

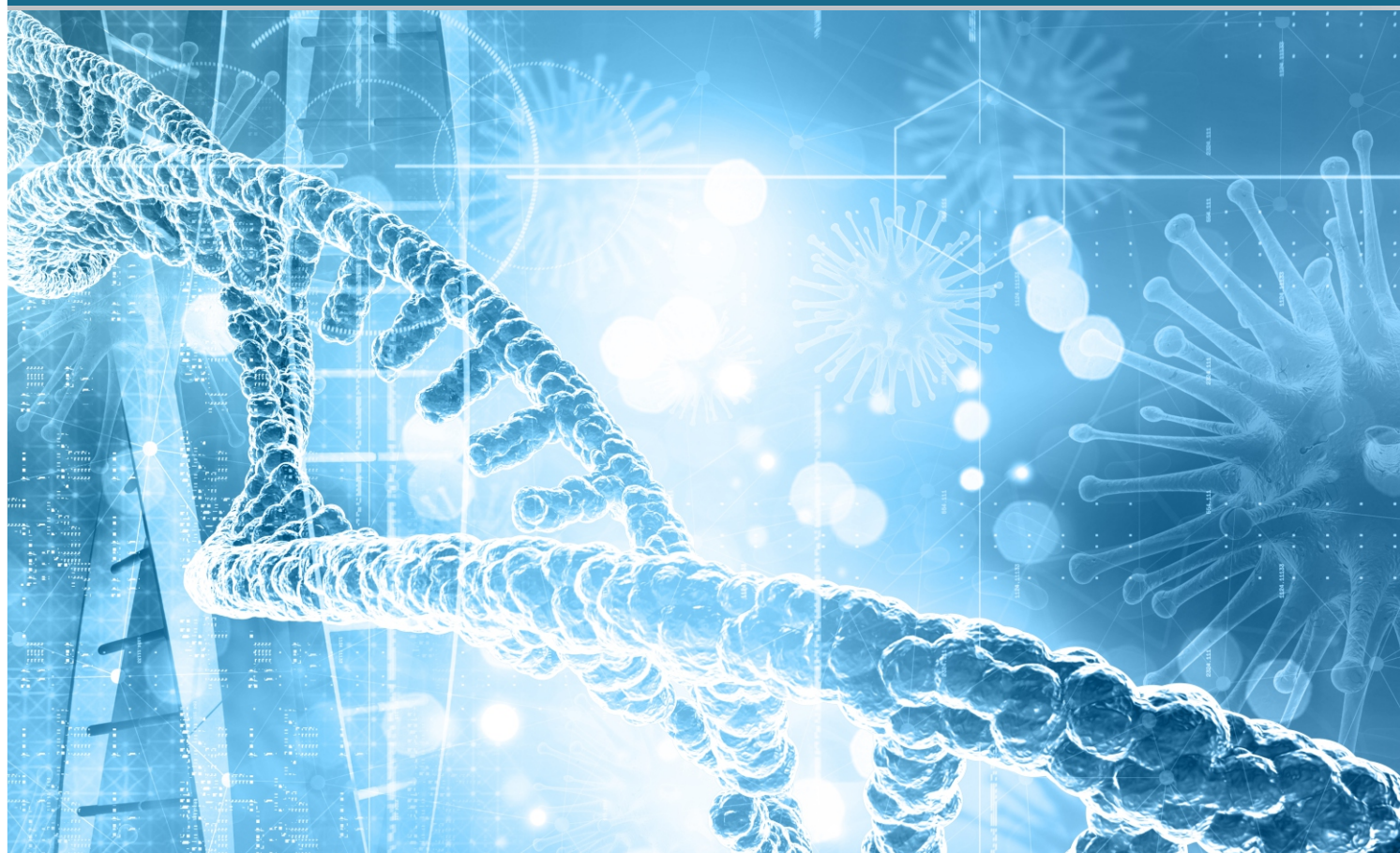


Республиканское научно-исследовательское  
унитарное предприятие  
«Институт биохимии биологически  
активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси»

ISSN 2957-7349

# БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

## BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY



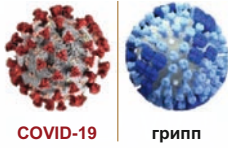
ТОМ / VOL. 2

1(2)2023



Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие  
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

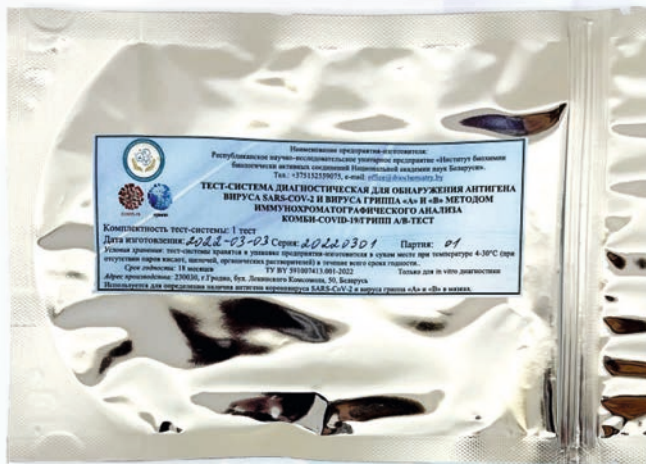
Тел.: +375152559075, e-mail: office@ibiochemistry.by



COVID-19

грипп

## ТЕСТ-СИСТЕМА ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСА SARS-COV-2 И ВИРУСОВ ГРИППА «А» И «В» МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КОМБИ-COVID-19/ГРИПП А/В-ТЕСТ



Комплектность тест-системы: 1 тест

*Условия хранения:* тест-системы хранятся в упаковке предприятия-изготовителя в сухом месте при температуре +4...+30 °С (при отсутствии паров кислот, щелочей, органических растворителей) в течение всего срока годности.

*Срок годности:* 18 месяцев

ТУ BY 591007413.001-2023

Только для *in vitro* диагностики

Используется для определения наличия антигена коронавируса SARS-CoV-2 и вируса гриппа «А» и «В» в мазках



*Адрес производства:*

230030, г. Гродно,  
б-р Ленинского Комсомола, 50,  
Республика Беларусь

# БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

## БІАХІМІЯ І МАЛЕКУЛЯРНАЯ БІЯЛОГІЯ

ISSN 2957-7349



РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ

Основан  
в 2022 году

### Учредитель

Республиканское научно-исследовательское  
унитарное предприятие  
«Институт биохимии биологически  
активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси»

*Издано при финансовой поддержке  
Белорусского республиканского фонда  
фундаментальных исследований*

### Адрес редакции:

пл. Антония Тызенгауза, 7,  
230023, г. Гродно, Республика Беларусь,  
Институт биохимии биологически  
активных соединений НАН Беларуси,  
тел.: +375 152 55-87-78,  
e-mail: journal@ibiochemistry.by

Официальный сайт журнала  
<https://ibiochemistry.by>

### Подписные индексы:

для индивидуальных подписчиков **00990**  
для ведомственный подписчиков **009902**

Отпечатано в типографии  
УП «ИВЦ Минфина»  
Подписано в печать 10.02.2023.  
Формат 60×84/8. Бумага офсетная.  
Гарнитура TimesNewRoman. Печать цифровая.  
Усл. печ. л. 16,51. Уч.-изд. л. 13,90.  
Тираж 100 экз. Заказ 34.  
ЛП № 02330/89 от 3 марта 2014 г.  
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

В номере:

Экспериментальные  
и клинические исследования

Обзоры

Ученые Беларуси

Том 2

1 (2)/2023

# Biochemistry and Molecular Biology

ISSN 2957-7349



PEER-REVIEWED  
SCIENTIFIC AND PRACTICAL  
JOURNAL

*Founded  
in 2022*

## Founder

Republican Scientific Research  
Unitary Enterprise "Institute of Biochemistry  
of Biologically Active Compounds  
of the National Academy  
of Sciences of Belarus"

*Published with the financial support from  
the Belarusian Republican Foundation  
for Fundamental Research*

## Address of the Editorial Office:

230023 Grodno, 7 Antoni Tyzenhauz Square,  
Belarus Institute of Biochemistry  
of Biologically Active Compounds of the National  
Academy of Sciences of Belarus,  
phone: +375 152 55-87-78,  
e-mail: [journal@ibiochemistry.by](mailto:journal@ibiochemistry.by)  
Website – <https://ibiochemistry.by>

## Subscription indexes

For individuals **00990**  
For legal entities **009902**

Printed at UE "IVC Minfina"  
It is sent of the press 10.02.2023  
Format 60x84/8. Offset paper.  
TimesNewRoman. Offset printing.  
Printed pages 16,51.  
Publisher's signatures 13,90.  
Circulation 100 copies. Order 34.  
LP № 02330/89 of 3 March 2014  
17, Kalvaryiskaya str., Minsk 220004

*In this issue:*

---

**Experimental  
and Clinical Research**

---

**Reviews**

---

**Scientists of Belarus**

---

---

**Vol. 2**

---

**1 (2)/2023**

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ / EDITORIAL BOARD

- Кузнецов Олег Евгеньевич** (*главный редактор*) – кандидат биологических наук, доцент, директор Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь
- Мойсеёнок Андрей Георгиевич** (*заместитель главного редактора*) – член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь
- Сутько Ирина Петровна** (*ответственный секретарь*) – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь
- Богдан Василий Генрихович** – доктор медицинских наук, профессор, академик-секретарь Отделения медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
- Гнедько Татьяна Васильевна** – доктор медицинских наук, заместитель академика-секретаря Отделения медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
- Заводник Илья Борисович** – доктор биологических наук, профессор, профессор Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь
- Канунникова Нина Павловна** – доктор биологических наук, профессор, профессор Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь
- Кильчевский Александр Владимирович** – академик Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заместитель Председателя Президиума Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
- Макарчиков Александр Фёдорович** – доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой Гродненского государственного аграрного университета, Гродно, Беларусь
- Надольник Лилия Ивановна** – доктор биологических наук, доцент, заведующий отделом Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь
- Нефёдов Леонид Иванович** – доктор медицинских наук, профессор, профессор Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь
- Островский Александр Александрович** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель группы функциональной морфологии Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь
- Сиваков Александр Павлович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой Белорусской медицинской академии последилового образования, Минск, Беларусь
- Федорцив Ольга Евгеньевна** – доктор медицинских наук, профессор, профессор Тернопольского национального медицинского университета имени И. Я. Горбачевского, Тернополь, Украина
- Хворик Дмитрий Федорович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой Гродненского государственного медицинского университета, Гродно, Беларусь
- Хованская Галина Николаевна** – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной работе Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь
- Хрусталёв Владислав Викторович** – доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь
- Шкуматов Владимир Макарович** – член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией Научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь
- Aleh Y. Kuzniatsou** (*Editor-in-Chief*) – Ph. D. (Biology), Associate Professor, director of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
- Andrey G. Moiseenok** (*Associate Editor-in-Chief*) – Correspondent member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Department of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
- Iryna P. Sutsko** (*Executive Editor*) – Ph. D. (Biology), Senior Researcher of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
- Vasily G. Bogdan** – D. Sc. (Medicine), Professor, Academic Secretary of the Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
- Tatyana V. Gnedko** – D. Sc. (Medicine), Deputy Academic Secretary of the Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
- Ilya B. Zavodnik** – D. Sc. (Biology), Professor, Professor of the Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus
- Nina P. Kanunnikava** – D. Sc. (Biology), Professor, Professor of the Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus
- Alexander V. Kilchevskiy** – Academician of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Biology), Professor, Deputy Chairman of the Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
- Alexander F. Makarchikov** – D. Sc. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of the Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus
- Liliya I. Nadolnik** – D. Sc. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
- Leonid I. Nefedov** – D. Sc. (Medicine), Professor, Professor of the Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus
- Aliaksandr A. Astrowski** – D. Sc. (Medicine), Professor, Head of the Functional Morphology Group of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
- Alexander P. Sivakov** – D. Sc. (Medicine), Professor, Head of the Department of the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus
- Olga E. Fedortsiv** – D. Sc. (Medicine), Professor, Professor of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine
- Dzmitry F. Khvorik** – D. Sc. (Medicine), Professor, Head of the Department of the Grodno State Medical University, Grodno, Belarus
- Halina N. Khovanskaya** – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
- Vladislav V. Khrustalev** – D. Sc. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
- Vladimir V. Shkumatov** – D. Sc. (Biology), Professor, Correspondent member of the National Academy of Sciences of Belarus, The Head of the laboratory of the Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**  
**EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH**

<b>Н.Н. Ковганко, А.Д. Таганович, В.И. Прохорова, Д.И. Мурашко, А.В. Колб, О.В. Готько, Л.А. Державец</b> <b>РЕЦЕПТОРЫ КЛЕТОК КРОВИ И АНТИГЕН CYFRA 21-1 КАК ПРЕДИКТОРЫ БЕЗРЕЦИДИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ ОПУХОЛИ R0</b>	7	<b>N.N. Kauhanka, A.D. Tahanovich, V.I. Prohorova, D.I. Murashko, A.V. Kolb, O.V. Gotko, L.A. Dzerjavets</b> <b>BLOOD CELL RECEPTORS AND CYFRA 21-1 ANTIGEN AS PREDICTORS OF RECURRENCE-FREE SURVIVAL OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER AFTER R0 TUMOR RESECTION</b>
<b>Г.Н. Семенкова, И.Э. Адзерихо, Н.В. Амаэгбери, А.М. Серебро, С. Ф. Моголько, Т.Э. Владимирская, И.А. Новицкий, А. В. Шулганова, Д.В. Тихинская</b> <b>ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПАЦИЕНТОВ С ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ</b>	13	<b>G.N. Semenкова, I.E. Adzerikho, N.V. Amaegberi, A.M. Serebro, S.F. Motolko, T.E. Vladimirskaia, I.A. Novitskiy, A.V. Shulhanova, D.V. Tikhinskaya</b> <b>FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH PULMONARY HYPERTENSION</b>
<b>Т.А. Митюкова, А.А. Басалай, Е.Н. Чудиловская, О.Е. Полулях, Н.С. Костюченко, Ю.А. Рудниченко</b> <b>ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ: СВЯЗЬ С ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТОЙ И МАССОЙ ВИСЦЕРАЛЬНОГО ЖИРА У КРЫС-САМЦОВ ПОРОДЫ ВИСТАР</b>	19	<b>T.A. Mityukova, A.A. Basalai, K.N. Chudilovskaya, O.Y. Poluliakh, M.S. Kastsyuchenka, Yu.A. Rudnichenko</b> <b>PECULIARITIES OF MUSCLE TISSUE METABOLISM: RELATIONSHIP WITH HIGH-CALORIE DIET AND VISCERAL FAT MASS IN MALE WISTAR RATS</b>
<b>А.К. Семенчук, В.В. Лелевич</b> <b>ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПЕРИОДОВ АЛКОГОЛИЗАЦИИ НА ПУЛ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В МИОКАРДЕ КРЫС</b>	26	<b>A.K. Semenchuk, V.V. Lelevich</b> <b>IMPACT OF DIFFERENT PERIODS OF ALCOHOLIZATION ON A POOL OF SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS IN THE MYOCARDIUM OF RATS</b>
<b>Е.И. Лебедева, А.Т. Щастный, А.С. Бабенко</b> <b>ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ NOTCH И TWEAK/FN14 СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ФИБРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ</b>	31	<b>E.I. Lebedeva, A.T. Shchastny, A.S. Babenka</b> <b>INTERACTION OF NOTCH AND TWEAK/FN14 SIGNALING PATHWAYS IN EXPERIMENTAL LIVER FIBROGENESIS</b>
<b>Ю.С. Бакакина, Д.В. Бабарико, А.В. Свирид, Т.В. Шкель, А.М. Тумилович, В.Э. Сяхович</b> <b>БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОЙ СТЕРОИД-11<math>\beta</math>-ГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ</b>	37	<b>Y.S. Bakakina, D.V. Babaryko, A.V. Svirid, T.V. Shkel, A.M. Tumulovich, V.E. Syakhovich</b> <b>BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ANABOLIC STEROID METABOLITES USING HUMAN RECOMBINANT STEROID-11<math>\beta</math>-HYDROXYLASE FOR DOPING CONTROL</b>
<b>И.И. Степура, С.А. Агейко, В.И. Степура, В.Ю. Смирнов, А.В. Янцеvич</b> <b>ОКИСЛЕНИЕ ТИОХРОМА ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТА UVA ДИАПАЗОНА</b>	44	<b>I.I. Stepuro, S.A. Ageiko, V.I. Stsiapura, V. Yu. Smirnov, A.V. Yantsevich</b> <b>THIOCHROME OXIDATION ON EXPOSURE TO ULTRAVIOLET OF UVA RANGE</b>

