneration this value reaches 60 % [1, 2].

Fatty liver disease is often detected accidentally during a biochemical blood test or ultrasound of the liver [3].

In developed countries, the incidence of morbid obesity has increased today, and according to some reports, the combination of obesity and fatty hepatitis reaches 95 %.

Fatty liver disease has a secret path and, along with biochemical and ultrasound approaches, the diagnosis of obesity is one of the disease's most important symptoms. Hence, an inexpensive non-invasive study that allows the presence of obesity to be determined more accurately than conventional weighing is relevant [3–5].

The aim of the work is to study some biochemical parameters in people with diffuse disease of the liver.

**Material and method of research.** Patients with diffuse changes in the liver participated in studies on a voluntary basis. In addition to ultrasound examination of the liver, all patients underwent measurements of subcutaneous fat 2 cm above the navel to determine the dependence of the degree of obesity and the thickness of the adipose tissue of the anterior abdominal wall (abdominal subcutaneous fat).

From biochemical studies, AST and ALT, bilirubin, and total cholesterol were determined.

**Research results and discussion.** The patients were examined and their anthropometric data (height, weight, waist and hips perimeters) were measured. Patient data are presented in the table 1.

**Table 1 — Composition of patients**

№	Indicators	Control, healthy people	EXPERIENCE 1 diffuse disease of the liver and enlarged liver	EXPERIENCE 2 diffuse disease in the liver
1.	Age, years	45.41 ± 6.16	56.00 ± 2.65	51.40 ± 4.93
2.	Height, cm	167.17 ± 5.71	163.33 ± 31.15	164.60 ± 6.77
3.	Weight, kg	67.27 ± 12.73	97.33 ± 3.06	75.00 ± 12.21

№	Indicators	Control, healthy people	EXPERIENCE 1 diffuse disease of the liver and enlarged liver	EXPERIENCE 2 diffuse disease in the liver
4.	Body mass index	24.08 ± 4.46	36.47 ± 1.60	27.66 ± 4.09
5.	Concomitant diseases (cardiac ischemia, diabetes, hypertension)	healthy	sick	sick
6.	AST, ED/L	18.40 ± 4.18	40.33 ± 43.89	24.60 ± 5.50
7.	ALT, ED/L	20.30 ± 5.30	31.33 ± 31.82	33.40 ± 7.54
8.	Bilirubin, μmol / L	10.45 ± 1.98	13.96 ± 2,14	12.62 ± 2.42
9.	Total cholesterol, mmol / l	3.89 ± 0.54	6.23 ± 0.93	5.20 ± 1.00
10.	Liver ultrasound protocol	liver without pathologies	diffuse disease of the liver and enlarged liver	diffuse disease in the liver

Twenty-five older age group patients have a higher total indicator of cholesterol (including 20 women and 5 men). Diffuse liver damage is determined in all men of this category examined. Diffuse hepatic damage and 1 hemangioma were reported in 22 older age group patients. Diffuse improvement in one patient was associated with an increase in hepatic capacity.

Among the 24 working-age citizens (6 men and 18 women), only five women had elevated cholesterol levels.

In only one person (a man older than 61 years) bilirubin was above the average.

There was an excess of body mass index — BMI in 40 patients of the examined ones, which is 59 percent in comparison to all the examined subjects, the waist circumference exceeded the average value of 96 cm in 35 (52 %) patients, diffuse changes in their liver were not only observed in 4 (6 %) patients. Comparing the BMI and cholesterol, it turned out that cholesterol exceeded the normal values in 26 (65 %) men.

The liver plays the role of a neutralizer of toxic compounds and bile production, and is involved in different metabolism forms. The greatest number of metabolic processes occur in hepatic cells, and one of the markers of liver activity is the enzyme aspartate aminotransferase (AST), which is involved in amino acid synthesis. AST is an intracellular enzyme, and so an increase in blood levels suggests death of cells. Increases in AST values are measured earlier than the actual liver disease symptoms.

Alanine aminotransferase (ALT) is an enzyme responsible for moving the amino acid alanine, its highest level is observed in the liver, so it can be diagnosed with damage to this organ.

Because both enzymes are not strictly unique, the Ritis coefficient is of utmost importance, which in case of altered enzyme parameters must be measured. No health issues the factor is 0.91–1.75. Exceeding this threshold implies heart muscle damage, and if the coefficient is smaller than the specified values, then we should think about hepatic damage. An indication of concomitant coronary heart disease is required.