<p><b>Т.И. Терпинская, Т.Л. Янченко, М.В. Лисовская, Е.Ф. Полукошко, А.Л. Михальчук</b> ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТАНОЛАМИДОВ И ДИЭТАНОЛАМИДОВ ПАЛЬМИТИНОВОЙ И РИЦИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ <i>IN VITRO</i></p>	53	<p><b>T.I. Terpinskaya, T.L. Yanchenko, M.U. Lisouskaya, A.F. Palukoshka, A.L. Mikhal'chuk</b> ANTI-TUMOR ACTIVITY OF ETHANOLAMIDES AND DIETHANOLAMIDES OF PALMITIC AND RICINOLIC ACID <i>IN VITRO</i></p>
<p><b>Н.И. Филина, М.Н. Курбат, Е.М. Дорошенко</b> ТРАНСФОРМАЦИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СПЕКТРА В МОЗЖЕЧКЕ, СТРИАТУМЕ И ГИПОТАЛАМУСЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АНТИРЕТРОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ЗИДОВУДИН</p>	60	<p><b>N.I. Filina, M.N. Kurbat, E.M. Doroshenko</b> TRANSFORMATION OF THE AMINO ACID SPECTRUM IN THE CEREBELLUM, STRIATUM AND HYPOTHALAMUS OF THE RAT BRAIN UNDER ACTION OF THE ANTIRETROVIRAL DRUG ZIDOVUDINE</p>
<p><b>Е.А. Хотько, А.Д. Таганович, Г.В. Шабает, А.Г. Кадушкин</b> ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗАМЕНЫ В СТРУКТУРЕ ГЕНОВ IL6 И TNF<math>\alpha</math> ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ</p>	65	<p><b>E.A. Khotko, A.D. Tahanovich, G.V. Shabaev, A.H. Kadushkin</b> SINGLE NUCLEOTIDE POLIMORPHISMS IN THE STRUCTURE OF IL6 AND TNF<math>\alpha</math> GENES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE</p>
<p><b>И.С. Черней, В.Т. Чешевиц</b> АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНОГО МАСЛА <i>HUMULUS SPP.</i></p>	72	<p><b>I.S. Chernei, V.T. Cheshechiv</b> ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF <i>HUMULUS SPP.</i></p>
<p><b>Н.Н. Веялкина, А.С. Пилотович, О.С. Аксёненко, В.М. Щемелев</b> ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОЙ МОЩНОСТИ</p>	78	<p><b>N.N. Veyalkina, N.S. Pilotovich, V.S. Aksionenka, V.M. Schemelev</b> DYNAMICS OF INDICATORS OF THE LIVER ANTIOXIDANT SYSTEM IN MICE AFTER EXPOSURE TO HIGH POWER X-RAY EXPOSITION</p>
<p><b>Л.В. Батуревич, И.Д. Шилейко, А.О. Коломиец</b> ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ НЕПРЯМОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК (SCD) В ЛАБОРАТОРНОМ СКРИНИНГЕ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ</p>	83	<p><b>L. V. Baturevich, I. D. Shileiko, A. O. Kolomiets</b> DIAGNOSTIC VALUE OF THE INDIRECT METHOD FOR DETERMINING DNA FRAGMENTATION (SCD) IN LABORATORY SCREENING OF MALE INFERTILITY</p>
<p><b>В.А. Переверзев, А.В. Сикорский, А.С. Блажко, А.В. Евсеев, В.А. Правдивцев, М.О. Вэлком, Ю.Е. Разводовский, Д.А. Александров, Е.В. Переверзева</b> К ВОПРОСУ О РОЛИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ СОСУДОВ НЕРАБОЧЕЙ РУКИ В МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ ДОЛЖНОГО УРОВНЯ ГЛИКЕМИИ ПРИ ГОЛОДЕ И НАСЫЩЕНИИ</p>	89	<p><b>V.A. Pereverzev, A.V. Sikorsky, A.S. Blazhko, A.V. Evseev, V.A. Pravdivtsev, M.O. Welcome, Yu.E. Razvodovsky, D.A. Aleksandrov, E.V. Pereverzeva</b> TO THE QUESTION OF THE ROLE OF ENDOTHELIOCYTES OF THE NON-WORKING HAND VESSELS IN THE MECHANISMS OF REGULATION OF THE PROPER LEVEL OF GLYCEMIA DURING HUNGER AND SATIETY</p>
<p><b>Ali Adeeb Hussein Ali</b> BIOELEMENTAL, BIOCHEMICAL AND HORMONAL STATUS IN NORM AND WITH OVERWEIGHT</p>	97	<p><b>Али Адиб Хуссейн Али</b> БИОЭЛЕМЕНТНЫЙ, БИОХИМИЧЕСКИЙ И ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС В НОРМЕ И ПРИ ИЗБЫТОЧНОЙ МАССЕ ТЕЛА</p>

А.Г. Шутова, А.В. Башилов, И.П. Жаворонок,  
А.А. Басалай, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова  
ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ  
ДВУХ ВИДОВ ПОЛЫНИ  
НА ПРОЦЕСС ВОСПАЛЕНИЯ  
У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

105

H. Shutava, A. Bashilov, I. Zhavoronok,  
A. Basalai, P. Shabunya, S. Fatykhova  
INFLUENCE OF EXTRACTS  
OF TWO SPECIES OF WORMWOOD  
ON THE PROCESS OF INFLAMMATION  
IN EXPERIMENTAL ANIMALS

## ОБЗОРЫ / REVIEWS

В.С. Карпушенкова, А.П. Столярчук,  
Я.В. Фалетров, И.И. Бойко, В.М. Шкуматов  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКДИЗОНА  
В КАЧЕСТВЕ АНАБОЛИЧЕСКОГО  
СРЕДСТВА В СПОРТЕ: АНАЛИЗ  
ЛИТЕРАТУРЫ И РАСЧЕТЫ *IN SILICO*

111

V.S. Karpushenkova, A.P. Stolyarchuk,  
Y.V. Faletrov, I.I. Boiko, V.M. Shkumatov  
USAGE OF ECDYSONE  
AS ANABOLIC AGENT IN SPORTS:  
LITERATURE ANALYSIS & *IN SILICO*  
CALCULATIONS

А.Г. Виницкая, В.В. Лелевич  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ  
МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

116

A.G. Vinitzkaya, V.V. Lelevich  
EXPERIMENTAL MODELS  
OF MORPHINE INTOXICATION

Jabbar Mustafa Saleh Jabbar  
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT  
EXTRACTS, PROMISING FOR USE  
IN MEDICAL PRACTICE

120

Джаббар Мустафа Салех Джаббар  
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ЭКСТРАКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО  
ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ  
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

## УЧЕНЫЕ БЕЛАРУСИ / SCIENTISTS OF BELARUS

К 80-летию со дня рождения профессора  
Александра Александровича Чиркина

128

On the occasion of the 80-th birthday  
of Professor Aleksandr A. Chirkin

Правила для авторов журнала  
«Биохимия и молекулярная биология»

130

Information for authors of the  
«Biochemistry and Molecular Biology» journal



## РЕЦЕПТОРЫ КЛЕТОК КРОВИ И АНТИГЕН CYFRA 21-1 КАК ПРЕДИКТОРЫ БЕЗРЕЦИДИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ ОПУХОЛИ R0

*Н. Н. Ковганко<sup>1</sup>, А. Д. Таганович<sup>1</sup>, В. И. Прохорова<sup>2</sup>, Д. И. Мурашко<sup>1</sup>,  
А. В. Колб<sup>1</sup>, О. В. Готько<sup>2</sup>, Л. А. Державец<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup>Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр  
онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,  
аг. Лесной, Минская область, Республика Беларусь

**Введение.** Безрецидивная выживаемость пациентов с I стадией НМРЛ в течение 5 лет составляет 60–70 %, а при II стадии – 35–40 %, поэтому актуальной является разработка прогностических показателей, которые бы позволяли предсказывать рецидив опухолевого процесса у пациентов на ранних стадиях для их результативного лечения.

**Цель исследования** – обосновать возможность использования лабораторных показателей для прогноза рецидива НМРЛ у пациентов с ранними стадиями.

**Материалы и методы.** У 1250 пациентов анализировалась длительность безрецидивного периода после проведенного лечения по результатам наблюдения в течение одного года. У 103 пациентов определяли уровень CYFRA 21-1 иммуноферментным методом, рецепторов CXCR1,2, CD44v6 – методом точечной цитометрии.

**Результаты.** По итогам графического анализа Каплана-Майера определены группы низкого (I ст. G1–2 + II ст. G1) и высокого (I ст. G3 + II ст. G2–3) рисков рецидива опухоли. У пациентов с высоким риском по сравнению с низким больше был уровень CYFRA 21-1, интенсивность флуоресценции CXCR1 в гранулоцитах, относительное содержание CXCR2 в лимфоцитах и CD44v6 в моноцитах ( $p < 0,05$ ). Построено уравнение логистической регрессии и рассчитано его пороговое значение – 0,467.

**Заключение.** Результаты определения концентрации CYFRA 21-1 и параметров рецепторов CXCR1, CXCR2 и CD44v6 в составе уравнения позволяют прогнозировать риск рецидива опухоли у пациентов с НМРЛ с эффективностью 84,5 %.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, рецидив, CYFRA 21-1, CXCR1, CXCR2, CD44v6, безрецидивная выживаемость.

**Для цитирования.** Рецепторы клеток крови и антиген CYFRA 21-1 как предикторы безрецидивной выживаемости пациентов с немелкоклеточным раком легкого после резекции опухоли R0 / Н. Н. Ковганко [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 7–12.

### Введение

В структуре заболеваемости раком легкого около 80 % составляет немелкоклеточный рак (НМРЛ), который на основании гистологического исследования чаще всего является аденокарциномой или плоскоклеточным раком. 5-летняя выживаемость пациентов с НМРЛ существенно меньше, чем в случае злокачественных опухолей другой локализации (толстый кишечник, молочная железа, предстательная железа) и составляет 15 % [1]. Это обусловлено диагностикой данного заболевания

на поздних стадиях. У 70 % пациентов удается поставить правильный диагноз только на III/IV стадиях, когда оперативное вмешательство уже не показано или гораздо менее эффективно, и только у 16 % пациентов диагностируется наличие НМРЛ, ограниченного легочной тканью [2].

Самым ранним этапом клинически верифицированного развития опухоли, согласно классификации TNM, является I стадия. Как правило, таким пациентам после проведенной хирургической полной резекции опухоли (R0) никакого терапевтиче-

ского лечения не проводят. Между тем, еще в 2005 году исследователи пришли к заключению, что адьювантная химиотерапия эффективна у пациентов с I стадией НМРЛ [3]. Однако до настоящего времени нет понимания, в каких случаях на этом этапе развития заболевания проведение такой терапии было бы необходимо.

Полученные сведения дополняют имеющуюся информацию о том, что у пациентов с I стадией НМРЛ 5-летний барьер выживаемости преодолевают только 60–70 %, а при II стадии она уже снижается до 35–40 %. Причиной столь высокой смертности практически всегда является рецидив заболевания, который обусловлен наличием у этой категории скрытых метастазов, даже несмотря на постановку диагноза в ранней стадии. Это свидетельствует о разном течении данного заболевания в пределах одной стадии. Таким образом, есть необходимость в разработке биомаркеров, которые бы позволяли предсказывать рецидив опухолевого процесса у пациентов на ранних стадиях развития опухоли, чтобы правильно построить стратегию и тактику их лечения.

Основными критериями течения НМРЛ обычно служат стадия, возраст и состояние пациента [4]. Вместе с тем, в начале заболевания многие исследователи отмечают их малую эффективность и необходимость использования других критериев рецидива опухоли после проведенного лечения [5]. Полагают, что оптимальным прогностическим критерием могла бы быть комбинация нескольких легко и точно измеряемых показателей, характеризующих опухоль и состояние пациента. Обязательным требованием является чувствительность их к изменениям, происходящим в организме, что важно для повторного измерения [6].

Наименее инвазивным и наиболее доступным материалом для поиска таких биомаркеров является кровь. С развитием технологий протеомики в качестве диагностических и прогностических показателей злокачественного роста, в том числе у пациентов с НМРЛ, предлагались различные белки, циркулирующие в кровотоке [4]. К ним, в частности, относятся ставшие уже классическими CYFRA 21-1 (фрагмент 19 цитокератина), SCC (антиген плоскоклеточного рака), СЕА (раковый эмбриональный антиген). Позже было показано, что СЕА и CYFRA 21-1 помимо диагностического имеют прогностическое значение при НМРЛ [7]. Однако результаты определения в сыворотке крови уровня каждого из них в отдельности не смогли продемонстрировать необходимых специфичности и чувствительности [8].

Воспаление относится к обязательному компоненту молекулярных событий, сопутствующих развитию рака [9]. CXCL5 и CXCL8, известный также как интерлейкин 8 (ИЛ-8), являются провоспалительными хемокинами. Взаимодействуя со своими рецепторами (CXCR1 и CXCR2) на поверхности клеток, они вызывают направленное перемещение и дегрануляцию нейтрофильных лейкоцитов в микроокружении опухоли, способствуя ангиогенезу и метастазированию [10]. Результаты ранее проведенных нами исследований позволили продемонстрировать изменение уровня этих белков в крови пациентов с НМРЛ. Установлена их связь с характеристиками опухолевого процесса, рассчитана диагностическая эффективность их определения при этом заболевании, которая в ряде случаев превысила таковую для классических маркеров [2].

Целью настоящего исследования явилось обоснование использования уровня белков крови – участников канцерогенеза в прогнозе развития рецидивов после резекции опухоли R0.

#### Материалы и методы

Для обоснования групп риска рецидива опухоли у пациентов с ранними стадиями НМРЛ вначале было предпринято ретроспективное исследование, в котором использовалась информация из базы данных Белорусского канцер-регистра. У 1250 пациентов (839 мужчин и 411 женщин), у которых в период с 01.01.2015 по 31.12.2015 впервые был диагностирован НМРЛ в ранних стадиях (I и II), анализировалась длительность безрецидивного периода после проведенного лечения по результатам наблюдения в течение одного года. Средний возраст пациентов составил 57(±24,5) лет. Стадия I была у 732 человек (493 мужчины и 239 женщин), II стадия – у 518 человек (361 мужчина и 157 женщин).

Исследование уровня хемокинов и их рецепторов проводили у 103 пациентов (72 мужчины и 31 женщина), поступивших в стационар ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» в период с 01.01.2019 по 31.12.2020 гг., у которых впервые диагностирован НМРЛ I или II стадии. Средний возраст пациентов составил 56(±22,5) лет. Стадия I была диагностирована у 62 пациентов (42 мужчины и 19 женщин). По результатам гистологического исследования высокодифференцированная опухоль (G1) была у 20, средней степени дифференцировки (G2) – 23 и низкодифференцированная (G3) – у 19 человек. У 41 пациента (30 мужчин и 12 женщин) была выявлена II стадия. Из них по степени злокачественности опухоли G1 была у 14, G2 – у 15 и G3 – у 12 человек.

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Определение концентрации антигена CYFRA 21-1 (фрагмента цитокератина-19) и концентрации биомаркера плоскоклеточного рака SCC (подфракция ингибитора сериновой протеазы ТА-4) в сыворотке крови проводили на автоматическом анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Германия), использующем принцип электрохемилюминесценции.

Определение концентраций хемокинов CXCL5, CXCL8, индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 $\alpha$ , изофермента пируваткиназы TuM2 PK и гиалуроновой кислоты в сыворотке крови пациентов с НМРЛ проводилось с помощью ИФА-наборов FineTest (КНР) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия). Концентрацию рецепторов CXCR1, CXCR2 и CD44v6 в клетках лейкоцитарного ряда и плотность их расположения в мембране клетки определяли, используя проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США).

Для выяснения зависимости длительности безрецидивного периода от времени наблюдения строили графики Каплана-Майера. Построение прогностической модели осуществляли с помощью метода бинарной логистической регрессии. Оценку интегральной диагностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью метода построения характеристических ROC-кривых с последующим вычислением пло-

щади под ROC-кривой (AUC). При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали как равное 5 %.

### Результаты и их обсуждение

Необходимость проведения ретроспективного исследования была продиктована поиском и выделением групп риска рецидива опухоли в ранних стадиях НМРЛ. С этой целью в расчет принимались только те факторы, которые связаны с развитием опухоли и прежде всего могут оказывать свое влияние на рецидив. По мнению различных авторов, к ним относятся стадия заболевания и степень дифференцировки клеток опухоли или Grade [1]. Однако обоснования этим предложениям при НМРЛ не было сделано, поэтому в настоящей работе мы проанализировали вышеперечисленные факторы, сопоставив их с результатами одногодичного наблюдения после проведенного лечения до наступления рецидива заболевания.

График Каплана-Майера, в котором приведена зависимость безрецидивной выживаемости пациентов, одновременно, в зависимости стадии (I или II) и степени дифференцировки опухолевых клеток, наглядно демонстрирует разделение кривых на 2 группы. Первая включает пациентов с более длительной безрецидивной выживаемостью. В нее вошли те, у которых была I стадия НМРЛ и высокодифференцированная опухоль (G1) или средней степени дифференцировки (G2), а также пациенты со II стадией заболевания и высокодифференцированной опухолью. Вторая объединяет пациентов с более коротким периодом безрецидивной выживаемости. В нее входят те, у кого была I стадия и низкодифференцированная опухоль (G3) и паци-

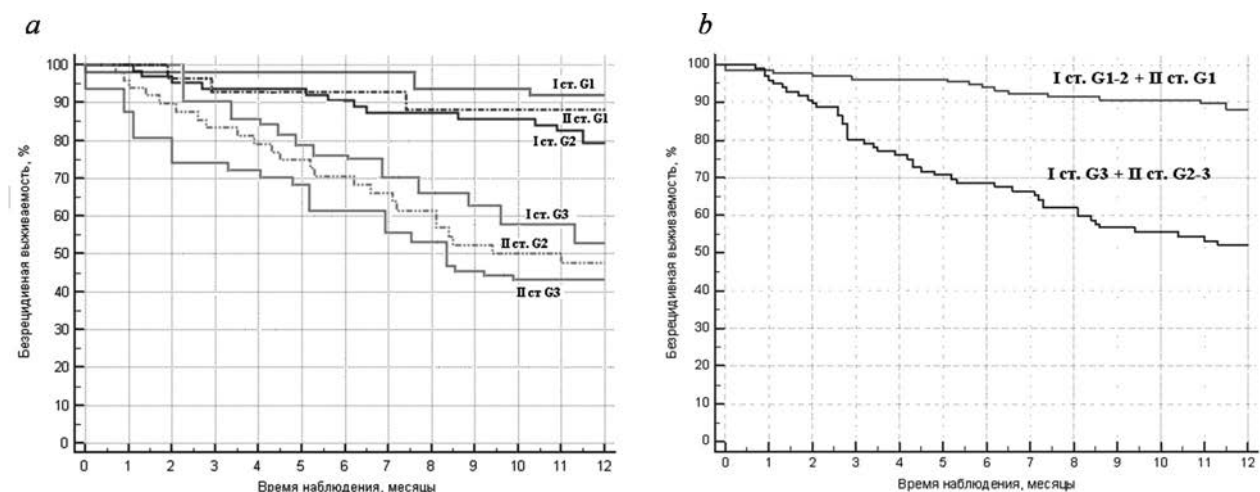


Рисунок 1 – Безрецидивная выживаемость пациентов с НМРЛ в зависимости от:  
 а – комбинированного сочетания стадии и степени дифференцированности опухоли; б – группы риска

Figure 1 – Relapse-free survival of patients with NSCLC, depending on:  
 а – a combination of the stage and degree of tumor differentiation; б – group of risk

енты со II стадией, опухолевые клетки у которых были средней степени дифференцировки или низкодифференцированными (рисунок 1 а).

На основании полученных данных все пациенты были разделены на группы быстрого (I ст. G1-2 + II ст. G1) и медленного (I ст. G3 + II ст. G2-3) рецидива опухоли или, соответственно, высокого и низкого риска рецидива. Результаты построения графика Каплана-Майера показывают, что разница безрецидивной выживаемости между этими двумя группами превышает различия выживаемости в зависимости только от стадии НМРЛ или только от степени дифференцированности опухолевых клеток (рисунок 1, b).

Из 26 определяемых лабораторных параметров в крови пациентов, в которые вошли те, для которых связь с выраженностью заболевания и дескрипторов опухоли была известна давно (CYFRA 21-1, SCC, пируваткиназа M2) и те, для которых такая связь была установлена совсем недавно (CXCR1, CXCR2, CXCL5, CXCL8, CD44v6, HIF-1α), уровень только четырех из них демонстрирует существенную разницу между группами высокого и низкого риска рецидива опухоли (таблица 1).

Статистически достоверно более высоким у пациентов с НМРЛ и высоким риском по сравнению с низким риском был уровень CYFRA 21-1, интенсивность флуоресценции (MFI) рецептора CXCR1 в гранулоцитах, относительное содержание рецептора CXCR2 в лим-

фоцитах и рецептора CD44v6 в моноцитах. Все эти параметры демонстрируют корреляционную связь средней силы с риском рецидива опухоли, поэтому все они были вовлечены в построение модели определения риска опухолевого рецидива методом логистической регрессии. В результате составлено уравнение, которое учитывает все 4 отобранных параметра крови (рисунок 2).

Диагностическая эффективность прогноза низкого или высокого риска развития рецидива опухоли в случае использования результатов логистического уравнения значительно выросли – до 84,5 % (чувствительность – 84,8 %, специфичность – 84,2 %). По сути, все эти показатели оказались гораздо выше, чем при использовании каждого из них с аналогичной прогностической целью в отдельности (таблица 2).

$$Y = \frac{\exp(-0,728 + 0,401 \times X1 + 0,153 \times X2 + 0,811 \times X3 + 0,673 \times X4)}{1 + \exp(-0,728 + 0,401 \times X1 + 0,153 \times X2 + 0,811 \times X3 + 0,673 \times X4)}$$

Рисунок 2 – Уравнение логистической регрессии для предсказания развития рецидива у пациентов с НМРЛ.

Figure 2 – Logistic regression equation for predicting the development of tumor relapse in patients with NSCLC.

*Примечание:* X1 – результат определения концентрации антигена Cyfra 21-1 в сыворотке крови; X2 – интенсивность флуоресценции рецептора CXCR1 в гранулоцитах; X3 – относительное количество (%) рецептора CXCR2 в лимфоцитах; X4 – относительное количество рецептора CD44v6 в моноцитах; Y – результат регрессионного уравнения; числа перед значениями X1–X4 – коэффициенты логистической регрессии; exp (≈ 2,718) – основание натурального логарифма; «-0,728» – константа логистического уравнения.

*Note:* X1 is the result of determining the concentration of the Cyfra 21-1 antigen in the blood serum; X2 – fluorescence intensity of the CXCR1 receptor in granulocytes; X3 is the relative amount (%) of the CXCR2 receptor in lymphocytes; X4 – relative amount of CD44v6 receptor in monocytes; Y is the result of the regression equation; numbers before X1–X4 – values are logistic regression coefficients; exp (≈ 2,718) is the base of the natural logarithm; “-0,728” – the constant of the logistic equation.

Таблица 1 – Уровень показателей, статистически значимо отличающихся у пациентов с низким и высоким риском рецидива опухоли

Table 1 – The level of indicators in patients with low and high risk of tumor relapse

Показатель/Indicator	Низкий риск/Low risk	Высокий риск/High risk	p
CXCR1 гранулоциты, MFI/ CXCR1 granulocytes, MFI	37,40 [27,90; 43,55]	50,60 [34,60; 60,00]	<b>0,027</b>
CXCR2 лимфоциты, %/ CXCR2 lymphocytes, %	14,80 [11,05; 20,70]	19,30 [14,90; 24,90]	<b>0,031</b>
CD44v6 моноциты, %/ CD44v6 monocytes, %	3,20 [1,35; 4,00]	5,10 [3,50; 6,80]	<b>0,043</b>
CYFRA 21-1, нг/мл/ CYFRA 21-1, ng/ml	2,44 [1,56; 4,03]	3,08 [2,21; 5,43]	<b>0,041</b>

*Примечание:* доля (%) лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов в общей популяции этих клеток в крови, снабженных CXCR1, CXCR2, CD44v6; MFI – интенсивность флуоресценции комплексов антитело/рецептор, пропорциональная количеству рецепторов на клетке; p – уровень статистической значимости разницы у пациентов с низким и высоким риском рецидива опухоли.

*Note:* the proportion (%) of lymphocytes, monocytes, granulocytes in the total population of these cells in the blood, supplied with CXCR1, CXCR2, CD44v6; MFI is the fluorescence intensity of antibody/receptor complexes proportional to the number of receptors on the cell; p – level of statistical significance of the difference in patients with low and high risk of tumor recurrence.

## Заключение

Итоги проведенного исследования дают основание рекомендовать комплекс лабораторных показателей, включающий уровень CYFRA 21-1

и параметры рецепторов CXCR1, CXCR2, CD44v6 для определения в крови пациентов с НМРЛ на ранних стадиях заболевания с целью оценки у них риска рецидива опухоли.

Таблица 2 – Диагностическая значимость индивидуального и комбинированного определения маркеров в крови пациентов с низким и высоким риском рецидива опухоли

Table 2 – Diagnostic significance of individual and combined determination of markers in the blood of patients with low and high risk of tumor relapse

Показатель	ПЗ/ TV	ДЧ/ SE	ДС/ SP	ПЦПР/ PPV	ПЦОР/ NPV	AUC	ДЭ/EF
CYFRA 21-1, нг/мл/ CYFRA 21-1, ng/ml	>2,8	62,5	71,9	64,2	70,4	0,637	68,9
CXCR1 гранулоциты, MFI/ CXCR1 granulocytes, MFI	>43,2	60,9	66,7	59,6	67,9	0,601	64,1
CXCR2 лимфоциты, %/ CXCR2 lymphocytes, %	>15,7	67,4	68,4	63,3	72,2	0,627	68,0
CD44v6 моноциты, %/ CD44v6 monocytes, %	>4,1	63,0	70,2	63,0	70,2	0,612	67,0
<b>Уравнение Y/Equation Y</b>	<b>&gt;0,467</b>	<b>84,8</b>	<b>84,2</b>	<b>81,2</b>	<b>87,3</b>	<b>0,821</b>	<b>84,5</b>

*Примечание:* ПЗ – пороговое значение, ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата, AUC – площадь под ROC-кривой, ДЭ – диагностическая эффективность.

*Note:* TV – threshold value, SE – diagnostic sensitivity, SP – diagnostic specificity, PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value, AUC – area under the ROC-curve, EF – diagnostic efficiency.

## Список цитированных источников

- Histological Grade: Analysis of Prognosis of Non-small Cell Lung Cancer After Complete Resection / M. Yasukawa [et al.] // *In Vivo*. – 2018 – Vol. 32, № 6 – P. 1505–1512.
- CYFRA21-1 is a prognostic determinant in non-small cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients / J. L. Pujol [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2004. – Vol. 90, № 11 – P. 2097–2105.
- Meta-analysis of postoperative adjuvant chemotherapy with tegafururacil in non-small-cell lung cancer / C. Hamada [et al.] // *J. Clin. Oncology*. – 2005 – Vol. 23, № 22 – P. 4999–5006.
- Current and prospective protein biomarkers of lung cancer / T. N. Zamay [et al.] // *Cancers*. – 2017. – Vol. 9, № 11 – P. 155.
- Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer / M. Katsunari [et al.] // *Eur. J. Cardiothoracic Surg*. – 2007. – Vol. 3, № 3 – P. 435–439.
- McShane, L.M. Identification of clinically useful cancer prognostic factors: what are we missing? / L. M. McShane, D. G. Altman, W. Sauerbrei // *J. Natl. Cancer. Inst.* 2005 – Vol. 97, № 14 – P. 1023–1025.
- Serum biomarker profiles as diagnostic tools in lung cancer / B. M. Nolen [et al.] // *Cancer Biomark*. – 2011–2012 – Vol. 1, № 1 – P. 3–12.
- Baseline C-reactive protein level predicts survival of early-stage lung cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis / G. Leuzzi [et al.] // *Tumori*. – 2016 – Vol. 102, № 5 – P. 441–449.
- Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability / F. Colotta [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2009. – Vol. 30, № 7 – P. 1073–1081.
- CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target / W. Zhang [et al.] // *Cancer Commun (Lond)*. – 2020. – Vol. 40, № 2–3 – P. 69–80.

## References

- Yasukawa M, Sawabata N, Kawaguchi T, Kawai N, Nakai T, Ohbayashi C, Taniguchi S. Histological Grade: Analysis of Prognosis of Non-small Cell Lung Cancer After Complete Resection. *In Vivo*. 2018 Nov-Dec; 32(6):1505-1512. DOI: 10.21873/invivo.11407
- Pujol JL, Molinier O, Ebert W, Daurès JP, Barlesi F, Buccheri G, Paesmans M, Quoix E, Moro-Sibilot D, Szturmowicz M, Bréchet JM, Muley T, Grenier J. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br. J. Cancer*. 2004 Jun 1;90(11):2097-105. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601851
- Hamada C, Tanaka F, Ohta M, Fujimura S, Kodama K, Imaizumi M, Wada H. Meta-analysis of postoperative adjuvant chemotherapy with tegafur-uracil in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):4999-5006. DOI: 10.1200/JCO.2005.09.017.
- Zamay TN, Zamay GS, Kolovskaya OS, Zukov RA, Petrova MM, Gargaun A, Berezovski MV, Kichkailo AS. Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017 Nov 13;9(11):155. DOI: 10.3390/cancers9110155
- Matsuoka K, Sumitomo S, Nakashima N, Nakajima D, Misaki N. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 2007 Sep;32(3):435-9. DOI: 10.1016/j.ejcts.2007.05.014
- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W. Identification of clinically useful cancer prognostic factors: what are we missing? *J. Natl. Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1023-5. DOI: 10.1093/jnci/dji193
- Nolen BM, Langmead CJ, Choi S, Lomakin A, Marrangoni A, Bigbee WL, Weissfeld JL, Wilson DO, Dacic S, Siegfried JM, Lokshin AE. Serum biomarker profiles as diagnostic tools in lung cancer. *Cancer Biomark*. 2011-2012;10(1):3-12. DOI: 10.3233/CBM-2012-0229

- 8 Leuzzi G, Galeone C, Gisabella M, Duranti L, Taverna F, Suatoni P, Morelli D, Pastorino U. Baseline C-reactive protein level predicts survival of early-stage lung cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Tumori*. 2016 Oct 13;102(5):441-449. DOI: 10.5301/tj.5000522
- 9 Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009 Jul;30(7):1073-81. DOI: 10.1093/carcin/bgp127
- 10 Zhang W, Wang H, Sun M, Deng X, Wu X, Ma Y, Li M, Shuo SM, You Q, Miao L. CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target. *Cancer Commun (Lond)*. 2020 Mar;40(2-3):69-80. DOI: 10.1002/cac2.12010

## BLOOD CELL RECEPTORS AND CYFRA 21-1 ANTIGEN AS PREDICTORS OF RECURRENCE-FREE SURVIVAL OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER AFTER R0 TUMOR RESECTION

N. N. Kauhanka<sup>1</sup>, A. D. Tahanovich<sup>1</sup>, V. I. Prohorova<sup>2</sup>, D. I. Murashko<sup>1</sup>,  
A. V. Kolb<sup>1</sup>, O. V. Gotko<sup>2</sup>, L. A. Dzerjavets<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

<sup>2</sup>Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N. N. Alexandrova, ag. Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus

**Introduction.** The relapse-free survival of patients with stage I NSCLC for 5 years is 60–70 %, and for stage II – 35–40 %. Therefore, the development of prognostic indicators that would allow predicting the recurrence of the tumor process in patients at early stages for their effective treatment is relevant.

**Objective** – to substantiate the possibility of using laboratory parameters to predict the recurrence of NSCLC in patients with early stages.

**Materials and methods.** In 1250 patients, the duration of the relapse-free period after the treatment was analyzed based on the results of observation for one year. In 103 patients, the level of CYFRA 21 1 was determined by enzyme immunoassay, CXCR1,2, CD44v6 receptors – by flow cytometry.

**Results.** According to the results of the graphical analysis of Kaplan-Meier, groups of low (I stage G1-2 + II stage G1) and high (I stage G3 + II stage G2-3) risks of tumor recurrence were identified. High-risk patients had higher levels of CYFRA 21-1, CXCR1 fluorescence intensity in granulocytes, relative content of CXCR2 in lymphocytes and CD44v6 in monocytes compared to low-risk patients ( $p < 0.05$ ). A logistic regression equation was constructed and its threshold value was calculated – 0.467.

**Conclusions.** The results of determining the concentration of CYFRA 21 1 and the parameters of CXCR1, CXCR2 and CD44v6 receptors in the equation make it possible to predict the risk of tumor recurrence in patients with NSCLC with an efficiency of 84.5 %.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, tumor relapse, CYFRA 21-1, CXCR1, CXCR2, CD44v6, recurrence-free survival.

**For citation:** Kauhanka NN, Tahanovich AD, Prohorova VI, Murashko DI, Kolb AV, Gotko OV, Dzerjavets LA. Blood cell receptors and CYFRA 21-1 antigen as predictors of recurrence-free survival of patients with non-small cell lung cancer after R0 tumor resection. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 7–12 (in Russian).

Поступила 21.07.2022

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПАЦИЕНТОВ С ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Г. Н. Семенкова<sup>1</sup>, И. Э. Адзерихо<sup>2,3</sup>, Н. В. Амаэбери<sup>1</sup>, А. М. Серебро<sup>3</sup>, С. Ф. Мотолько<sup>4</sup>,  
Т. Э. Владимирская<sup>2</sup>, И. А. Новицкий<sup>1</sup>, А. В. Шулганова<sup>1</sup>, Д. В. Тихинская<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup>Учреждение здравоохранения «Минская областная клиническая больница»,  
аг. Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь;

<sup>4</sup>Учреждение здравоохранения «2-я городская клиническая больница»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Введение.** Легочная гипертензия – клинический синдром с неблагоприятным прогнозом. Это заболевание связывают с дисфункцией или повреждением эндотелия, что приводит к ремоделированию сосудов, повышению сосудистого сопротивления и артериального давления в легочной артерии. Известно, что развитие легочной гипертензии сопровождается воспалением, причиной которого может быть активация нейтрофилов и индуцирование оксидативного стресса.

**Цель исследования** – проанализировать способность нейтрофилов циркулирующей крови пациентов с легочной гипертензией генерировать активные формы кислорода и хлора, а также секретировать миелопероксидазу во внеклеточную среду.

**Материалы и методы.** Гистопак-1077, люминол, *Micrococcus lysodeikticus*, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, сбалансированный буферный солевой раствор Эрла, фосфатный буферный раствор; хемилюминесценция, спектрофотометрия.

**Результаты.** У пациентов с легочной гипертензией нейтрофилы преактивированы уже в циркулирующей крови, что выражается в изменении способности клеток генерировать активные формы кислорода и хлора, а также усилении процессов секреторной дегрануляции, сопровождающейся увеличением выхода лизоцима и миелопероксидазы во внеклеточную среду.

**Заключение.** Повышенная секреция миелопероксидазы из клеток позволяет предположить, что этот фермент является важным биомаркером воспаления при легочной гипертензии. С другой стороны, миелопероксидазу можно рассматривать в качестве терапевтической мишени для подавления воспалительного процесса при лечении пациентов с этой патологией.

**Ключевые слова:** легочная гипертензия, нейтрофилы, активные формы кислорода и хлора, секреторная дегрануляция, лизоцим, миелопероксидаза.

**Для цитирования.** Функциональная активность нейтрофилов пациентов с легочной гипертензией / Г. Н. Семенкова [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 13–18.

### Введение

Легочная гипертензия (ЛГ) – клинический синдром с неблагоприятным прогнозом. ЛГ связывают с дисфункцией или повреждением эндотелия, что приводит к ремоделированию сосудов, повышению сосудистого сопротивления и артериального давления в легочной артерии [1–3]. Существует предположение, что важным фактором, способствующим развитию этой патологии, является воспаление. Ранее, при изучении патогенеза легочной артериальной гипертензии у крыс в экспериментальной модели *in vivo*, мы показали, что формирование воспаления в динамике этого заболевания сопряжено с праймингом нейтрофилов [3].

Известно, что нейтрофилы играют ключевую роль в воспалении [4]. Эти клетки являются основными «киллерами» чужеродного материала в очаге воспаления посредством образования активных форм кислорода и хлора (АФКХ) за счет активации НАДФН-оксидазы, продуцирующей супероксидные анион-радикалы, которые затем трансформируются в пероксид водорода. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является субстратом миелопероксидазы (МПО), которая катализирует образование хлорноватистой кислоты (НОСl), основного бактерицидного агента и источника свободных радикалов [5–7]. НОСl повреждает жизненно важные молекулы, что приводит к нарушению клеточной функции или цитодеструкции [8, 9].

Проведенные нами исследования функциональной активности нейтрофилов крови крыс с легкой артериальной гипертензией позволили выявить модификацию систем генерации АФКХ, увеличение концентрации внутриклеточных ионов кальция и усиление секреторной дегрануляции, что приводит к повышению уровня МПО во внеклеточной среде [3]. Поскольку МПО является источником сильного окислителя – хлорноватистой кислоты, избыток этого фермента может индуцировать оксидативный стресс.

Целью нашей работы было проанализировать способность нейтрофилов циркулирующей крови пациентов с ЛГ генерировать АФКХ и секретировать МПО во внеклеточную среду.

### Материалы и методы

В работе использовали декстран, гистопак-1077, люминол, питательную среду RPMI-1640, Triton X-100, *Micrococcus lysodeikticus*, пероксид водорода, гидразид 4-аминобензойной кислоты (АВАН) (Sigma, США), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Carl Roth + Co KG, Германия), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) (Анализ Х, Беларусь). ФБР собственного приготовления включал 137 ммоль/л NaCl, 2,7 ммоль/л KCl, 8 ммоль/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 ммоль/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (pH 7,4). СБСРЭ собственного приготовления включал 0,116 ммоль/л NaCl, 5,4 ммоль/л KCl, 0,9 ммоль/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,8 ммоль/л MgSO<sub>4</sub>, 5,6 ммоль/л C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>.

Обследованы пациенты с ЛГ, находящиеся на лечении в отделении кардиологии Минской областной больницы, и здоровые люди.

Плазму крови получали центрифугированием цельной крови в течение 15 мин при 3000 об/мин.

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной периферической крови здоровых людей и пациентов с ЛГ в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике [10]. Примесь эритроцитов удаляли с помощью гипотонического лизиса, после чего повышали осмотическое давление добавлением 0,3 моль/л раствора NaCl. Суспензию клеток дважды отмывали в 0,15 моль/л растворе NaCl и суспензировали в СБСРЭ (pH 7,2). Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло не менее 96 %.

Генерацию нейтрофилами АФКХ исследовали методом люминол-опосредованной хемилюминесценции (Люм-ХЛ) с применением компьютеризованного измерительного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (БГУ, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom (Новые аналитические системы, Бела-

русь) [11]. Измерения проводили в среде RPMI (pH = 7,2–7,4) при T = +37 °C. Количество нейтрофилов в 1 мл составляло 1·10<sup>6</sup> клеток. Генерацию нейтрофилами АФКХ наблюдали при активации клеток в процессе адгезии на стекло. Интегральную интенсивность Люм-ХЛ оценивали как площадь под кинетической кривой, регистрируемой в течение 10 мин.

Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из клеток [12]. Суспензию нейтрофилов (2 млн/мл) помещали в стеклянные цилиндрические кюветы с плоским дном и инкубировали 30 мин при +37 °C. После этого образцы центрифугировали 10 мин 1500 об/мин. Активность лизоцима в супернатанте определяли по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрическим методом (λ = 450 нм) на спектрофлуориметре CM 2203 (Солар, Беларусь). Результаты представлены в процентах от общей активности фермента, высвобождающегося из нейтрофилов после обработки 10%-м раствором Triton X-100.