Cholesterol is an essential substance for the body, since it is the cell membrane's main component, forms the shells of nerve cells, is necessary for the normal functioning of the immune system, hormone synthesis, etc. The majority of this is produced in the liver and used by the liver for bile synthesis. Another explanation for rising blood cholesterol is overweight, fatty hepatosis, as fat-filled hepatocytes may become inflamed, contributing to the production of fatty hepatitis, while liver cells die and are replaced by connective tissue, leading to liver cirrhosis. Cholesterol distribution depends on the liver state, that is why cholesterol levels were measured, the degree of obesity was determined, and the liver state was examined by ultrasound.

The method of transmitting fatty alcohol in the body classifies cholesterol. The low density lipoproteins transport cholesterol from the liver to the tissues. Low density lipoproteins bring the material in the opposite direction and thereby clear the pores of the blood. 80–85 % of cholesterol is synthesized in the liver and, with liver damage, the production of cholesterol is impaired and there is a disparity between high and low density lipoproteins. Such modifications eventually contribute to cardiovascular pathology. The table lists concomitant cardiovascular pathology. The synthesis and removal of bile is impaired with liver pathology, which contributes to an increase in blood cholesterol.

**Conclusion.** Based on biochemical analysis, ultrasound of the liver, the following patterns were identified:

1. In 65 % of the patients with diffuse changes in the liver and elevated BMI, cholesterol metabolism was impaired.

2. An increase in the size of the waist with a slight increase in subcutaneous abdominal fat (less than 3 cm) suggests an increase in visceral abdominal fat.

### References

1. Ford, E.S. Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence / E.S Ford, C. Li, N. Sattar // J. Diabetes Care. — 2008. — Vol. 9. — P. 1898–1904.

2. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis / N.C. Henderson [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — Vol. 103, № 13ю — P. 5060–5065.

3. Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease / A.E. Joseph [et al.] // J. Clin. Radiol. — 1991. — Vol. 43. — P. 26–31.

4. Clinical and histological spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values / P. Mofrad [et al.] // J. Hepatology. — 2003. — Vol. 37. — P. 1286–1292.

5. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidity obese patients / C.C. Mottin [et al.] // Obes Surg. — 2004. — Vol. 14. — P. 635–637.

## ИЗМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПРИ ДИФФУЗНОМ ИЗМЕНЕНИИ ПЕЧЕНИ

---

*Шаниул Эстабрак Тарек Шаниул*

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

**Резюме.** Цель работы — изучить активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), уровень билирубина и общего холестерина у людей с диффузными изменениями печени. Установлено, что у 65 % пациентов с диффузным изменением печени и повышенным индексом массы тела (ИМТ) отмечается нарушение метаболизма холестерина. Увеличение размеров талии при небольшом увеличении подкожного абдоминального жира (менее 3 см) позволяет сделать предположение об увеличении висцерального абдоминального жира.

## STUDY OF THE LEVELS OF SOME SEXUAL HORMONES IN BLOOD SERUM OF MEN WITH TYPE 2 DIABETES

*Shanshool Mustafa Tareq Shanshool*

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

**Summary.** It was shown that there was a significant reduction in serum total testosterone levels in type 2 diabetes mellitus patients. Testosterone is considered a major fighter for diabetes in men by directly controlling the disease, through its level in the body. Lack of testosterone in the body does not depend only on obesity or age, it may be due to factors of lifestyle.

**Introduction.** The formation of sexual substance 2 and through studies and evidence which have shown that the main component of the content in the sexual glands of men is characterized by its simple complications when compared to women, where the stimulating organs are produced in the name of androgens, which are located in the outer part of the gland and excreted in large quantities in males. Works on the secretion of a minimal amount of androgen hormone before puberty in both males and females, which in turn contributes to the development of the male reproductive system and the formation of sperm, and also through the pituitary glands, and the development of LH of the pituitary organ by sperm tubes contributes to the improvement of endocrine tissue in the testes consisting of cell clusters [1, 2].

Affected by luteinizing hormone, interstitial tissue secretes testosterone, the most significant androgenic vertebrate [3].

The level of the metabolite in the metabolic pathway of the hormone mixture is the starting point for different forms of abnormal sex in individuals; for example, testicles that discharge a lot of hormone rather than androgens, contributing to the creation of a bizarre female and male behaviour. Despite the way that the adrenal hormone may emit testosterone, the release scale is not justified now and again, despite any potential benefits that are routinely present [5–7].