Пероксидазную активность МПО в плазме крови оценивали по скорости окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) пероксидом водорода в присутствии МПО в 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндиимин [13]. Реакцию инициировали внесением 0,3 ммоль/л раствора пероксида водорода. Образование 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндиимина оценивали спектрофотометрически (λ = 650 нм) на спектрофлуориметре CM2203 (Солар, Беларусь), определяя оптическую плотность через 1 и 5 мин после начала реакции. Пероксидазную активность МПО выражали в мкмоль/л ТМБ/(мин·мл плазмы). В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндиимина ε<sub>650</sub> = 3,9 · 10<sup>4</sup> М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>.

Статистический анализ данных проводился с помощью программы Origin, version 8.5.1 (OriginLab Corp.). Результаты измерения интенсивности Люм-ХЛ нейтрофилов здоровых людей и пациентов в зависимости от степени тяжести ЛГ (нормальное распределение) представлены в виде M ± σ, где M – среднее значение, σ – стандартное отклонение. Сравнение количественных показателей между группами проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и теста Даннета. Результаты исследования секреторной дегрануляции и МПО-активности (распределение отличается от нормального) представлены в виде Me (Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>), где Me – медиана, Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub> – нижний и верхний квартили соответственно. Сравнение количественных показателей между группами проводилось с помощью критерия Манна-Уитни. Все различия считались значимыми при p < 0,05.



## Результаты и их обсуждение

Нами проанализированы значения интегральной интенсивности Люм-ХЛ, полученные для нейтрофилов здоровых людей и пациентов с ЛГ при стимуляции клеток к фагоцитозу адгезией. Оказалось, что параметры хемилюминесценции у различных пациентов были выше либо ниже, чем в группе здоровых людей. Известно, что люминол, используемый для регистрации АФКХ, взаимодействует со всеми типами активных метаболитов кислорода и хлора, однако наиболее эффективно этот хемилюминесцентный индикатор реагирует с хлорноватистой кислотой [14]. Из этого следует, что наблюдаемые нами нарушения способности нейтрофилов генерировать АФКХ у пациентов с ЛГ обусловлены изменением продукции НОС1, что связано с функционированием МПО. Как видно из рисунка 1, генерация АФКХ клетками пациентов зависит от степени тяжести заболевания. Если для I степени тяжести мы зарегистрировали снижение выхода АФКХ по сравнению с контролем, то с увеличением степени тяжести патологии (II и III) наблюдается рост продукции АФКХ. При этом у пациентов с высокой степенью тяжести ЛГ генерация АФКХ значительно превышает контрольные значения, что свидетельствует о повышенной функциональной активности нейтрофилов, вероятно, за счет увеличения вклада МПО в этот процесс. Можно предположить, что нейтрофилы могут быть вовлечены в формирование оксидативного стресса в динамике ЛГ.

В процессе стимуляции к фагоцитозу усиливается секреторная дегрануляция нейтрофилов [15, 16]. При этом из клеток выделяется содержимое азурофильных гранул, включающее гидролитические ферменты, например, лизоцим и МПО. Результаты измерения секреторной дегрануляции, основанного на определении лизоцима во внеклеточной среде, представлены на рисунке 2. Видно, что у всех пациентов, кроме одного, выход лизоцима из клеток увеличен (50,3 (47,9; 54,5)  $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой (27,6 (24,4; 31,3)  $p < 0,05$ ).

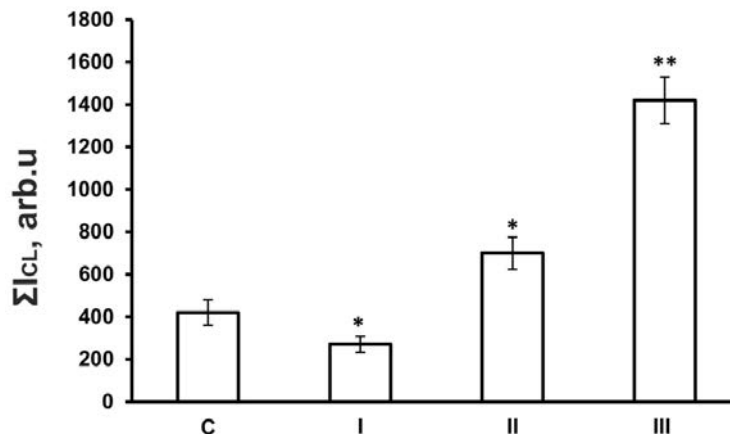


Рисунок 1 – Интегральная интенсивность люминол-опосредованной хемилюминесценции стимулированных адгезией нейтрофилов здоровых людей (С) и пациентов в зависимости от степени тяжести легочной гипертензии (I – первая, II – вторая и III – третья степень тяжести заболевания). Здоровые люди и пациенты с легочной гипертензией ( $n = 12$ ).  
\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  по сравнению с контролем

Figure 1 – Integral intensity of luminol-mediated chemiluminescence of neutrophils stimulated by adhesion in healthy people (C) and patients, depending on the severity of pulmonary hypertension (I – first, II – second and III – third severity of the disease). Healthy people and patients with pulmonary hypertension ( $n = 12$ ).  
\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  compared to control

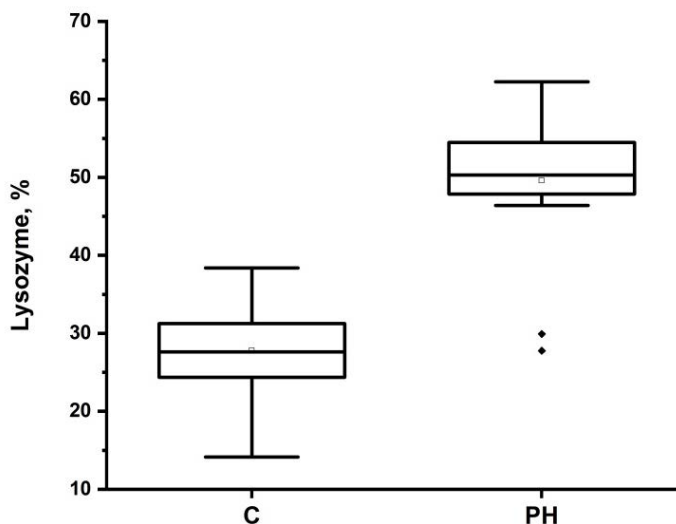


Рисунок 2 – Выход лизоцима из нейтрофилов здоровых людей (С) и пациентов с легочной гипертензией (PH). Здоровые люди ( $n = 12$ ), пациенты с легочной гипертензией ( $n = 18$ )

Figure 2 – Lysozyme release from neutrophils of healthy people (C) and patients with pulmonary hypertension (PH). Healthy people ( $n = 12$ ), patients with pulmonary hypertension ( $n = 18$ )

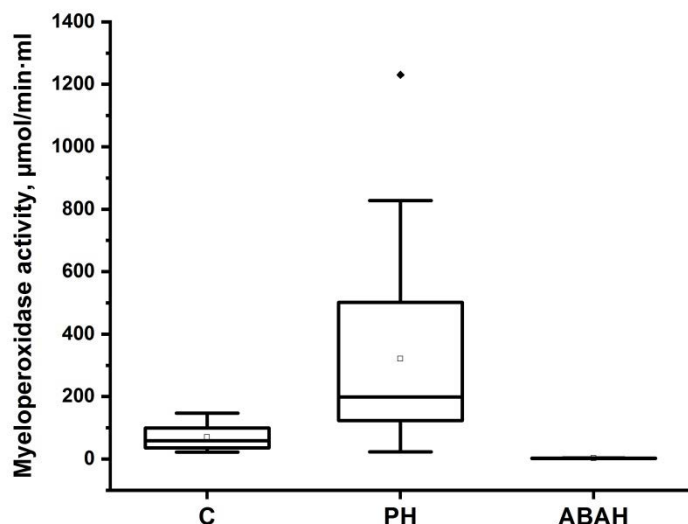


Рисунок 3 – Peroxidase activity of myeloperoxidase in the blood plasma of healthy people (C) and patients with pulmonary hypertension (PH).

Healthy people ( $n = 12$ ), patients with pulmonary hypertension ( $n = 15$ ). The concentration of the standard myeloperoxidase inhibitor 4-aminobenzoic acid hydrazide (АВАН) in patients' plasma is  $10 \mu\text{mol/L}$

Figure 3 – Peroxidase activity of myeloperoxidase in the blood plasma of healthy people (C) and patients with pulmonary hypertension (PH).

Healthy people ( $n = 12$ ), patients with pulmonary hypertension ( $n = 15$ ). The concentration of the standard myeloperoxidase inhibitor 4-aminobenzoic acid hydrazide (АВАН) in patients' plasma is  $10 \mu\text{mol/L}$

Можно заключить, что у пациентов с ЛГ секреция лизоцима из нейтрофилов повышена.

На рисунке 3 продемонстрировано изменение пероксидазной активности МПО в плазме крови здоровых людей и пациентов с ЛГ. Видно, что добавление стандартного ингибитора МПО АВАН к плазме пациентов вызывает полное ингибирование фермента. Это свидетельствует о наличии МПО в анализируемом материале. В образцах па-

циентов с ЛГ уровень секреции МПО из фагоцитов во внеклеточную среду значительно выше ( $198,9 (123,2; 501,8) p < 0,05$ ), чем в контроле ( $58,7 (35,5; 99,5) p < 0,05$ ). Поскольку максимально МПО локализована в нейтрофилах и только небольшое количество этого фермента сосредоточено в моноцитах, можно заключить что нейтрофилы пациентов преактивированы уже в циркулирующей крови.

### Заключение

Из полученных данных следует, что у пациентов с ЛГ нарушены реакции неспецифического иммунитета, что выражается в модификации способности стимулированных к фагоцитозу нейтрофилов крови генерировать АФКХ. Это обусловлено изменением продукции хлорноватистой кислоты, что зависит от функционирования МПО. Генерация АФКХ клетками пациентов коррелирует со степенью тяжести ЛГ, что свидетельствует о развитии оксидативного стресса и, как следствие, воспаления при этой патологии.

Нами установлено, что у пациентов с ЛГ секреторная дегрануляция нейтрофилов протекает более интенсивно и уровень МПО во внеклеточной среде значительно выше, чем в контрольной группе.

Данное наблюдение позволяет заключить, что при ЛГ нейтрофилы преактивированы (праймированы) уже в циркулирующей крови. Это, в свою очередь, указывает на наличие системного воспалительного процесса в организме, одним из биомаркеров которого является МПО. Однако МПО можно рассматривать в качестве потенциальной терапевтической мишени для подавления воспалительного процесса при лечении пациентов с этой патологией.

### Список цитированных источников

- Rafikova, O. Focus on Early Events: Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension Development / O. Rafikova, I. Al Ghoulh, R. Rafikov // *Antioxidants Redox Signal.* – 2019. – Vol. 31(13). – P. 933–953.
- Padrez, Y. Quantitative and qualitative analysis of pulmonary arterial hypertension fibrosis using wide-field second harmonic generation microscopy / Y. Padrez [et al.] // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12:7330.
- The inflammation influence on pathological remodeling of pulmonary arteries in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats / I. Adzerikho [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2021. – Vol. 42, Supplement 1. – P. 1962.
- Kolaczowska, E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczowska, P. Kubers // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13(3). – P. 159–175.
- Babior, B. M. Phagocytes and oxidative stress / B. M. Babior // *Am. J. Med.* – 2000. – Vol. 109(1). – P. 33–44.
- Arnhold, J. The dual role of myeloperoxidase in immune response / J. Arnhold // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21(21). – P. 1–28.
- Kettle, A. J. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant product / A. J. Kettle, C. C. Winterbourn // *Redox Rep.* – 1997. – Vol. 3(1). – P. 3–15.
- Hawkins, C. L. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins / C. L. Hawkins, D. I. Pattison, M. J. Davies // *Amino Acids.* – 2003. – Vol. 25(3–4). – P. 259–274.
- Reactive chlorinating species produced during neutrophil activation target tissue plasmalogens: Production of the chemoattractant, 2-chlorohexadecanal / A. K. Thukkani [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277(6). – P. 3842–3849.
- Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // *Scand. J. Immunol.* – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.

11. Kavalenka, A. I. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro / A. I. Kavalenka, G. N. Semenkova, S. N. Cherenkevich // *Cell Tissue Biol.* – 2007. – Vol. 1. – P. 551–559.
12. Shugar, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme / D. Shugar // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1952. – Vol. 8. – P. 302–309.
13. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples / B. Pulli [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8(7): e67976.
14. Roshchupkin, D. Luminol-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants directly responsible for luminol oxidation / D. Roshchupkin, N.S. Belakina, M.A. Murina // *Biofizika.* – 2006. – Vol. 51(1). – P. 99–107.
15. Третьякова, И.Е. Секреторные продукты нейтрофилов крови доноров / И.Е. Третьякова, А.Л. Цуцьева, В.А. Гадиева // *Вестник новых медицинских технологий.* – 2015. – № 3. – С. 1–5.
16. Кравцов, А.Л. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых протеаз и протеолитически активированных рецепторов / А.Л. Кравцов, Т.П. Шмелькова // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2011. – №1 (56). – С. 79–87.
- 5 Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 2000 Jul;109(1):33-44. DOI: 10.1016/s0002-9343(00)00481-2.
- 6 Arnhold J. The dual role of myeloperoxidase in immune response. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 Oct 29;21(21):8057. DOI: 10.3390/ijms21218057.
- 7 Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant product. *Redox Rep.* 1997 Dec;3(1):3–15. DOI: 10.1080/13510002.1997.11747085.
- 8 Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):259-74. DOI: 10.1007/s00726-003-0016-x.
- 9 Thukkani AK, Hsu FF, Crowley JR, Wysolmerski RB, Albert CJ, Ford DA. Reactive chlorinating species produced during neutrophil activation target tissue plasmalogens: Production of the chemoattractant, 2-chlorohexadecanal. *J. Biol. Chem.* 2002 Feb 8;277(6):3842–3849. DOI:10.1074/jbc.M109489200.
- 10 Böyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* 1976 Jun; 5:9-15.
- 11 Kavalenka AI, Semenkova GN, Cherenkevich SN. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro. *Cell. Tissue Biol.* 2007 Dec;1:551–559. DOI: 10.1134/S1990519X07060120.
- 12 Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1952;8:302–309. DOI: 10.1016/0006-3002(52)90045-0.
- 13 Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KLC, Wojtkiewicz G, Linnoila JJ, Chen JW. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS ONE.* 2013 Jul 5;8(7):e67976. DOI:10.1371/journal.pone.0067976.
- 14 Roshchupkin D, Belakina NS, Murina MA. Luminol-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants directly responsible for luminol oxidation. *Biofizika.* 2006 Jan-Feb;51(1):99-107.
- 15 Третьякова ИЕ, Цуцьева АЛ, Гадиева ВА. Секреторные продукты нейтрофилов крови доноров. *Vestnik novykh medicinskih tehnologij.* 2015; 3:1–5.
- 16 Kravcov AL, Shmel'kova TP. Sekretornaja degranulacija nejtrofilov kak trigger vospalenija i reguljator immunnogo otveta: rol' serinovyh proteaz i proteoliticheski aktiviruemyh receptorov. *Jepidemiologija i vakcinoprofilaktika.* 2011;1 (56):79-87.

### References

- 1 Rafikova O, Ghouleh IAI, Rafikov R. Focus on early events: pathogenesis of pulmonary arterial hypertension development. *Antioxid Redox Signal.* 2019 Nov 1;31(13):933–953. DOI: 10.1089/ars.2018.7673.
- 2 Padrez Y, Golubewa L, Kulahava T, Vladimirskaia T, Semenkova G, Adzerikho I, Yatsevich O, Amaegberi N, Karpicz R, Svirko Y, Kuzhir P, Rutkauskas D. Quantitative and qualitative analysis of pulmonary arterial hypertension fibrosis using wide-field second harmonic generation microscopy. *Sci. Rep.* 2022 May 5;12(1):7330. DOI: 10.1038/s41598-022-11473-5.
- 3 Adzerikho I, Yatsevich O, Vladimirskaia T, Semenkova G, Amaegberi N. The inflammation influence on pathological remodeling of pulmonary arteries in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur. Heart J.* 2021 Oct. 14; 42(Suppl 1):1962. DOI:10.1093/eurheartj/ehab724.1962.
- 4 Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Na. Rev. Immunol.* 2013 Mar;13(3):159-75. DOI: 10.1038/nri3399.

## FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH PULMONARY HYPERTENSION

G. N. Semenkova<sup>1</sup>, I. E. Adzerikho<sup>2,3</sup>, N. V. Amaegberi<sup>1</sup>, A. M. Serebro<sup>3</sup>, S. F. Motolko<sup>4</sup>,  
T. E. Vladimirskaia<sup>2</sup>, I. A. Novitskiy<sup>1</sup>, A. V. Shulhanova<sup>1</sup>, D. V. Tikhinskaya<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus;

<sup>3</sup>Minsk regional Clinical hospital, ag. Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus;

<sup>4</sup>2nd City Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus

**Introduction.** Pulmonary hypertension is a clinical syndrome with a poor prognosis. This disease is associated with endothelium dysfunction or damage, which leads to vascular remodeling, increased vascular resistance and blood pressure in the pulmonary artery. It is known that the development of pulmonary hypertension is accompanied by inflammation, the cause of which may be the neutrophils activation and oxidative stress induction.

**Objective** – to analyze the ability of neutrophils in the circulating blood of patients with pulmonary hypertension to generate reactive oxygen and chlorine species, as well as to secrete myeloperoxidase into the extracellular environment.

**Materials and methods.** Histopaque-1077, luminol, *Micrococcus lysodeikticus*, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Earl's balanced buffered saline solution, phosphate buffered saline. Chemiluminescence, spectrophotometry.

**Results.** In patients with pulmonary hypertension, neutrophils are already preactivated in the circulating blood, which is expressed in a change in the ability of cells to generate reactive oxygen and chlorine species, as well as an increase in the processes of secretory degranulation, accompanied by an elevation of the lysozyme and myeloperoxidase release into the extracellular environment.

**Conclusions.** Increased myeloperoxidase secretion from cells suggests that this enzyme is an important biomarker of inflammation in pulmonary hypertension. On the other hand, myeloperoxidase can be considered as a therapeutic target for inflammatory process suppression in the treatment of patients with this pathology.

**Keywords:** pulmonary hypertension, neutrophils, reactive oxygen and chlorine species, secretory degranulation, lysozyme, myeloperoxidase.

**For citation:** Semenkova GN, Adzerikho IE, Amaegberi NV, Serebro AM, Motolko SF, Vladimirskaja TE, Novitskiy IA, Shulhanova AV, Tikhinskaya DV. Functional activity of neutrophils in patients with pulmonary hypertension. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 25, no. 1(2). pp. 13–18 (in Russia).

*Поступила 18.10.2022*

## ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ: СВЯЗЬ С ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТОЙ И МАССОЙ ВИСЦЕРАЛЬНОГО ЖИРА У КРЫС-САМЦОВ ПОРОДЫ ВИСТАР

*Т. А. Митюкова, А. А. Басалай, Е. Н. Чудиловская, О. Е. Полулях,  
Н. С. Костюченко, Ю. А. Рудниченко*

*Государственное научное учреждение «Институт физиологии  
Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь*

**Введение.** Саркопения при ожирении является одним из патологических последствий избыточного питания, однако характерные особенности данного состояния недостаточно изучены.

**Цель исследования** – изучить основные метаболические характеристики сыворотки крови и скелетных мышц при высококалорийной диете, а также их особенности в зависимости от накопления массы висцерального жира у крыс самцов породы Вистар.

**Материалы и методы.** Опыты проводились на половозрелых крысах-самцах породы Вистар и включали группу контроля, получавшую стандартный рацион вивария, и группу высококалорийного питания. Оценивали массу тела, висцерального жира, печени и трехглавой мышцы голени. В сыворотке крови и мышечной ткани определяли рутинные биохимические показатели, а также содержание интерлейкина-6 (ИЛ-6) в мышцах.

**Результаты.** Высококалорийная 16-недельная диета приводит к достоверному нарастанию массы висцерального жира и массы печени, а также к снижению массы трехглавой мышцы голени у крыс-самцов породы Вистар. Избыточное питание вызывает признаки метаболического синдрома, нарастание концентрации общего белка, холестерина, энергетических субстратов – глюкозы и лактата, а также активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) наряду со снижением содержания ИЛ-6 в мышечной ткани.

**Заключение.** Совокупность полученных данных свидетельствует о важной роли такого показателя, как масса висцерального жира, который вносит существенный вклад в метаболические сдвиги, характерные для избыточного питания, ожирения и саркопении.

**Ключевые слова:** крысы-самцы, высококалорийная диета, висцеральное ожирение, саркопения, особенности метаболизма скелетных мышц.

**Для цитирования.** Особенности метаболизма мышечной ткани: связь с высококалорийной диетой и массой висцерального жира у крыс-самцов породы Вистар / Т. А. Митюкова [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 19–25.

### Введение

Известно, что ожирение является фактором риска развития метаболического синдрома, сахарного диабета второго типа, артериальной гипертензии, атеросклероза, неалкогольной жировой болезни печени и других заболеваний. Информация ВОЗ за 2016 год свидетельствует о том, что у 39 % взрослого населения планеты обнаруживается избыточный вес тела, а у 13 % – ожирение [1]. Не вызывает сомнений, что избыточное несбалансированное питание и низкая физическая активность являются основными причинами ожирения и его последствий в современном мире [2, 3]. Ожирение возникает в результате увеличения потребления пищи и/или снижения энергетических затрат. При этом объем висцеральной жировой ткани увеличивается непропорционально и преобладает над накоплением подкожной жировой ткани [3]. Предполагается, что именно накопление висцеральной

жировой ткани связано с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, тяжелой неалкогольной жировой болезнью печени, а также с саркопенией. Показано, что ожирение сопровождается гипертрофией и гиперплазией клеток жировой ткани (адипоцитов), а гипертрофированные адипоциты являются причиной неблагоприятных метаболических сдвигов, таких как резистентность к инсулину и дислипидемия. При этом жирные кислоты накапливаются не только в адипоцитах, но также поступают в печень и другие периферические ткани. Эти многочисленные пути перекрестных влияний между жировой тканью, печенью и другими тканями способствуют развитию и прогрессированию различных заболеваний, включая саркопению [3].

Цель исследования – изучить основные метаболические характеристики сыворотки крови и скелетных мышц при высококалорийной диете, а так-

же их особенности в зависимости от накопления массы висцерального жира у крыс самцов породы Вистар.

### Материалы и методы

Опыты проводились на половозрелых крысах-самцах породы Вистар. Животные были введены в эксперимент в возрасте двух месяцев с массой тела 180–200 г и разделены на две группы: 1) СтД (контроль) – стандартный рацион вивария ( $n = 13$ ) в течение 16 недель; 2) ВКД – высококалорийная диета ( $n = 14$ ) в течение 16 недель. Возраст крыс на срок выведения из эксперимента составил 6 месяцев.

Животные находились в режиме 12/12-часового цикла день/ночь при температуре  $+22(\pm 2)^\circ\text{C}$  и влажности воздуха 60–65 %. Все манипуляции были согласованы с комитетом по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 22 января 2021 г.) и соответствовали требованиям биоэтики, утвержденным Европейской конвенцией о защите позвоночных животных. Выведение животных из эксперимента осуществлялось с использованием наркотизирующего средства тиопентала натрия методом декапитации.

**Диета.** Высококалорийная диета (ВКД) состояла из дополнительного включения жиров животного происхождения (свиное сало) к стандартному рациону питания животных из расчета 45 % от суточной калорийности корма и замещения воды на 10%-й раствор фруктозы *ad libitum* [4].

**Оценка массы тела и органов.** Массу тела крыс еженедельно измеряли на весах SATURN (Китай). После выведения из эксперимента проводилась диссекция и взвешивание висцеральной жировой ткани, печени и трехглавой мышцы голени на лабораторных весах (Scout Pro, Китай). Рассчитывали массовый коэффициент висцерального жира, печени и трехглавой мышцы голени по формуле: массовый коэффициент (МК) = (масса органа / масса тела) · 100 %.

**Биохимические методы исследования.** Биохимические показатели в сыворотке крови и гомогенатах мышечной ткани крыс (общий белок, мочевины, креатинин, холестерол, триглицериды, глюкоза, общий билирубин, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаргатаминотрансфераза (АСТ), амилаза, креатинкиназа, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), щелочная фосфатаза) определяли общепринятыми методами на биохимическом автоматическом анализаторе BS-200 (Mindray, Китай) с программным обеспечением BS-330 и использованием коммерческих наборов Диасенс (Республика Беларусь). В гомогенатах мышечной ткани определяли содержание лактата с использованием наборов «ЛАК-

ТАТ-ВИТАЛ» (Россия) и интерлейкина-6 (ИЛ-6) с использованием набора Rat IL-6 ELISA Set (BD Biosciences, США).

**Статистические методы исследования.** Статистическую обработку данных проводили с учетом нормальности распределения по критерию Шапиро-Уилка. Применяли параметрические либо непараметрические методы, а результаты выражали, соответственно, в виде средней величины и стандартной ошибки средней ( $M \pm SEM$ ), либо в виде медианы и процентилей ( $Me [25; 75]$ ). Сравнение между группами проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента, либо  $U$ -критерия Манна-Уитни соответственно. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Отличия между группами считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$  (Statistica 10.0).

### Результаты и их обсуждение

Как видно из данных таблицы 1, у крыс, получавших ВКД, отмечалась незначительная тенденция к нарастанию массы тела и достоверное увеличение массы висцерального жира, превосходящее контроль почти в 3 раза.

Крысы контрольной группы в возрасте 6 месяцев имели массу тела в среднем  $433,46(\pm 13,42)$  г, а массу висцерального жира –  $7,99(\pm 0,73)$  г. Крысы группы ВКД имели сходную массу тела – в среднем  $471,14(\pm 25,15)$  г, но при этом отличались большими колебаниями по накоплению висцерального жира, выходящими за пределы 12–36 г (интервал – 25–75 процентилей). Учитывая эти существенные индивидуальные отличия, представило интерес оценить массовые и метаболические характеристики в зависимости от степени накопления висцерального жира у крыс группы ВКД. Исходя из этого, животные группы ВКД были разделены на две примерно равноценные по количеству подгруппы с умеренным либо высоким накоплением висцерального жира (менее или более 15 г). При минимальной массе висцерального жира ( $< 15$  г) общая масса тела крыс группы ВКД была достоверно меньше, чем у таковых с максимальным накоплением висцерального жира (см. таблицу 1).

При визуальной оценке состояния внутренних органов было обнаружено, что у животных группы ВКД печень имеет дряблую консистенцию, желтый цвет поверхности и на разрезе ткани. Масса и массовый коэффициент печени в группе ВКД были достоверно выше контроля. Описанные признаки характерны для жирового перерождения печени, что подтверждается нашими морфологическими исследованиями [5]. Интересно, что масса печени достоверно увеличивалась только при мак-

Таблица 1 – Характеристики массы тела и висцеральной жировой ткани, массы и массовых коэффициентов (МК) печени и трехглавой мышцы голени у крыс экспериментальных групп и в зависимости от массы висцерального жира при высококалорийной диете (M ± SEM)

Table 1 – Characteristics of body weight and visceral adipose tissue, weight and mass coefficients (MC) of the liver and musculus triceps surae in rats of the experimental groups and depending on the mass of visceral fat in a high-calorie diet (M ± SEM)

Показатель	Группа СтД, n = 13	Группа ВКД, n = 14	Масса висцерального жира при ВКД, г	
			<15, n = 6	>15, n = 8
Масса тела, г	433,46 ± 13,42	471,14 ± 25,15	377,17 ± 12,72*^	541,63 ± 17,70*#
Масса висцеральной жировой ткани, г	7,99 ± 0,73	22,99 ± 3,20*	12,46 ± 0,73*^	30,89 ± 3,49*#
Масса печени, г	13,91 ± 0,63	18,09 ± 1,17*	14,94 ± 1,49	20,45 ± 1,20*#
МК печени, %	3,21 ± 0,12	3,88 ± 0,22*	3,98 ± 0,40*	3,81 ± 0,26*
Масса трехглавой мышцы голени, г	2,64 ± 0,09	2,34 ± 0,09*	2,14 ± 0,12*	2,49 ± 0,11
МК трехглавой мышцы голени, %	0,61 ± 0,01	0,51 ± 0,02*	0,57 ± 0,02	0,46 ± 0,02*#

Примечание: достоверные отличия при  $p \leq 0,05$ : \* – от группы СтД, ^ – от группы ВКД, # – от группы ВКД при массе висцерального жира <15 г.

Note: significant differences at  $p \leq 0,05$ : \* – from the StD group, ^ – from the HCD group, # – from the HCD group with a mass of visceral fat <15 g.

симальном накоплении висцерального жира, а массовый коэффициент органа – независимо от степени нарастания такового (см. таблицу 1).

Достоверное снижение массы трехглавой мышцы голени было отмечено в общей группе ВКД и при минимальной массе висцерального жира, причем у животных этой подгруппы масса тела была достоверно снижена по сравнению с контролем. Массовый коэффициент мышечной ткани снижался в общей группе ВКД и при максимальном количестве висцеральной жировой ткани (см. таблицу 1). В работах X. Nan et al. [6] и Y. Kemmochi et al. [7] было показано, что саркопения при висцеральном ожирении сопровождается истощением силы мышц и обусловлена резистентностью к инсулину.

Для оценки функционального состояния печени и других органов было проведено изучение ряда биохимических показателей сыворотки крови (таблица 2). Как видно из представленных данных, при ВКД отмечалось достоверное нарастание уровней холестерина и глюкозы в сыворотке крови вне зависимости от массы висцерального жира. Содержание триглицеридов и билирубина значимо повышалось в группе ВКД, преимущественно при массе висцерального жира более 15 г. Вышеописанные сдвиги характерны для нарушений печеночного метаболизма при метаболическом синдроме и преимущественно связаны с жировым перерождением органа. Снижение активности АСТ в сыворотке крови при ВКД и в группе с максимальным накоплением висцерального жира может объясняться гибелью гепатоцитов при жировом перерождении печени [5, 8].

Нарастание активности амилазы в сыворотке крови при ВКД вне зависимости от массы висце-

рального жира может свидетельствовать о ее роли в переваривании углеводов, которые в избыточном количестве содержатся в высококалорийном рационе в виде раствора фруктозы. Следует учитывать, что повышение активности амилазы в крови характерно для различных патологических состояний, включая поражение слюнных желез, хроническую почечную недостаточность, панкреатит и др., и поэтому не поддается однозначной интерпретации [8].

Фермент щелочная фосфатаза присутствует не только в ткани печени, но также участвует в транспорте фосфора и в других тканях. Однако существенное повышение ее активности может быть связано с обструкцией желчных протоков при жировом перерождении печени, когда масса висцерального жира достигает максимальных величин [8].

Информацию о белковом обмене в организме могут дать такие показатели, как мочевины и трансаминазы сыворотки крови. Мочевина – конечный продукт обмена белков в организме, образуется преимущественно в печени. Снижение уровня мочевины в крови, отмеченное нами у крыс группы ВКД независимо от массы висцерального жира, характерно для печеночной недостаточности, гепатита и цирроза печени [8]. Фермент АСТ – трансаминаза, участвует в обмене белков не только в печени, но и в других тканях. Интересно, что оба эти показателя значимо снижаются при диет-индуцированном висцеральном ожирении. Однако, для того чтобы судить об анаболических процессах в организме, целесообразно обратиться к биохимическим показателям мышечной ткани (таблица 3).

Таблица 2 – Биохимические показатели сыворотки крови у крыс экспериментальных групп и в зависимости от массы висцерального жира при высококалорийной диете (Ме [25; 75])

Table 2 – Biochemical parameters of blood serum in rats of the experimental groups and depending on the mass of visceral fat in a high-calorie diet (Me [25; 75])

Показатель	Группа СтД, <i>n</i> = 13	Группа ВКД, <i>n</i> = 14	Масса висцерального жира при ВКД, г	
			<15, <i>n</i> = 6	>15, <i>n</i> = 8
Общий белок, г/л	67,00 [65,00; 70,00]	65,50 [59,00; 69,00]	67,50 [57,00; 73,00]	64,50 [59,00; 66,50]
Холестерол, ммоль/л	1,43 [1,23; 1,61]	1,88* [1,50; 1,95]	1,81* [1,54; 2,34]	1,88* [1,50; 1,93]
Триглицериды, ммоль/л	0,88 [0,63; 1,18]	1,18* [0,94; 2,21]	0,95 [0,88; 1,04]	1,79* [1,18; 1,33]
Глюкоза, ммоль/л	5,81 [5,61; 7,37]	7,54* [7,10; 8,21]	7,44* [7,01; 8,21]	7,72* [7,24; 8,14]
Общий билирубин, ммоль/л	1,40 [1,20; 1,60]	2,40* [1,60; 3,00]	1,95 [1,20; 2,40]	2,60* [2,05; 3,35]
АСТ, Е/л	196,00 [181,00; 217,00]	172,00* [146,00; 189,00]	173,50 [163,00; 189,00]	172,00* [145,00; 195,00]
АЛТ, Е/л	65,00 [62,00; 74,00]	57,50 [51,00; 68,00]	55,00 [47,00; 68,00]	63,50 [52,50; 73,00]
Амилаза, Е/л · 10 <sup>-3</sup>	1,51 [1,43; 1,71]	1,94* [1,79; 2,12]	1,88* [1,62; 2,02]	2,02* [1,82; 2,17]
Мочевина, ммоль/л	6,83 [6,45; 8,14]	4,35* [3,45; 4,77]	4,35* [4,11; 5,69]	4,03* [3,28; 4,62]
Креатинин, ммоль/л	47,00 [42,00; 52,00]	45,50 [42,00; 48,00]	46,00 [42,00; 48,00]	45,00 [41,50; 50,00]
Креатинкиназа, Е/л · 10 <sup>-3</sup>	2,48 [2,35; 3,81]	2,72 [2,22; 3,12]	3,05 [2,95; 3,89]	2,26 [1,63; 2,80]
ЛДГ, Е/л · 10 <sup>-3</sup>	3,80 [3,12; 4,26]	3,69 [2,69; 3,88]	3,69 [2,84; 4,11]	3,34 [2,04; 3,86]
Щелочная фосфатаза, Е/л	373,00 [333,00; 423,00]	674,50* [371,00; 850,00]	433,00 [312,00; 685,00]	804,50*# [635,50; 876,50]

Примечание: достоверные отличия при  $p \leq 0,05$ : \* – от группы СтД, # – от группы ВКД при массе висцерального жира <15 г.  
Note: significant differences at  $p \leq 0,05$ : \* – from the StD group, # – from the HCD group with a mass of visceral fat <15 g.

Таблица 3 – Биохимические показатели трехглавой мышцы голени у крыс экспериментальных групп и в зависимости от массы висцерального жира при высококалорийной диете (Ме [25; 75])

Table 3 – Biochemical parameters of the musculus triceps surae in rats of the experimental groups and depending on the mass of visceral fat in a high-calorie diet (Me [25; 75])

Показатель	Группа СтД, <i>n</i> = 13	Группа ВКД, <i>n</i> = 14	Масса висцерального жира при ВКД, г	
			<15, <i>n</i> = 6	>15, <i>n</i> = 8
Общий белок, г/г ткани	46,20 [41,00; 48,60]	51,10* [47,40; 53,80]	48,35 [45,60; 53,10]	53,55* [48,25; 54,00]
Холестерол, ммоль/г ткани	1,00 [0,90; 1,10]	1,10* [1,00; 1,20]	1,05 [1,00; 1,20]	1,15* [1,10; 1,20]
Глюкоза, ммоль/г ткани	1,70 [1,60; 2,00]	2,30* [1,90; 2,50]	2,25* [1,90; 2,60]	2,30* [1,90; 2,45]
Триглицериды, ммоль/г ткани	12,90 [9,30; 17,70]	14,95 [13,30; 16,10]	13,75 [10,40; 16,10]	14,95 [13,60; 16,45]
Лактат, ммоль/г ткани	30,49 [26,62; 33,80]	38,94* [34,67; 48,02]	44,74* [33,17; 51,97]	37,95* [35,78; 42,73]
ЛДГ, Е/г ткани · 10 <sup>-3</sup>	619,00 [584,00; 688,00]	808,50* [748,00; 922,00]	784,50* [748,00; 804,00]	864,00* [757,50; 1036,50]
Креатинкиназа, Е/г ткани · 10 <sup>-3</sup>	7,80 [6,19; 8,72]	7,89 [7,39; 8,77]	7,89 [6,90; 8,44]	7,89 [7,63; 9,59]

Примечание: достоверные отличия при  $p \leq 0,05$ : \* – от группы СтД.  
Note: significant differences at  $p \leq 0,05$ : \* – from the StD group.



Как известно, ожирение тесно связано с саркопенией. Это наблюдение подтверждается также и в нашем эксперименте при диет-индуцированном ожирении у крыс-самцов породы Вистар. Как видно из таблицы 3, у крыс группы ВКД и в подгруппе с максимальным нарастанием висцерального жира в мышечной ткани регистрировалось достоверное нарастание концентрации общего белка. Увеличение уровней холестерина, глюкозы и лактата свидетельствует о повышенном поступлении/образовании энергетических субстратов на фоне ожирения в мышечной ткани. Это подтверждается также значимым нарастанием активности ЛДГ в расчете на грамм ткани в трехглавой мышце голени. Следует отметить, что полученные нами данные согласуются с исследованиями других авторов [6, 7], утверждающих, что саркопения при ожирении характеризуется активацией гликогенолиза и глюконеогенеза, но эти метаболические сдвиги сопровождаются снижением синтеза гликогена, т. е. наблюдается дисрегуляция метаболических процессов в мышечной ткани.