The aim of the study was to clarify the role of hormonal imbalance in the development of diabetes in the male population [8].

**Material and method of research.** In the study on a voluntary basis, the necessary analyzes were performed for 60 people and the effect of sexual hormones on type 2 diabetes was measured. The levels of SHBG, cholesterol, and testosterone were measured with different ages represented by large and small generations using the VIDAS device and found that hormones had an adverse effect on type 2 diabetes (figure 1).



**Figure 1 — Technique using a fully automated VIDAS analyzer**

**Research results and discussion.** The results of the analysis for these patients are given in the Table 1.

**Table 1 — The effect of sexual hormones on type 2 diabetes**

age	Glu Mg/dl	total testosterone	free	SHBG Ng/dl	E2 Level Pg/mL
35	280	161	5.8	268.19	34
35	281	159	5.7	265.04	35
36	283	158	5.5	264.11	37
37	285	157	5.2	263.00	39
38	286	156	5.00	259.89	40
39	289	154	4.7	255.01	40
40	291	152	4.7	254.93	40.5
40	292	151	4.6	252.00	40.9
41	295	149	4.5	249.99	41
42	297	148	4.3	247.01	41.08

Low levels of testosterone in men are associated with insulin resistance, or decreased sensitivity to insulin. At first the link may not seem clear, but sometimes low testosterone and diabetes go hand in hand. People with type 2 diabetes are reported to have twice lower testosterone than people who have no diabetes. The body produces insulin when one has insulin resistance, but does not use it properly. As a result, glucose builds up in the blood rather than making cells consume it. Resistance to insulin can lead to type 2 diabetes and can increase the risk of a variety of health problems, including heart disease. The relation between these two conditions does not, however, mean that low testosterone does actually cause diabetes. Many of the lifestyle factors that increase the risk of diabetes can also increase the risk of low testosterone. Low free testosterone level has also been associated significantly with increased risk of T2DM in men. Sensitivity analysis also showed that high levels of testosterone were significantly associated with lower risk of T2DM among males. The above results indicate that testosterone has a major protective impact against T2DM among males, and males with higher levels of testosterone have a decreased risk of T2DM compared to men with lower levels of testosterone. Sex hormone-binding globulin (SHBG) emerges as one of the many genetic and environmental factors that could potentially contribute to Type 2 diabetes pathophysiology. Besides epidemiological studies showing a clear association between decreased serum SHBG rates and T2DM event, recent genetic studies also reveal that transmission of different polymorphisms in the SHBG gene influences the risk of T2DM. At the molecular level, elucidation of various interactions between SHBG and its receptors in different target tissues indicates physiological functions for SHBG that are more complex than merely bringing sex hormones into serum. Taken together, these data support the expanded role of SHBG in insulin resistance pathophysiology and T2DM. The increase in glucose levels accompanied by a simple increase in E2 levels, means that the relationship between the disease and E2 levels is weak. This is because the amount of E2 in males does not act as a circulating hormone; rather, it is essentially produced at extra gonadal sites and acts as an intracranial and paracrine factor.

At the age of 55, men will have 50 % less testosterone than they did when they were young. Hormone is at the height of its giving at mid-twentieth, and at the beginning of the thirties, young men may suffer weakness. Obesity, stress and insufficient sleep may cause low testosterone levels, which can affect sexual ability.

**Conclusion.** Testosterone is considered a major fighter for diabetes in men by directly controlling the disease, through its level in the body. Lack of testosterone in the body does not depend only on obesity or age, it may be due to factors of lifestyle or the method that a person uses to nourish, mood, or problems a person is exposed to.

## References

1. Nathan, D.M. Long-term complications of diabetes mellitus / D.M. Nathan // New England Journal of Medicine. — 1993. — P. 1676–1685.
2. Gasser, E. FGF1 — a new weapon to control type 2 diabetes mellitus / E. Gasser // Nature Reviews Endocrinology. — 2017. — P. 599–609.
3. Ding, E.L. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis / E.L. Ding // JAMA. — 2006. — P. 1288–1299.
4. Oh, J.Y. Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women: the Rancho Bernardo study / J.Y. Oh // J. Diabetes Care. — 2002. — P. 55–60.
5. Rohwer, R.D. Interrelationship between alcohol intake and endogenous sex-steroid hormones on diabetes risk in postmenopausal women / R.D. Rohwer // J. American College of Nutrition. — 2015. — P. 273–280.
6. Elabbady, A. Studying the effect of type 2 diabetes mellitus on prostate-related parameters: a prospective single institutional study / A. Elabbady // J. Prostate International. — 2016. — P. 156–159.
7. Higgins, J.P. Measuring inconsistency in meta-analyses / J.P. Higgins // BMJ. — 2003. — P. 557–560.
8. Cochran, W.G. The combination of estimates from different experiments. Biometrics 1954. 10 101–129. (10.2307/3001666). DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. Controlled Clinical Trials. — 1986. — P. 177–188.