Определение содержания ИЛ-6 в скелетных мышцах при избыточном высококалорийном питании крыс самцов показало достоверное снижение показателя в общей группе ВКД и при максимальном накоплении висцерального жира по сравнению с контролем (рисунок 1). Корреляционный анализ выявил достоверную отрицательную связь между массой висцерального жира и содержанием ИЛ-6 в мышечной ткани ( $r = -0,41$ ).

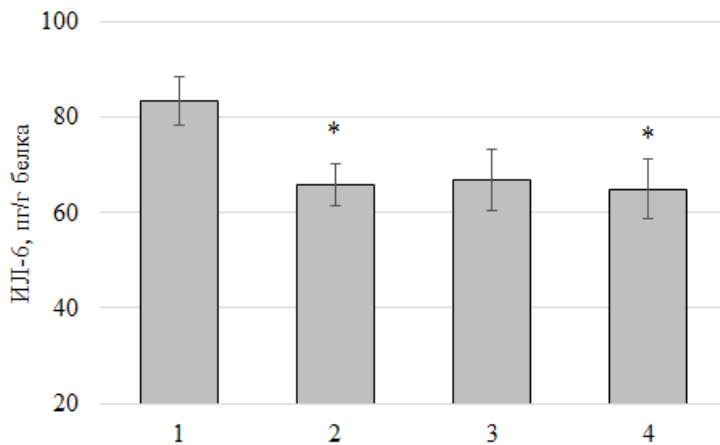


Рисунок 1 – Содержание интерлейкина-6 (ИЛ-6) в трехглавой мышце голени у крыс экспериментальных групп и в зависимости от массы висцерального жира при высококалорийной диете (ВКД): 1 – группа СтД; 2 – группа ВКД; 3 – группа ВКД при массе висцерального жира <15 г; 4 – группа ВКД при массе висцерального жира >15 г. Достоверные отличия при  $p \leq 0,05$ : \* – от группы СтД

Figure 1 – Interleukin-6 (IL-6) in musculus triceps surae in rats of the experimental groups and depending on visceral fat mass in high-calorie diet (HCD): 1 – StD group; 2 – HCD group; 3 – HCD group with a mass of visceral fat <15 g; 4 – HCD group with a mass of visceral fat >15 g. Significant differences at  $p \leq 0,05$ : \* – from StD group

Масса висцеральной жировой ткани также достоверно коррелировала с массой печени ( $r = 0,60$ ), содержанием холестерина ( $r = 0,50$ ), глюкозы ( $r = 0,39$ ) и активностью ЛДГ ( $r = 0,44$ ) в мышечной ткани. Масса мышечной ткани давала достоверную отрицательную корреляцию с активностью ЛДГ ( $r = -0,52$ ). Эти корреляционные зависимости согласуются с вышеизложенными данными.

Наиболее интригующим является вопрос о связи ИЛ-6 с метаболическими процессами в мышечной ткани. Оказывается, что наряду с провоспалительными эффектами при различных патологических процессах и инфекционных заболеваниях ИЛ-6 играет важную роль в регуляции метаболизма в норме. Полезные эффекты ИЛ-6 включают мобилизацию энергии, необходимой для активной работы мышц при физических нагрузках [9–11]. ИЛ-6, образующийся в мышцах при физических упражнениях, был причислен к группе миокинов. Показано, что он оказывает системное воздействие на весь организм, индуцируя липолиз в жировой ткани, поступление глюкозы в мозг и в другие органы и ткани, индуцируя адаптивное ремоделирование сосудов при физических нагрузках. Внутриклеточные механизмы влияния ИЛ-6 в норме включают каскад STAT3, участвующий в активации метаболических процессов, таких как поглощение глюкозы тканями, липолиз и др. [9–11]. Литературные данные свидетельствуют о том, что саркопения при ожирении характеризуется дисрегуляцией обменных процессов в мышечной ткани,

что может быть обусловлено понижающей регуляцией при сниженных уровнях ИЛ-6 [12].

### Заключение

Высококалорийная 16-недельная диета приводит к достоверному нарастанию массы висцерального жира и массы печени, а также к снижению массы трехглавой мышцы голени, что сопровождается соответствующими сдвигами массовых коэффициентов этих органов у крыс-самцов породы Вистар.

Избыточное питание вызывает повышение уровней холестерина, триглицеридов, общего билирубина, глюкозы, активности амилазы и щелочной фосфатазы, а также снижение уровня мочевины и активности АСТ в сыворотке крови, что, как правило, наиболее выражено при максимальном накоплении висцерального жира и может быть свя-

зано с нарушениями функции печени и поджелудочной железы.

При висцеральном ожирении у крыс отмечается нарастание концентрации общего белка, холестерина, энергетических субстратов – глюкозы и лактата, а также активности ЛДГ в трехглавой мышце голени.

Саркопения при ожирении сопровождается снижением удельного содержания ИЛ-6 в мышеч-

ной ткани, что коррелирует с накоплением висцерального жира и дисрегуляцией метаболизма в мышечной ткани.

Совокупность полученных данных свидетельствует о важной роли такого показателя, как масса висцерального жира, который вносит существенный вклад в метаболические сдвиги, характерные для избыточного питания, ожирения и саркопении.

#### Список цитированных источников

1. Obesity and overweight. World Health Organization [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. – Date of access: 02.08.2022.
2. Sarwar, R. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: current perspectives / R. Sarwar, N. Pierce, S. Koppe // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* – 2018. – Vol. 11. – P. 533–542.
3. Parker, R. The role of adipose tissue in fatty liver diseases / R. Parker // *Liver Res.* – 2018. – Vol. 2, iss. 1. – P. 35–42.
4. Experimental models of metabolic syndrome in rats / S. Gancheva [et al.] // *Scripta Scientifica Medica.* – 2015. – Vol. 47, №2. – P. 14–21.
5. Морфофункциональное состояние печени крыс-самцов линии Вистар при диет-индуцированном ожирении и его коррекции / А. А. Басалай [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2022. – Т. 19, №3. – С. 308–320.
6. Mechanisms involved in follistatin-induced hypertrophy and increased insulin action in skeletal muscle / X. Han [et al.] // *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* – 2019. – Vol. 10, №6. – P. 1241–1257.
7. Pathophysiological analyses of skeletal muscle in obese type 2 diabetes SDT fatty rats / Y. Kemmochi [et al.] // *J. Toxicol. Pathol.* – 2018. – Vol. 31, №2. – P. 113–123.
8. Краткий справочник лабораторных исследований / У. Г. Борейко [и др.]; под ред. В. В. Шило, О. В. Небыльцовой. – Минск: СмэЛТОК, 2016. – 630 с.
9. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? / P. Muñoz-Cánoves [et al.] // *FEBS J.* – 2013. – Vol. 280, iss. 17. – P. 4131–4148.
10. Interleukin-6 signal transduction and its role in hepatic lipid metabolic disorders / W. Hassan [et al.] // *Cytokine.* – 2014. – Vol. 66, iss. 2. – P. 133–142.
11. Role of Interleukin-6 in vascular health and disease / P. Villar-Fincheira [et al.] // *Front Mol Biosci.* – 2021. – Vol. 8. – P. 1–11.
12. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity / K. H. Collins [et al.] // *Front Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1–25.
13. in rats. *Scripta Scientifica Medica.* 2015; 47(2): 14–21. DOI: 10.14748/ssm.v47i2.1145.
5. Basalai AA, Kuznetsova TE, Mityukova TA, Poluliakh OY, Chudilovskaya KN, Kastsiuchenka MS, Shcherbakov YaV, Khrustaleva TA, Hubkin SV. Morfofunkcional'noe sostojanie pecheni krys-samcov linii Vistar pri diet-inducirovannom ozhireanii i ego korrekcii [Morphofunctional state of the liver of male Wistar rats during diet-induced obesity and its correction]. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series].* 2022; 19(3): 308–320. DOI: 10.29235/1814-6023-2022-19-3-308-320 (in Russian).
6. Han X, Møller LLV, De Groot E, Bojsen-Møller KN, Davey J, Henriquez-Olguin C, Li Z, Knudsen JR, Jensen TE, Madsbad S, Gregorevic P, Richter EA, Sylow L. Mechanisms involved in follistatin-induced hypertrophy and increased insulin action in skeletal muscle. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle.* 2019; 10(6): 1241–1257. DOI: 10.1002/jcsm.12474.
7. Kemmochi Y, Ohta T, Motohashi Y, Kaneshige A, Katsumi S, Kakimoto K, Yasui Y, Anagawa-Nakamura A, Toyoda K, Taniai-Riya E, Takahashi A, Shoda T, Yamada T. Pathophysiological analyses of skeletal muscle in obese type 2 diabetes SDT fatty rats. *Journal of toxicologic pathology.* 2018; 31(2): 113–123. DOI: 10.1293/tox.2017-0064.
8. Borejko UG, Glazkova SJe, Efimova NN, Zhdanova OV, Kovaleva OV, Kugaev OL, Lukjanenok DM, Novikova IN, Parhamovich VN, Suvorova IV, Turkovskij GS, Shilo VV, Abasheva SN, Alekseev BM, Artemchuk LV, Barasij LA, Bojko IV, Bol'shaja EP, Borovik OI, Butenko NG, Galickaja VV, Danilova EI, Degtjar LV, Nebyl'cova OV, Klishnja MA. Kratkij spravochnik laboratornyh issledovanij [Brief reference of laboratory research]. Minsk: Smjeltok; 2016. 630 p. (in Russian).
9. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *The FEBS journal.* 2013; 280(17): 4131–4148. DOI: 10.1111/febs.12338.
10. Hassan W, Ding L, Gao RY, Liu J, Shang J. Interleukin-6 signal transduction and its role in hepatic lipid metabolic disorders. *Cytokine.* 2014; 66(2): 133–142. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.12.017.
11. Villar-Fincheira P, Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Hernandez-Vargas F, Troncoso R, Gabrielli L, Chiong M. Role of Interleukin-6 in vascular health and disease. *Frontiers in molecular biosciences.* 2021; 8: 1–11. DOI: 10.3389/fmolb.2021.641734.
12. Collins KH, Herzog W, MacDonald GZ, Reimer RA, Rios JL, Smith IC, Zernicke RF, Hart DA. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity. *Frontiers in physiology.* 2018; 9: 1–25. DOI: 10.3389/fphys.2018.00112.

#### References

1. Obesity and overweight. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed 08.02.2022).
2. Sarwar R, Pierce N, Koppe S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: current perspectives. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy.* 2018; 25(11): 533–542. DOI: 10.2147/DMSO.S146339.
3. Parker R. The role of adipose tissue in fatty liver diseases. *Liver Research.* 2018; 2(1): 35–42. DOI: 10.1016/j.livres.2018.02.002.
4. Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B, Chervenkov T. Experimental models of metabolic syndrome

# PECULIARITIES OF MUSCLE TISSUE METABOLISM: RELATIONSHIP WITH HIGH-CALORIE DIET AND VISCERAL FAT MASS IN MALE WISTAR RATS

---

*T. A. Mityukova, A. A. Basalai, K. N. Chudilovskaya, O. Y. Poluliakh,  
M. S. Kastsyuchenka, Yu. A. Rudnichenko*

*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**Introduction.** Sarcopenia in obesity is one of the pathological consequences of overnutrition, and the characteristic features of this condition are poorly understood.

**Objective** – to investigate the main metabolic characteristics of blood serum and skeletal muscles in a high-calorie diet, as well as their features depending on the accumulation of visceral fat mass in male Wistar rats.

**Materials and methods.** Experiments were conducted on sexually mature male Wistar rats and included a control group that received a standard vivarium diet and a high-calorie diet group. Body weight, visceral fat, liver and triceps muscle of calf were evaluated. Routine biochemical parameters were determined in blood serum and muscle tissue, as well as interleukin-6 (IL-6) content in muscles.

**Results.** A high-calorie 16-week diet leads to a significant increase in visceral fat mass and liver mass, as well as to a decrease in the triceps muscle of calf mass in male Wistar rats. Excessive nutrition causes signs of the metabolic syndrome, an increase in the concentration of total protein, cholesterol, energy substrates – glucose and lactate, and lactate dehydrogenase (LDH) activity along with a decrease in IL-6 content in muscle tissue.

**Conclusions.** The totality of the data obtained indicates the important role of such a parameter as visceral fat mass, which contributes significantly to the metabolic shifts characteristic of overnutrition, obesity, and sarcopenia.

**Keywords:** male rats, high-calorie diet, visceral obesity, sarcopenia, skeletal muscle metabolic features.

**For citation:** Mityukova TA, Basalai AA, Chudilovskaya KN, Poluliakh OY, Kastsyuchenka MS, Rudnichenko YuA. Peculiarities of muscle tissue metabolism: relationship with high-calorie diet and visceral fat mass in male Wistar rats. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 19–25 (in Russia).

*Поступила 29.08.2022*

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПЕРИОДОВ АЛКОГОЛИЗАЦИИ НА ПУЛ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В МИОКАРДЕ КРЫС

*А. К. Семенчук, В. В. Лелевич*

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

**Введение.** Употребление алкоголя приводит к многочисленным морфологическим, биохимическим и функциональным изменениям в миокарде.

**Цель исследования** – изучение влияния хронической и прерывистой алкогольной интоксикации различной длительности на содержание серосодержащих аминокислот и родственных им соединений в миокарде крыс.

**Материалы и методы.** 70 белых беспородных крыс массой 180–220 г. Содержание свободных аминокислот и биогенных аминов определяли методом ВЭЖХ.

**Результаты.** 14-дневная и 28-дневная хроническая алкогольная интоксикация вызвала достоверное снижение уровня метионина в миокарде крыс. ПАИ-4 привела к увеличению содержания β-аланина и таурина при 14-дневной алкоголизации и β-аланина и глутатиона при 28-дневной. При 14-суточной ПАИ-1 уменьшилась концентрация метионина, а при 28-дневной ПАИ-1 снизилось содержание серина, таурина, метионина, но повысилось содержание цистеинсульфиновой кислоты.

**Заключение.** ХАИ и ПАИ на протяжении 28 суток вызывают более выраженные изменения в пуле серосодержащих аминокислот и их метаболитов в миокарде крыс в сравнении с 14-суточной алкоголизацией.

**Ключевые слова:** этанол, прерывистая алкогольная интоксикация, метионин, миокард.

**Для цитирования.** Семенчук, А. К. Влияние различных периодов алкоголизации на пул серосодержащих соединений в миокарде крыс / А. К. Семенчук, В. В. Лелевич // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 26–30.

### Введение

Употребление алкоголя приводит к многочисленным морфологическим, биохимическим и функциональным изменениям в скелетной и сердечной мышцах. Токсическое воздействие этанола на миокард опосредовано разнообразными механизмами, прежде всего прямым токсическим его действием, влиянием метаболита этанола – ацетальдегида (АА) – на кардиомиоциты, сосудистыми нарушениями и связанной с этими процессами гипоксией. Этанол обладает способностью повышать текучесть мембран, изменяя агрегатное состояние липидов в области ионных каналов, вызывая их флюидизацию (разжижение) [1]. В условиях хронического воздействия этанола в мембранах увеличивается содержание холестерина, меняется структура фосфолипидного слоя, в связи с этим разжижение мембран сменяется повышением их ригидности [2]. При этом изменяется способность мембран транспортировать ионы  $Ca^{2+}$ , что является причиной нарушения биоэлектрической активности миокарда. Существует мнение, что первичное воздействие этанола в высоких концентрациях на мембраны кардиомиоцитов приводит к нарушению структуры сарколеммы, увеличивая ее проницаемость для по-

липептидов [3]. Этанол и ацетальдегид усиливают перекисное окисление липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, изменяя их липидный состав и нарушая функцию мембранных ферментов [1]. При этом этанол действует на систему окислительного фосфорилирования митохондрий в результате образования эфиров жирных кислот, что ведет к уменьшению продукции энергии. Этанол путем снижения мощности системы антиоксидантной защиты сердца усиливает перекисные процессы в мембранах, вызывая их повреждение [3].

Одним из изменений, наблюдаемых в миокарде и других мышечных тканях как после острой алкогольной интоксикации, так и при хроническом употреблении алкоголя, является характерное снижение скорости синтеза белка. Причиной этого является, по-видимому, ухудшение трансляционного контроля, модулирование различных аспектов инициации пептидной цепи [1]. Также весьма важное значение в реализации пластических функций, особенно биосинтеза белка и регуляторных пептидов, имеет стабильность фонда свободных аминокислот [4].

Особую группу составляют серосодержащие аминокислоты, значение которых связано, в пер-

вую очередь, с их участием в процессах метилирования большого числа биологически важных молекул, в процессах антиоксидантной защиты организма, а также с ролью отдельных аминокислот, таких как гомоцистеин, в развитии ряда патологических процессов [5].

Большинство исследований, изучающих роль потребления алкоголя в развитии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, упускают из виду возможное влияние характера употребления алкоголя [2, 6]. Хотя легкое или умеренное употребление алкоголя, по-видимому, связано со снижением рисков, вероятность ишемической болезни сердца и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний увеличивается при большем потреблении этанола с периодами воздержания [2]. Механизмы кардиотоксического воздействия алкоголя остаются спорными, и, в частности, пути, усиливающие риск эффектов тяжелого потребления этанола, недостаточно известны. В большинстве этиологических исследований в качестве меры употребления алкоголя использовалось общее количество или предполагаемое среднее потребление алкоголя в единицу времени. Однако привычки употребления алкоголя могут сильно различаться у разных людей и иногда очень нерегулярны. Люди с одним и тем же средним потреблением алкоголя могут сильно различаться: некоторые из них подвергались серьезному эпизодическому воздействию этанола, тогда как другие демонстрируют примерно одинаковое потребление изо дня в день [6]. В связи с этим отдельный интерес представляет более подробное исследование биохимических изменений в миокарде при прерывистом приеме алкоголя.

### Материалы и методы

В эксперименте было использовано 70 белых беспородных крыс-самцов массой 180–220 г, находящихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. Моделирование хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) осуществлялось путем внутрижелудочного введения этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела два раза в сутки в виде 25%-го раствора.

Прерывистая алкогольная интоксикация (ПАИ) моделировалась путем внутрижелудочного введения этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела два раза в сутки в виде 25%-го раствора по следующим схемам: 4 суток алкоголизации – 3 суток внутрижелудочное введение эквивалентного количества воды (ПАИ-4) и 1 сутки алкоголизации – 1 сутки внутрижелудочное введение эквивалентного количества воды (ПАИ-1). Животные контрольной группы внутрижелудочно дважды в сутки получали эквивалентные количества воды [3]. Продолжи-

тельность экспериментов составляла 14 и 28 суток. Декапитацию проводили через 1 ч после последнего введения алкоголя и воды. При выполнении исследований придерживались правил и норм гуманного обращения с экспериментальными животными.

Содержание свободных аминокислот в пробах определяли после осаждения белков. Образец гомогенизировали в 10 объемах 0,2 М раствора хлорной кислоты, содержащем 0,2 мМ норвалина (nVal), 1 мкМ ванилиновой кислоты, а также 50 мг/л ЭДТА, 50 мг/л метабисульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ). Пробы центрифугировали при +4 °С в течение 15 мин при 16 000 g, после чего супернатант немедленно отсасывали и хранили до исследования при –18 °С. Полученные хлорнокислые экстракты использовали для анализа. Растворы стандартов, используемые для калибровки хроматографической системы, обрабатывали аналогичным способом. Содержание свободных аминокислот определяли методом обращенно-фазной ВЭЖХ после дериватизации о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с детектированием по флуоресценции (338/455 нм). Обработка хроматограмм осуществлялась по методу внутреннего стандарта (норвалин).

Для определения нормальности распределения в выборке использовался критерий Колмогорова–Смирнова. Так как распределение отличается от нормального, статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрических методов. Результаты выражали в виде медианы (Me) и рассеяния (25 и 75 перцентилей). Для сравнения двух независимых выборок по количественным признакам использовали *U*-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . В качестве дополнительного метода статистической обработки использовали корреляционный анализ по Спирмену. При этом использовали пакет статистических программ Statistica 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q).

### Результаты и их обсуждение

14-дневная хроническая алкогольная интоксикация вызвала достоверное снижение уровня незаменимой аминокислоты метионина (на 23 %;  $p < 0,05$ ) и повышение уровня β-аланина (на 12 %;  $p < 0,05$ ) в миокарде крыс (таблица 1). Несмотря на то что концентрации остальных определяемых показателей не изменялась, корреляционный анализ свидетельствовал о возникновении изменений в структуре пула серосодержащих аминокислот: нарушились нормальные корреляционные связи между большинством серосодержащих соединений.

При 14-дневной алкогольной интоксикации в режиме ПАИ-4 достоверно повысилось содержание β-аланина (на 23 %;  $p < 0,05$ ) и таурина (на 13 %;  $p < 0,05$ ). Концентрация метионина при этом имела тенденцию к снижению. Корреляционный анализ показал сходное с группой ХАИ нарушение корреляционных взаимосвязей между рассчитываемыми параметрами серосодержащих соединений.

Алкоголизация в режиме ПАИ-1 в течение 14 дней привела к достоверному снижению только уровня метионина (на 27 %;  $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем. Содержание β-аланина снизилось по сравнению с группой ХАИ (на 21 %;  $p < 0,05$ ) и не отличалось достоверно от контрольных значений. При этом нарушение нормальных корреляционных связей сопровождалось возникновением новых корреляций между уровнями цистеинсульфиновой кислоты и серина ( $r = -0,95$ ,  $p < 0,05$ ), цистеинсульфиновой кислоты и цистатионина ( $r = 0,80$ ,  $p < 0,05$ ), цистатионина и серина ( $r = -0,86$ ,  $p < 0,05$ ).

При 28-дневном хроническом употреблении алкоголя в миокарде достоверно снизилось содержание метионина (на 24 %;  $p < 0,05$ ) (таблица 2). Это изменение сходно с эффектом 14-суточной алкогольной интоксикации и может свидетельствовать как об обеднении пула незаменимых аминокислот, так и об однонаправленном влиянии ХАИ разной длительности.

Кроме того, при 28-дневной ХАИ наблюдалось уменьшение концентрации цистатионина (на 25 %;  $p < 0,05$ ) и цистеинсульфиновой кислоты (на 30 %;  $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать о снижении активности процесса транссульфурирования гомо-

цистеина. Корреляционный анализ показателей данной группы выявил сохранение положительной корреляции между уровнями глутатиона и глицина, но нарушение корреляционных связей цистатионин–серин, цистатионин–глицин, цистатионин–метионин по сравнению с контролем, что косвенно также может свидетельствовать о нарушении цистатионин-β-синтазной реакции, но при этом уровень глутатиона вырос на 11 % ( $p < 0,05$ ).

Прерывистое 28-дневное потребление алкоголя в режиме ПАИ-4 привело к достоверному повышению содержания β-аланина (на 29 %;  $p < 0,05$ ) и глутатиона (на 13 %;  $p < 0,05$ ). Уровни метионина и глицина, а так же β-аланина и ансерина коррелировали между собой, как и в контрольной группе, но не наблюдались другие корреляционные связи, характерные для контроля.

Употребление этанола в режиме ПАИ-1 на протяжении 28 дней вызвало достоверное снижение концентрации метионина (на 30 %;  $p < 0,05$ ). Схожие изменения наблюдались и в группе ПАИ-1 при 14-суточной алкоголизации, и при ХАИ различной длительности. Помимо этого, при 28-суточной ПАИ-1 понизилась концентрация таурина (на 14 %;  $p < 0,05$ ), но возросло содержание цистеинсульфиновой кислоты в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать о снижении скорости образования таурина. Также в группе ПАИ-1 с 28-дневной алкоголизацией уменьшилось содержание серина (на 15 %;  $p < 0,05$ ). Корреляционный анализ показал сохранение положительной корреляции метионин–глицин, но нарушение всех корреляционных взаимосвязей цистатионина по отношению к контролю.

Таблица 1 – Содержание серосодержащих и родственных им соединений в тканях сердца крыс при различных формах 14-суточной алкогольной интоксикации (нмоль/г) (Ме (25 %; 75 %))

Table 1 – The content of sulfur-containing and related compounds in the tissues of the heart of rats with various forms of 14-day alcohol intoxication (nmol/g) (Me (25 %; 75 %))

Показатель	Группа			
	Контроль (n = 9)	ХАИ (n = 7)	ПАИ-4 (n = 7)	ПАИ-1 (n = 7)
Цистеиновая кислота	0,685 (0,403; 0,792)	0,622 (0,477; 0,774)	0,625 (0,581; 0,788)	0,714 (0,704; 0,916)
Цистеин-сульфиновая кислота	0,415 (0,328; 0,665)	0,618 (0,354; 0,629)	0,656 (0,429; 0,786)	0,570 (0,451; 0,969)
β-аланин	28,198 (21,166; 30,759)	31,604* (29,051; 35,196)	34,357* (30,257; 42,360)	24,828# (18,095; 26,673)
Таурин	13210,400 (12744,700; 13467,600)	14145,500 (12323,000; 15783,900)	14901,200* (13848,400; 15751,900)	12488,000 (12088,500; 14198,600)
Метионин	43,695 (40,442; 46,780)	33,594* (29,577; 36,645)	37,487 (33,332; 43,231)	31,905* (30,393; 36,951)
Цистатионин	2,905 (2,606; 4,060)	3,589 (2,726; 3,663)	2,574 (1,975; 3,148)	3,350 (2,169; 4,070)

Примечание: здесь и в таблице 2 статистически значимые различия \* – по отношению к контролю; # – по отношению к ХАИ.  
Note: here and in the table 2: statistical significance \* – vs. control; # – vs. CAI.

Таблица 2 – Содержание серосодержащих и родственных им соединений в тканях сердца крыс при различных формах 28-суточной алкогольной интоксикации (нмоль/г) (Ме (2 5%; 75 %))

Table 2 – The content of sulfur-containing and related compounds in the tissues of the heart of rats with various forms of 28-day alcohol intoxication(nmol/g) (Me (25 %; 75 %))

Показатель	Группа			
	Контроль (n = 11)	ХАИ (n = 10)	ПАИ-4 (n = 10)	ПАИ-1 (n = 10)
Цистеин-сульфиновая кислота	3,08 (2,39; 5,07)	2,16* (1,92;2,49)	3,65 (3,50;5,06)	7,92* (6,57;8,54)
Серин	861,43 (698,62; 1186,22)	789,52 (686,42; 1005,13)	934,15 (778,53; 1096,72)	730,30 (588,22;795,92)
Глицин	1259,89 (940,11; 1292,88)	1216,12 (1196,76; 1360,82)	1224,97 (1132,21; 1346,22)	1074,83 (1030,05; 1100,99)
β-аланин	55,47 (51,84;61,48)	64,17 (54,94;65,67)	71,77* (67,16;79,88)	59,13 (53,95;66,94)
Таурин	20114,40 (18672,90; 25188,30)	25584,50 (20871,80; 27607,60)	18141,65 (16225,50; 20138,30)	16504,55* (15297,20; 17825,00)
Метионин	48,34 (42,67; 58,04)	36,54* (35,22;37,79)	45,75 (42,30;56,94)	33,81* (31,15;38,28)
Цистатионин	20,95 (19,11; 27,50)	15,65* (12,56;20,78)	17,33 (15,70;20,13)	23,15 (22,15;26,07)
Глутатион	1301,044 (1211,88; 1355,46)	1439,600 (1430,38; 1470,09)	1466,110 (1375,16; 1517,66)	1270,565 (1235,61; 1336,97)

### Заключение

В результате проведенных исследований были получены следующие выводы.

1. Изменения в пуле серосодержащих соединений миокарда при ХАИ более выражены при 28-суточной алкоголизации, чем при 14-суточной, хотя и характеризуются схожим уменьшением содержания метионина.

2. Употребление алкоголя в режиме ПАИ-4 приводит к увеличению содержания β-аланина в миокарде при различной длительности экспе-

римента, но отличается повышением содержания таурина при 14-дневном приеме алкоголя и глутатиона при 28-дневной алкогольной интоксикации.

3. 28-суточное употребление этанола в режиме ПАИ-1 вызвало изменение широкого спектра показателей из пула серосодержащих соединений (цистеинсульфиновая кислота, серин, таурин, метионин), в то время как 14-суточная алкоголизация в данном режиме привела только к снижению содержания метионина.

### Список цитированных источников

- Maisch, B. Alcoholic cardiomyopathy. The result of dosage and individual predisposition / B. Maisch // Herz. – 2016. – №41. – P. 484–493.
- Relationship of alcohol consumption to all-cause, cardiovascular, and cancer-related mortality in U.S. adults / B. Xi [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2017. – Vol 70. – P. 913–922.
- Heavy alcohol drinking and subclinical echocardiographic abnormalities of structure and function / O. Iakunchykova [et al.] // Open Heart. – 2021. – Vol. 8:e001457. – P. 1–8.
- Аминокислоты крови в патогенезе и клинике ишемической болезни сердца / М. С. Синькеев [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 11–3. – С. 480–484.
- Наумов, А. В. Гомоцистеин. Медико-биологические проблемы / А. В. Наумов. – Минск: Профессиональные издания, 2013. – 312 с.
- Лелевич, В. В. Прерывистая алкогольная интоксикация – новая модель экспериментального алкоголизма / В. В. Лелевич, С. В. Лелевич // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2014. – № 3(11). – С. 90–97.

### References

- Maisch B. Alcoholic cardiomyopathy. The result of dosage and individual predisposition. *Herz*. 2016; 41:484–493.
- Xi B, Veeranki SP, Zhao M, Ma C, Yan Y, Mi J. Relationship of alcohol consumption to all-cause, cardiovascular, and cancer-related mortality in U.S. adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017;70: 913–922.
- Iakunchykova O, Schirmer H, Leong D, Malyutina S, Ryabikov A, Averina M, Kudryavtsev A, Kornev M, Voronina E, Paramonov A, Wilsgaard T, Leon D. Heavy alcohol drinking and subclinical echocardiographic abnormalities of structure and function. *Open Heart*. 2021;8:e001457.
- Sin'keev MS, Skvorcov JuI, Bogdanova TM, Skvorcov KJu. Aminokisloty krovi v patogeneze i klinike ishemicheskoy bolezni serdca. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij*. 2014;11-3: 480-484. (in Russian).
- Naumov AV. Gomocistein. Mediko-biologicheskie problemy. Minsk: Professional'nye izdaniya; 2013. 312 p. (in Russian).
- Lelevich VV, Lelevich SV. Preryvistaja alkogol'naja intoksikacija – novaja model' jeksperimental'nogo alkogolizma [Intermittent alcohol intoxication – new model of experimental alcoholism]. *Laboratornaja diagnostika. Vostochnaja Evropa* [Laboratory Diagnostics. Eastern Europe]. 2014;3(11):90-97. (in Russian).

# IMPACT OF DIFFERENT PERIODS OF ALCOHOLIZATION ON A POOL OF SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS IN THE MYOCARDIUM OF RATS

---

*A. K. Semenchuk, V. V. Lelevich*

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

**Introduction.** Alcohol consumption leads to numerous morphological, biochemical and functional changes in the myocardium.

**Objective** – study of the effect of chronic and intermittent alcohol intoxication of various durations on the content of sulfur-containing amino acids and related compounds in the myocardium of rats.

**Materials and methods.** 70 white rats with a weight 180-220 g. The content of free amino acids and biogenic amines was determined by HPLC.

**Results.** Decrease in the level of methionine in the myocardium of rats was caused by 14-day and 28-day chronic alcohol intoxication. IAI-4 led to an increase in the content of  $\beta$ -alanine and taurine at 14 days of alcoholization and  $\beta$ -alanine and glutathione at 28 days. With 14-day IAI-1 the concentration of methionine was decreased and with 28-day PAI-1 the content of serine, taurine, methionine was decreased, but the content of cysteine sulfinic acid increased.

**Conclusions.** ChAI and IAI during 28 days cause more pronounced changes in the pool of sulfur-containing amino acids and their metabolites in the myocardium of rats in comparison with 14-day alcoholization.

**Keywords:** ethanol, intermittent alcohol intoxication, methionine, myocardium.

**For citation:** Semenchuk AK, Lelevich VV. Impact of different periods of alcoholization on a pool of sulfur-containing compounds in the myocardium of rats. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 26–30 (in Russian).

*Поступила 08.09.2022*



## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ NOTCH И TWEAK/Fn14 СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ФИБРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ

Е. И. Лебедева<sup>1</sup>, А. Т. Щастный<sup>1</sup>, А. С. Бабенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение образования «Витебский государственный ордена

Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь;

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

**Введение.** Накопленные за последние годы знания о взаимодействии сигнальных путей при инициации и развитии фиброза печени не позволяют сделать конкретные выводы о их роли в активации жиронакапливающих клеток, в поляризации макрофагов, в отношении протоковой реакции, в капилляризации синусоидных капилляров и других процессов.

**Цель исследования** – поиск возможного взаимодействия между генами Notch и TWEAK/Fn14 сигнальных путей при экспериментальном фиброгенезе печени в девяти временных точках.

**Материалы и методы.** Фиброз печени у крыс Wistar индуцировали раствором тиацетамида в течение 17 недель. Относительный уровень экспрессии мРНК генов *Notch1*, *Notch2*, *Tweak*, *Fn14* оценивали методом ПЦР-РВ в девяти временных точках. Гистологические препараты печени окрашивали гематоксилином и эозином, методом Маллори. Выявление взаимосвязей между генами проводили с использованием непараметрической ранговой корреляции Спирмена.

**Результаты.** В рамках настоящего исследования установлены сложные взаимодействия между генами Notch и TWEAK/Fn14 сигнальных путей. Выявлены умеренные, средние и сильные прямые корреляционные связи ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** На основании полученных результатов мы считаем, что сигнальные пути Notch и TWEAK/Fn14 связаны между собой и вовлекаются в процессы фиброгенеза на всех его стадиях при использовании конкретной модели. Взаимодействия реализуются преимущественно за счет связи между генами *Notch1* и *Tweak*. Гены *Notch2*, *Tweak*, *Fn14* принимают участие на стадии трансформации фиброза печени в цирроз и перестройки паренхимы органа. При этом на этапе цирроза связь генов ослабевает, что может говорить о реализации патологического процесса по измененной схеме с вовлечением дополнительных сигнальных путей.

**Ключевые слова:** крысы Wistar, цирроз печени, гены *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2*, корреляционный анализ.

**Для цитирования.** Лебедева, Е. И. Взаимодействие генов Notch и TWEAK/Fn14 сигнальных путей при экспериментальном фиброгенезе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 31–36.

### Введение

Фиброз печени – это весьма сложный и динамичный процесс, сопровождающийся активацией/трансдифференцировкой жиронакапливающих клеток в миофибробластический фенотип [1, 2], перепрограммированием/поляризацией звездчатых макрофагов [3, 4], превращением эндотелиоцитов синусоидных капилляров из синусоидного в соматический тип [5], пролиферацией эпителиальных клеток внутрипеченочных желчных протоков и проточков [6]. В последние десятилетия постоянно увеличивается число сообщений о регуляции этих патологических процессов целым рядом сигнальных путей. Сведения об их взаимодействиях немногочисленны. В связи с этим возникает необходимость в изучении корреляционных взаимосвязей между сигнальными путями для направ-

ленной фармакологической коррекции функции клеток при фиброзе печени [7].

Известно, что сигнальный путь Notch регулирует клеточную дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и является потенциальной терапевтической мишенью [8]. При экспериментальном поражении печени четыреххлористым углеродом ингибирование генов пути Notch замедляет активацию жиронакапливающих клеток и развитие фиброза в органе. Прямая активация этих клеток – это не единственный механизм работы пути. Предположительно, сигнальный путь Notch способствует превращению эндотелиоцитов синусоидных капилляров из синусоидного в соматический тип. Это приводит к снижению ими секреции монооксида азота и вызывает трансдифференцировку жиронакапливающих клеток в фиброгенный фенотип [9, 10].

При заболеваниях печени активация пути Notch может стимулировать перепрограммирование звездчатых макрофагов в M1 фенотип и вызывать воспаление. Подавление пути приводит к поляризации их в M2 фенотип, снижая воспаление. Однако исследований в данном направлении немного и сам процесс остается предметом дискуссий [11, 12].

Практически на всех этапах фиброгенеза показано взаимодействие генов сигнального пути Notch с генами других сигнальных путей [13]. Наиболее изученными являются Wnt/ $\beta$ -catenin, TGF $\beta$ , Hedgehog (Hh) и Hippo [14, 15, 16]. Вероятно, в будущем данный перечень будет расширен.

К настоящему времени в научной литературе отсутствуют сведения о взаимосвязи генов Notch и TWEAk/Fn14 сигнальных путей при фиброзе печени. Нами была выдвинута гипотеза о том, что фиброгенез печени сопровождается взаимодействием генов Notch и TWEAk/Fn14 путей. Под воздействием факторов, способных вызвать поражения печени (четырёххлористый углерод, гепатэктомия), отмечено повышение уровней экспрессии генов *Fn14* и *Tweak* пути TWEAk/Fn14. Показано, что этот путь регулирует дифференцировку клеток-предшественников, способствует развитию онкологических и аутоиммунных заболеваний, участвует в патогенезе воспаления и фиброза ряда органов [17, 18].