## **ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МУЖЧИН С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА**

---

*Шаниул Мустафа Тарек Шаниул*

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

**Резюме.** Показано, что у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа значительно снижается общий уровень тестостерона в сыворотке крови. Тестостерон препятствует развитию диабета у мужчин путем контроля его уровня в организме. Низкий уровень тестостерона в организме может зависеть не только от таких факторов, как ожирение или возраст, но и от других факторов образа жизни.

## MELITTIS MELISSOPHYLLUM — THERAPEUTIC POTENTIALITIES

---

*Tomulewicz M., Kuzniatsou A., Zakrzewska A., Kitlas P.*

*University of Medical Sciences in Białystok,  
Białystok, Poland;  
Yanka Kupala State University of Grodno,  
Grodno, Republic of Belarus*

**Summary.** *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae) is a perennial herb growing in forest regions of Europe. It is currently used only in traditional medicine. *Melittis melissophyllum* has antiseptic and anti-inflammatory effects, the ability to stimulate regeneration of cells and tissues. The study developed a new drug for the treatment and healing of wounds and found that it had therapeutic activity at each stage of wound healing.

**Introduction.** *Melittis melissophyllum* (*M. melissophyllum*) is a perennial herb growing in forest regions of Europe. The eastern edge of the habitat extends into the western regions of the East European Plain. It can be found in the undergrowths of oak, broad-leaved-spruce, oak-pine and birch forests, on highlands, but rarely above 1400 meters above the sea level [6]. In Poland, *Melittis melissophyllum* is a rare species, found mainly in the lowlands (with the exception of Western Pomerania and Greater Poland Voivodeship). The plant is demanding on growing conditions. Artificially grown in gardens and in household plots as an ornamental plant, it is valued for its pleasant honey-lemon smell. In many European countries, the plant is a rare and endangered species and is listed in the Red Book. In Poland, the plant is under partial protection [3].

For centuries, *M. melissophyllum* has been used as a medicinal plant. Its therapeutic properties were described in 1542 by Leonard Fuchs, which allowed the plant to be included in the French Pharmacopoeia as a pharmaceutical raw material [1, 8].

Chemical composition of *M. melissophyllum*: mono- and polyterpene compounds (cytronellal, citral); carotene; mucous ingredients; rosemin, ursol, coffee, oleic, lilac, ascorbic, chlorogenic acids; flavonoids; essential oils; tannins and bitter substances; fatty oils; vitamins B1, B2, C; a number of basic macro- and microelements, etc. [7, 13]. Among the water-soluble polysaccharides from the herb *M. melissophyllum*, the dominant structures detected were type II arabinogalactans with a (1- > 3) — galactose base and arabinose-galactose side chains [2, 5, 9].

The paper of Skrzypczak-Pietraszek et al 2012 describes a study of *M. melissophyllum*. In all collected plants, more than 10 compounds were identified. Free and bound phenolic acids were represented by: p-hydroxybenzoic acid (30.21–54.16 mg/100 g dry weight and 37.04–56.75 mg/100 g, free and bound, respectively) and p-coumaric acid (40.48–80.55 mg/100 g and 28.09–40.85 mg/100 g, free and bound, respectively) [10, 11].

Recent studies indicate limited shelf life of plant materials [Pereira. Food Res Int., 2018]. To extend the shelf life of *Melittis melissophyllum*, gamma radiation at a dose of 10 kGy was used. After 12 months of storage, changes in quality indicators occurred. However, exposure to gamma radiation affects the level of oleic acid retention and inhibits  $\beta$ -carotene bleaching.

Currently, *M. melissophyllum* is used only in traditional medicine (Italy, Serbia): tea, additives in kvass, compote, sauce, for poultry and fish, for flavoring dough and alcohol. In Poland, the plant is used for flavoring alcohols and tobacco products.

*M. melissophyllum* has antiseptic and anti-inflammatory effects, the ability to stimulate the regeneration of cells and tissues. The study of extracts of *M. melissophyllum* showed a protective effect. In experiments *in vitro*, all extracts (except for n-BuOH extract) proved to be potential scavengers of free radicals (DPPH, NO, and OH radicals) and liposomal peroxidation inhibitors (LPx) [4].

Thus, analyzing the literature on the study of this plant, it should be noted that not all possible therapeutic and prophylactic effects have been studied and described. In this regard, the urgent task is to search for new approaches to the development of methods for reliable identification of plant materials.

**Objective:** to evaluate the composition of the plant extract of *M. melissophyllum* and to study therapeutic potentialities in the treatment of conditions associated with disturbances in the anatomical integrity of the outer cover and/or deep tissues, which would accelerate healing, including inflammatory complications after surgery.

**Material and method of research.** For the testing of *M. melissophyllum*, liquid alcoholic extracts were prepared (10% — 96 %), n = 50. The extract color: green-yellow; the smell of smell — specific («honey» aroma); without opalescence, without a sediment. The standardization of the composition is «pure» *M. melissophyllum*: 96 % ethanol, without dilution.

A therapeutic drug for wound healing: 40 % by weight of *M. melissophyllum* from the whole plant, 20 % by weight — 96 % ethyl alcohol, 40 % by weight — vaselinum album (hydrocarbon base, used in lipophilic ointments).

The healing dynamics (days after the injury) of skin wounds were studied in white rats (Wistar) treated with the developed tool. The technology of modeling the local inflammatory process: on the depilated skin of the femur-gluteal region of the rat, a wound contour was applied: a circle with a diameter of 2.5 cm. The skin was treated with an antiseptic. Local anesthesia was performed with 0.5 % novocaine solution (3.0 ml). After 7–10 minutes, the skin and subcutaneous tissue were excised with a scalpel to the surface. The edges of the wound were infected with a 24-hour suspension of world organisms (2.0 ml) containing  $10^9$  microbial cells in 1 ml. A plastic ring (1.0 × 2.5 cm with a lid) was hemmed to the edges of the wound. Rats were in individual cages. Access to food and water was free. The material was taken on the 3rd, 7th, 10th, 14th, 21st days from the beginning of the experiment. The dynamic photography was conducted.

All animals are divided into groups depending on the method of treatment used (in each group, 20 rats):

- I-group — the drug (even antiseptic) was not applied to the wound — control;
- II group — an antiseptic in the form of chlorhexidine was used (according to the standard protocol for the treatment of infected wounds, chlorhexidine is used in the clinic for the treatment of wounds);
- III group — a preparation with extract of *Melittis melissophyllum*.

Research Methods:

- chromatographic: gas chromatography with mass spectrometric detection (Agilent 5977e gas chromatography mass spectrometer, MS-GC). Component identification: commercial (NIST11, Wiley 14) and its own custom mass spectra library;
- immunological: the phagocytic activity of neutrophilic leukocytes was evaluated using the phagocytic index (PI) and the phagocytic number (PN);

– histological (morphological assessment).

All work with rats was carried out in accordance with the «Regulation on the procedure for the use of experimental animals in scientific research» [Directive 2010/63 / EU «On the protection of animals used for scientific purposes». Directive 86/609 / EEC «On the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes»].

Statistical analysis was carried out using the statistical software package Statistics.

**Research results and discussion.** The composition of the extract was standardized on a «pure» *M. melissophyllum* extract prepared from 96 % ethanol without dilution: the amount of substances detected by mass chromatography was 92. The average number of detected biologically active substances was  $52.73 \pm 21.48$ . The number of analyzed biologically active substances and their derivatives in the samples ranged from 6 to 92 (the average amount was  $33.00 \pm 16.14$ ). The difference in the detected and analyzed substances was  $19.73 \pm 8.34$  ( $p = 0.01$ ).

For actual concentrations of substances whose activity can be described, the concentrations of detected biologically active ingredients and their derivatives with a detection level of 20.0 % and / or more were taken. Since it is practically impossible to exclude the effect of a substance in a lower percentage ratio, in the process of analyzing the composition of the prepared extracts and choosing their most significant concentrations, additional components with determined concentrations of active substances up to 20.0 % were also included in the analysis.

The proportion of identified (confirmed) biologically active substances in the extract of *M. melissophyllum* was ranged from 29.0 % to 100.0 %. A detailed analysis of the obtained extract compositions taking into account the standard approach (probability of detecting a substance > 20.0 %) showed that not all developed and tested extracts had a similar composition and often significantly differed from each other (from 7.7 % to 65.4 %,  $p = 0.03$ ).

The main extract substances with an active effect contained components with a detection probability of 95 % and identification sensitivity > 50.0 % (Table 1).

**Table 1 — Extracts of substances with a detection probability of 95 % and identification sensitivity > 50.0%**

Biological substance, derivative	Proportion of substance, %
Acetamide, TMS derivative	81.3
Formamide, N,N-diethyl-	97.4
Ethanimidic acid, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	70.1
N-Methylpropionamide, trimethylsilyl derivative	90.6
Ethanamine, 2TMS derivative	72.2
Triisopropylsilane	91.8
Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Ethanimidic acid)	95.7
Acetamide, N,N-diethyl-	95.0
Tris(trimethylsilyl)carbamate	80.8
Methyltris(trimethylsiloxy)silane	69.6
N,N-Diethyl(trimethylsilyl)carbamate	58.6
Trisiloxane, octamethyl-	82.1
Hydracrylic acid, 2TMS derivative	64.8
Acetic acid, bis[(trimethylsilyl)oxyl]-, trimethylsilyl ester	54.1
Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	58.8
Tris(trimethylsilyl)carbamate	65.6
Urea, 2TMS derivative	90.1
Glycerol, 3TMS derivative	80.4
L-Proline, 2TMS derivative	87.9

Biological substance, derivative	Proportion of substance, %
Butanedioic acid, 2TMS derivative	79.3
Coumarin	62.7
Malic acid, 3TMS derivative	88.2
Tyrosol, 2TMS derivative	72.5
Erythronic acid	79.3
2-Hydroxyphenylpropionic acid, bis(trimethylsilyl) deriv	94.3
o-Coumaric acid, 2TMS derivative	95.0
Palmitic Acid, TMS derivative	95.6
Phytol, TMS derivative	85.7
Linoleic acid, TMS	75.6
$\alpha$ -Linolenic acid, TMS derivative	82.2
Stearic acid, TMS derivative	89.7
Dehydroabiatic acid, TMS derivative	75.6
Arachidic acid, TMS derivative	65.3
Triphenylphosphine oxide	59.5
Behenic acid, TMS derivative	49.6
(Z)-Docos-13-enamide, N-TMS	54.7

Based on the data obtained, the extract with an active effect was taken into account when developing a therapeutic drug for treating wounds. The activity of ingredients with a probability of determination below 50.0 % could not be considered inactive. Depending on the method of the use of the extract, the effect of these substances may be significant.

According to the proposed formulation the developed and studied preparation for wound healing (ointment — a vaseline base in the amount of 40–70 wt. %) providing regeneration of wound healing, contained as an active ingredient an alcoholic plant extract emulsified or suspended in an organic medium: *M. melissophyllum* extract in 10–40 wt. % (active substances were flavonoids, polyphenols, tannins, amine compounds and mineral salts), ethyl alcohol in a volume of 10–20 wt. %.

Animal studies showed that the tannins in the plant extract had astringent properties and the ability to form, mainly with collagen, irreversible insoluble compounds. In addition, they had an astringent effect on the mucous membranes, inhibited their permeability, prevented micro-bleeding from capillary blood vessels, inactivated bacteria and toxins produced by them, and had anti-inflammatory properties. The flavonoids contained in the extract, as sealants for the walls of small blood vessels, were used as hemostatic agents. Their action was associated with the inhibition of enzymes in the walls of blood vessels — hyaluronidase, which is responsible for increasing the permeability of intercellular spaces. The flavonoids also have an antiaggregatory effect on platelets.

The results of the effect of *M. melissophyllum* extract on epithelization (epidermis) and wound healing in rats are shown in Table 2.

**Table 2 — Test results of *M. melissophyllum* extract for epithelization**

Healing process	Group		
	I Group	II Group	III Group
Beginning of epithelization, day	5.0 ± 0.4	3.9 ± 0.4	3.5 ± 0.2
Beginning of the exclusion of the scab, day	9.0 ± 0.5	7.6 ± 0.5	6.5 ± 0.4
Complete exclusion of a scab, day	11.5 ± 0.3	10.5 ± 0.3	7.8 ± 0.5
Complete wound healing, day	13.00 ± 0.91	11.25 ± 0.19	9.3 ± 0.7

The developed wound healing preparation showed normal epithelial growth, accelerated granulation, maintained moisture in the wound surface and accelerated its healing.

The results of studies of the phagocytic activity of leukocytes during wound healing are presented in Table 3.

**Table 3 — Level of leukocyte phagocytic activity during wound healing using *M. melissophyllum* extract**

Group	Time after injury					
	3 day		5 day		7 day	
	PI, %	PN	PI, %	PN	PI, %	PN
I Group	54.60 ± 1.12	7.0 ± 1.2	82.00 ± 2.28	11.0 ± 2.5	66.20 ± 4.16	12.5 ± 3.0
II Group	61.60 ± 9.49	10.0 ± 2.5	59.01 ± 4.58	14.0 ± 3.0	48.20 ± 5.51	11.0 ± 3.0
III Group	82.40 ± 1.40	16.0 ± 3.5	89.00 ± 0.45	22.0 ± 2.8	41.20 ± 3.50 <sup>a</sup>	9.0 ± 1.5

Phagocytic index — PI, percentage of phagocytes containing *Staphylococcus*;  
Phagocytic number — PN, the average number of *Staphylococcus* in 1 phagocyte.

It was found that in comparison with the control group, the extract of *M. melissophyllum* accelerated the time of wound healing in experimental animals. The first scab rejection in group III began on the 6–7th day, in the control groups (saline, chlorhexidine) — on the 9th and 7–8th days, respectively ( $p = 0.04$ ). The final scab rejection in group III rats occurred on days 7–8. In animals using *M. melissophyllum* extract, complete epithelization of the wound surface was achieved on day 9, while in the control group, complete epithelization of the wound surface was observed on days 12–13 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** Thus, for the first time, a complete analysis of the composition of the plant extract of *Melittis melissophyllum* based on gas chromatography (mass spectrometric detection) was performed.

According to the results of studies of the ethanol-based extract of *Melittis melissophyllum*, the rationale for the composition and level of biologically active substances (ordered by quality) were found: 96 % ethanol (13.04 % of the substance); 77.4 % ethanol (8.33 % of the substance); 35.4 % ethanol (12.12 % of the substance).

A new drug containing *Melittis melissophyllum* extract has been designed (the dosage form was ointment) for the treatment and healing of wounds [12].

It has been established that the developed agent had high therapeutic activity at each stage of wound healing, accelerated the wound healing processes, intensified the cell proliferation processes and, thus, provided early complete healing.

The mechanisms of action of the extract of *M. melissophyllum* on the healing process are probably due to the vasodilatation and normalization of microcirculation disorders in tissues, the improvement of tissue metabolism, the enhancement of the function of neutrophilic phagocytosis and the activation of macrophages that directly or indirectly affect the proliferation and angiogenesis of fibroblasts.

## References

1. Reassessment of *Melittis Melissophyllum* L. Subsp. *Melissophyllum Iridoidic Fraction* / A. Venditti [et al.] // *J. Nat. Prod. Res.* — 2016. — Vol. 30, № 2. — P. 218–222.
2. HPLC Quantification of Coumarin in Bastard Balm (*Melittis Melissophyllum* L., Lamiaceae) / F. Maggi [at al.] // *J. Fitoterapia.* — 2005. — Vol. 82, № 8. — P. 1215–1221.
3. Guarrera, P.M. Traditional Phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium) / P.M. Guarrera // *J. Fitoterapia.* — 2005. — Vol. 76, № 1. — P. 1–25.
4. Kaurinovic, B. Antioxidant Activities of *Melittis Melissophyllum* L. (Lamiaceae) / B. Kaurinovic [et al.] // *J. Molecules.* — 2011. — Vol. 16, № 4. — P. 3152–3167.

5. Chemical Differences in Volatiles Between *Melittis Melissophyllum* L. Subsp. *Melissophyllum* and Subsp. *Albida* (Guss) P.W. Ball (Lamiaceae) Determined by Solid-Phase Microextraction (SPME) Coupled With GC/FID and GC/MS / M. Filippo [et al.] // *J. Chem. Biodivers.* — 2011. — Vol. 8, № 2. — P. 325–343.
6. Volatile Components of Whole and Different Plant Parts of Bastard Balm (*Melittis Melissophyllum* L., Lamiaceae). Collected in Central Italy and Slovakia / M. Filippo [et al.] // *J. Chem. Biodivers.* — 2011. — Vol. 8, № 11. — P. 2057–2079.
7. Evaluation of Gamma-Irradiated Aromatic Herbs: Chemometric Study of Samples Submitted to Extended Storage Periods / E. Pereira [et al.] // *J. Food Res. Int.* — 2018. — Vol. 111. — P. 272–280.
8. Skrzypczak-Pietraszek, E. Polysaccharides From *Melittis Melissophyllum* L. / E. Skrzypczak-Pietraszek, A. Hensel // *Herb and Callus. Pharmazie.* — 2000. — Vol. 55, № 10. — P. 768–771.
9. Skrzypczak-Pietraszek, E. Chemical Profile and Seasonal Variation of Phenolic Acid Content in Bastard Balm (*Melittis Melissophyllum* L., Lamiaceae) / E. Skrzypczak-Pietraszek, J. Pietraszek // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2012. — Vol. 66. — P. 154–161.
10. Skrzypczak-Pietraszek, E. Seasonal Changes of Flavonoid Content in *Melittis Melissophyllum* L. (Lamiaceae) / E. Skrzypczak-Pietraszek, J. Pietraszek // *J. Chem. Biodivers.* — 2014. — Vol. 11, № 4. — P. 562–70.
11. Enhanced Accumulation of Harpagide and 8-O-acetyl-harpagide in *Melittis Melissophyllum* L. / E. Skrzypczak-Pietraszek [et al.] // *Agitated Shoot Cultures Analyzed by UPLC-MS/MS.* — *PLoS One.* — 2018. — Vol. 13, № 8. — Collection 2018.
12. Tomulewicz, M. Herbal preparation for accelerating wounds and skin inflammations healing and its application / M. Tomulewicz // University of medical science in Belostok, Poland. — Patent No.: US010213469b2. — Date of Patent: Feb. 26, 2019.
13. Venditti A. Constituents of *Melittis Melissophyllum* Subsp. *Albida* / A. Venditti // *Nat Prod Commun.* — 2016. — Vol. 11, № 11. — P. 1631–1634.

## **MELITTIS MELISSOPHYLLUM — ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ**

---

***Томулевич М., Кузнецов О., Закжеска А., Китлас П.***

*Университет медицинских наук в Белостоке,  
г. Белосток, Республика Польша;*

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

***Резюме.*** *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae) — многолетнее растение, произрастающее в лесных районах Европы, используется в народной медицине. Данное растение обладает анти-септическим и противовоспалительным действием, описана способность стимулирования регенерации клеток и тканей. В процессе исследования *Melittis melissophyllum* L. установлена его терапевтическая активность на каждой стадии заживления ран и разработан новый препарат для лечения и заживления ран.

Научное издание

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ  
ВЕЩЕСТВА ПРИРОДНОГО  
ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ  
ПРОЦЕССОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

*Сборник статей Международной научно-практической конференции,  
посвященной 50-летию Института биохимии биологически активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси*

5–6 октября 2021 г., г. Гродно, Республика Беларусь

Ответственный за выпуск *И. Н. Семененя*

Компьютерная верстка *Н. П. Засулевич*

Дизайн обложки *Н. П. Засулевич*

Корректоры *О. А. Соусь, В. А. Захарычева*

Подписано в печать 01.10.2021 г. Формат 60×84/8.

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Усл. печ. л. 75,33. Уч.-изд. л. 55,00.

Тираж 30 экз. Заказ. 366.

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.



KAMPILAB



Agilent

Authorized  
Distributor

- ГАЗОВАЯ и ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
- МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ
- УФ-ВИД и ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОМЕТРИЯ
- ЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
- СИСТЕМЫ РАСТВОРИМОСТИ
- КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ



HPLC  
LC/MS  
GC  
GC/MS  
AAS  
UV-VIS  
FTIR  
DISSOLUTION CE



## ОБОРУДОВАНИЕ

для научных исследований

ООО "КАМПИЛАБ"

Авторизованный партнер  
Agilent Technologies в РБ

220018, г. Минск, ул. Приваблия, 2-15Н  
тел./факс: +375 (17) 248-75-77, 248-62-32  
303-66-47, 304-87-03

e-mail: [campilab@campilab.by](mailto:campilab@campilab.by) [www.campilab.by](http://www.campilab.by)