Цель настоящего исследования заключалась в поиске возможного взаимодействия генов Notch и TWEAk/Fn14 сигнальных путей при экспериментальном фиброгенезе печени в девяти временных точках.

### Материалы и методы

В эксперименте использовали половозрелых крыс-самцов Wistar. Животных рандомизировали на 9 групп по 12 особей в каждой. Фиброгенез печени индуцировали свежеприготовленным раствором тиоацетамида. Для изучения фиброза в динамике крыс выводили из опыта через 3 недели (точка m1), 5 недель (точка m2), 7 недель (точка m3), 9 недель (точка m4), 11 недель (точка m5), 13 недель (точка m6), 15 недель (точка m7) и 17 недель (точка m8), а интактных (точка m0) – по окончании эксперимента. Дизайн эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019) и подробно описан в статье [19].

Забор материала, пробоподготовка, протокол выделения суммарной РНК из исследуемых образ-

цов печени, синтез кДНК на матрице суммарной РНК, последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), нормализация данных ПЦР-РВ, оценка уровня мРНК представлены в статьях [19, 20]. Приводим список исследуемых генов Notch и TWEAk/Fn14 сигнальных путей.

*Notch1*: Notch1 – рецептор notch 1, notch receptor 1;

*Notch2*: Notch2 – рецептор notch 2, notch receptor 2;

*Tweak*: Tnfsf12 – член суперсемейства фактора некроза опухоли 12, TNF superfamily member 12;

*Fn14*: Tnfrsf12a – член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 12A, TNF receptor superfamily member 12A.

Морфологическое исследование образцов печени проводили на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, методом Маллори. Степень фиброза определяли с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G. [19, 20].

Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США, STA999K347156-W), IBM SPSS Statistics 23.0, Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., США).

В выборках по каждой неделе эксперимента определяли нормальность частотного распределения признака по критерию Лиллиефорса. Получали описательные статистики и описывали количественные экспериментальные данные в виде средних и их соответствующих доверительных интервалов ( $M$  (95 % ДИ:  $j-q$ )), медианы и значения 15-го и 85-го перцентилей ( $Me$  (15 %; 85 %)). Об уровне статистической значимости различий изучаемых признаков в группах с нормальным частотным распределением данных судили по  $t$ -критерию Стьюдента; в случае отличия выборок от нормального частотного распределения использовали  $U$ -критерий Манна-Уитни. Выявление корреляционных взаимосвязей проводили с использованием непараметрической ранговой корреляции Спирмена.

### Результаты и их обсуждения

Для того чтобы подойти к поиску связи между генами Notch и TWEAk/Fn14 сигнальных путей мы подробно изучали поведения уровней экспрессии мРНК генов *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2* методом ПЦР-РВ в девяти временных точках. Уровень экспрессии мРНК генов изучали в пуле вариантов, т. е. суммарную мРНК каждого из генов-мишеней без разделения на альтернативные варианты сплайсинга. Полученные результаты выявили осо-

бенности экспрессии мРНК генов. Данные представлены в статьях [19, 20]. В настоящей работе мы учитывали только сильную, среднюю и умеренную связи между генами.

**Корреляционные связи между генами *Notch1* и *Notch2*, *Tweak* и *Fn14* в печени крыс контрольной группы.** Гистологический анализ печени крыс контрольной группы соответствовал критериям нормы. Между генами *Notch1* и *Notch2* установили умеренные прямые корреляционные связи ( $r = 0,41$ ,  $p < 0,05$ ). Согласно литературным данным, в здоровой печени клетки билиарного эпителия, гепатоциты и синусоидальные эндотелиальные клетки экспрессируют высокие уровни белка notch1 и мРНК генов *Notch1*, *Notch2*. Белок notch2 проявляет слабую экспрессию во всех вышеупомянутых клетках. Причины несоответствия экспрессии генов и рецепторов до сих пор не установлены [8, 9, 11, 21].

Между генами *Tweak* и *Fn14* в условиях физиологической нормы связь не выявлена. Сигнальный путь TWEAK/Fn14 состоит из гена *Tweak*, кодирующего белок цитокин, и гена *Fn14*, кодирующего соответствующий рецептор для связывания с *tweak* [22, 23]. В последнее время стало очевидным, что *tweak* является многофункциональным цитокином. По-прежнему остается предметом дискуссий: все ли TWEAK-опосредованные клеточные ответы осуществляются путем связывания с одним известным в настоящее время рецептором *fn14*. Нельзя исключить, что *tweak* может воздействовать на клетки через другие, пока не идентифицированные молекулы клеточной поверхности. В печени сигнальные и функциональные ответы пути TWEAK/Fn14 в основном исследовались при регенерации. Уровень экспрессии мРНК *Fn14* быстро повышался после повреждения печени и преимущественно был связан с клетками – предшественниками органа, тогда как уровень экспрессии мРНК *Tweak* в основном обнаруживался в звездчатых макрофагах и печеночных натуральных киллерных клетках [22, 24].

**Корреляционные связи между генами *Notch1* и *Notch2*, *Tweak* и *Fn14* в условиях моделирования фиброза и цирроза печени.** Между генами *Notch1* и *Notch2* умеренные прямые корреляционные связи выявлены только на начальном этапе процесса трансформации фиброза печени в цирроз (9 недель,  $r = 0,48$ ,  $p < 0,05$ , степень фиброза F4/F5).

При этом между генами *Tweak* и *Fn14* средние прямые корреляционные связи отмечены на двух стадиях прогрессирующего

фиброза печени (5 и 7 недель эксперимента, степень фиброза F2/F3 и F3/F4,  $r = 0,68$  и  $r = 0,58$  при  $p < 0,05$  соответственно).

**Корреляционные связи между генами *Notch1* и *Tweak*, *Notch1* и *Fn14*, *Notch2* и *Tweak*, *Notch2* и *Fn14* в условиях моделирования фиброза и цирроза печени.** В интактной печени и практически на всех этапах эксперимента между генами *Notch1* и *Tweak*, за исключением стадий перестройки паренхимы печени, установлены сильные, средние и умеренные прямые корреляционные связи (таблица 1). С геном *Fn14* ген *Notch1* взаимодействует только на двух стадиях прогрессирующего фиброза (см. таблицу 1).

В условиях физиологической нормы между генами *Notch2* и *Fn14* установлена средняя прямая корреляционная связь (таблица 2). При экспериментальном фиброгенезе печени гены *Notch2* и *Tweak*, *Notch2* и *Fn14* проявляют связи практически в одних и тех же временных точках (см. таблицу 2). Как видно из таблицы 2 они принимают участие в процессах трансформации фиброза печени в цирроз (9 и 11 недель эксперимента) и нодулярной перестройки паренхимы органа (15 и 17 недель эксперимента).

Особого внимания заслуживает факт того, что в печени крыс контрольной группы ген *Notch1* взаимодействует с *Tweak*, а ген *Notch2* – с *Fn14* и, вероятно, регулируют различные процессы.

При фиброгенезе печени индуцированным тиоацетамидом гены *Notch* и TWEAK/Fn14 сигнальных путей взаимодействуют весьма сложно. По нашему

Таблица 1 – Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между уровнями экспрессии мРНК генов *Notch1*, *Tweak*, *Fn14*

Table 1 – Spearman's rank correlation coefficients between the level of mRNA expression of the *Notch1*, *Tweak*, *Fn14* genes

Признак	Коэффициенты корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$								
	Наименование группы/недели эксперимента								
	m0/0	m1/3	m2/5	m3/7	m4/9	m5/11	m6/13	m7/15	m8/17
	<i>Notch1</i>								
<i>Tweak</i>	0,79	0,40	0,71	0,62	0,46	–	–	–	0,69
<i>Fn14</i>	–	–	0,42	0,68	–	–	–	–	–

Таблица 2 – Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между уровнями экспрессии мРНК генов *Notch2*, *Tweak*, *Fn14*

Table 2 – Spearman's rank correlation coefficients between the level of mRNA expression of the *Notch2*, *Tweak*, *Fn14* genes

Признак	Коэффициенты корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$								
	Наименование группы/недели эксперимента								
	m0/0	m1/3	m2/5	m3/7	m4/9	m5/11	m6/13	m7/15	m8/17
	<i>Notch2</i>								
<i>Tweak</i>	–	–	–	–	0,38	0,36	–	–	0,48
<i>Fn14</i>	0,55	–	–	–	0,38	0,55	–	0,67	0,61

мнению, это может быть связано с тем, что пути связаны с другими сигнальными путями, образуя перекрестные сети. Эти пути могут усиливать или ослаблять эффекты друг друга через сложные сигнальные взаимодействия, которые требуют более глубокого исследования и понимания. Отсутствие связей между генами свидетельствует о том, что они задействованы и в других процессах, к настоящему времени до конца не изученных. На исчезновение и восстановление связей оказывают влияние смена сигналов микроокружения и ряд других факторов.

### Заключение

На основании полученных данных считаем, что сигнальные пути Notch и TWEAK/Fn14 связаны и вовлекаются в процессы фиброгенеза на

всех его стадиях в случае использования конкретной экспериментальной модели. Взаимодействие реализуется преимущественно за счет связи между генами *Notch1* и *Tweak*. Гены *Notch2*, *Tweak*, *Fn14* принимают участие на стадии трансформации фиброза печени в цирроз и перестройки паренхимы органа. При этом на этапе цирроза связь ослабевает, что свидетельствует о реализации патологического процесса по измененной схеме с вовлечением дополнительных сигнальных путей.

Полученные результаты позволяют глубже понять молекулярные механизмы, лежащие в основе фиброгенеза печени, и могут быть использованы для дальнейшего изучения взаимодействия путей передачи молекулярных сигналов.

### Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 «Изучить роль экспрессии генов NOTCH и TWEAK сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении» №20190107.

### Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the state research program «Fundamental and Applied Sciences for Medicine» of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, task 2.89 «To study the role of the expression of NOTCH and TWEAK-signaling pathway genes involved in the processes of proliferation and differentiation of liver cells in normal conditions and in its toxic defeat» No. 20190107.

### Список цитированных источников

1. Hepatic Stellate Cell: A Double-Edged Sword in the Liver / N. Luo [et al.] // *Physiol. Res.* – 2021. – Vol. 70, №6. – P. 821–829.
2. Kisseleva, T. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression / T. Kisseleva, D. Brenner // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2021. – Vol. 18, №3. – P. 151–166.
3. Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease / C. Wang [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 803037.
4. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities / Y. Wen [et al.] // *Cell. Mol. Immunol.* – 2021. – Vol. 18, №1. – P. 45–56.
5. Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice / J. Duan [et al.] // *Hepatology.* – 2018. – Vol. 68, №2. – P. 677–690.
6. Postnatal, ontogenic liver growth accomplished by biliary/oval cell proliferation and differentiation / A. Szucs [et al.] // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, №5. – P. e0233736.
7. Mechanisms of ductular reaction in non-alcoholic steatohepatitis / Y. Chen [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2022. – Vol. 28, №19. – P. 2088–2099.
8. Novel Insights on Notch signaling pathways in liver fibrosis / M. M. Ni [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 826. – P. 66–74.
9. Disruption of myofibroblastic Notch signaling attenuates liver fibrosis by modulating fibrosis progression and regression / Z. Yue [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2021. – Vol. 17, №9. – P. 2135–2146.
10. Notch-Regulated c-Kit-Positive Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contribute to Liver Zonation and Regeneration / J. L. Duan [et al.] // *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* – 2022. – Vol. 13, №6. – P. 1741–1756.
11. The Notch signaling pathway regulates macrophage polarization in liver diseases / W. Chen [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2021. – Vol. 99. – P. 107938.
12. NOTCH Signaling via WNT Regulates the Proliferation of Alternative, CCR2-Independent Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma / Y. C. Ye [et al.] // *Cancer Res.* – 2019. – Vol. 79, №16. – P. 4160–4172.
13. Cross-talk between Notch and Hedgehog regulates hepatic stellate cell fate in mice / G. Xie [et al.] // *Hepatology.* – 2013. – Vol. 58, №5. – P. 1801–1813.
14. Mesenchymal stem cells improve liver fibrosis and protect hepatocytes by promoting microRNA-148a-5p-mediated inhibition of Notch signaling pathway / Q. Zhou [et al.] // *Stem. Cell. Res. Ther.* – 2022. – Vol. 13, №1. – P. 354.
15. Overexpression of miRNA-25-3p inhibits Notch1 signaling and TGF- $\beta$ -induced collagen expression in hepatic stellate cells / B. Genz [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, №1. – P. 8541.
16. Costunolide represses hepatic fibrosis through WW domain-containing protein 2-mediated Notch3 degradation / M. X. Ge [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 177, №2. – P. 372–387.
17. TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression / B. J. Dwyer [et al.] // *J. Hepatol.* – 2021. – Vol. 74, №4. – P. 860–872.
18. Zhang, Y. TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis / Y. Zhang, W. Zeng, Y. Xia // *J. Cell. Physiol.* – 2021. – Vol. 236, №5. – P. 3304–3316.
19. Щастный, А. Т. Роль уровня мРНК генов сигнального пути Notch при индуцированном фиброгенезе печени крысы / А. Т. Щастный, Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко // *Вестник ВГМУ.* – 2021. – Т. 20, №2. – С. 25–37.

20. Лебедева, Е. И. Потенциал точки перехода фиброза в цирроз как ключевого элемента в изучении роли сигнального пути Tweak/Fn14 при индуцированном фиброгенезе печени крыс / Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко, А. Т. Щастный // Вестник ВГМУ. – 2022. – Т. 21, № 3. – С. 17–26.
21. Hu, B. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy / B. Hu, S. H Phan // *Pharmacol. Res.* – 2016. – Vol. 108. – P. 57–64. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.04.010.
22. Interaction of TWEAK with Fn14 leads to the progression of fibrotic liver disease by directly modulating hepatic stellate cell proliferation / A. Wilhelm [et al.] // *J. Pathol.* – 2016. – Vol. 239, № 1. – P. 109–121.
23. TWEAK and LT $\beta$  Signaling during Chronic Liver Disease / B. J. Dwyer [et al.] // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 39.
24. Wang, X. Tumor Necrosis Factor Receptor Mediates Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Signaling / X. Wang, S. Xiao, Y. Xia // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2017. – Vol. 43, № 2. – P. 579–588.

### References

- 1 Luo N, Li J, Wei Y, Lu J, Dong R. Hepatic Stellate Cell: A Double-Edged Sword in the Liver. *Physiol. Res.* 2021;70(6):821-829. DOI: 10.33549/physiolres.934755.
- 2 Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2021;18(3):151-166. DOI: 10.1038/s41575-020-00372-7.
- 3 Wang C, Ma C, Gong L, Guo Y, Fu K, Zhang Y, Zhou H, Li Y. Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease. *Front. Immunol.* 2021;12:803037. DOI: 10.3389/fimmu.2021.803037.
- 4 Wen Y, Lambrecht J, Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cell. Mol. Immunol.* 2021;18(1):45-56. DOI: 10.1038/s41423-020-00558-8.
- 5 Duan JL, Ruan B, Yan XC, Liang L, Song P, Yang ZY, Liu Y, Dou KF, Han H, Wang L. Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice. *Hepatology.* 2018;68(2):677-690. DOI: 10.1002/hep.29834.
- 6 Szucs A, Paku S, Sebestyen E, Nagy P, Dezso K. Postnatal, ontogenic liver growth accomplished by biliary/oval cell proliferation and differentiation. *PLoS One.* 2020;15(5):e0233736. DOI: 10.1371/journal.pone.0233736.
- 7 Chen Y, Gao WK, Shu YY, Ye J. Mechanisms of ductular reaction in non-alcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* 2022;28(19):2088-2099. DOI: 10.3748/wjg.v28.i19.2088.
- 8 Ni MM, Wang YR, Wu WW, Xia CC, Zhang YH, Xu J, Xu T, Li J. Novel Insights on Notch signaling pathways in liver fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.* 2018;826:66-74. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.02.051.
- 9 Yue Z, Jiang Z, Ruan B, Duan J, Song P, Liu J, Han H, Wang L. Disruption of myofibroblastic Notch signaling attenuates liver fibrosis by modulating fibrosis progression and regression. *Int. J. Biol. Sci.* 2021;17(9):2135-2146. DOI: 10.7150/ijbs.60056.
- 10 Duan JL, Zhou ZY, Ruan B, Fang ZQ, Ding J, Liu JJ, Song P, Xu H, Xu C, Yue ZS, Han H, Dou GR, Wang L. Notch-Regulated c-Kit-Positive Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contribute to Liver Zonation and Regeneration. *Cell. Mol. Gastroenterol Hepatol.* 2022;13(6):1741-1756. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2022.01.019.
- 11 Chen W, Liu Y, Chen J, Ma Y, Song Y, Cen Y, You M, Yang G. The Notch signaling pathway regulates macrophage polarization in liver diseases. *Int. Immunopharmacol.* 2021;99:107938. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107938.

- 12 Ye YC, Zhao JL, Lu YT, Gao CC, Yang Y, Liang SQ, Lu YY, Wang L, Yue SQ, Dou KF, Qin HY, Han H. NOTCH Signaling via WNT Regulates the Proliferation of Alternative, CCR2-Independent Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 2019;79(16):4160-4172. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1691.
- 13 Xie G, Karaca G, Swiderska-Syn M, Michelotti GA, Krüger L, Chen Y, Premont RT, Choi SS, Diehl AM. Cross-talk between Notch and Hedgehog regulates hepatic stellate cell fate in mice. *Hepatology.* 2013;58(5):1801-13. DOI: 10.1002/hep.26511.
- 14 Zhou Q, Rong C, Gu T, Li H, Wu L, Zhuansun X, Zhao X, Xiao Z, Kuang Y, Xu S, Wang S. Mesenchymal stem cells improve liver fibrosis and protect hepatocytes by promoting microRNA-148a-5p-mediated inhibition of Notch signaling pathway. *Stem. Cell. Res. Ther.* 2022;13(1):354. DOI: 10.1186/s13287-022-03030-8.
- 15 Genz B, Coleman MA, Irvine KM, Kutasovic JR, Miranda M, Gratte FD, Tirnitz-Parker JEE, Olynyk JK, Calvopina DA, Weis A, Cloonan N, Robinson H, Hill MM, Al-Ejeh F, Ramm GA. Overexpression of miRNA-25-3p inhibits Notch1 signaling and TGF- $\beta$ -induced collagen expression in hepatic stellate cells. *Sci. Rep.* 2019;9(1):8541. DOI: 10.1038/s41598-019-44865-1.
- 16 Ge MX, Liu HT, Zhang N, Niu WX, Lu ZN, Bao YY, Huang R, Yu DK, Shao RG, He HW. Costunolide represses hepatic fibrosis through WW domain-containing protein 2-mediated Notch3 degradation. *Br. J. Pharmacol.* 2020;177(2):372-387. DOI: 10.1111/bph.14873.
- 17 Dwyer BJ, Jarman EJ, Gogoi-Tiwari J, Ferreira-Gonzalez S, Boulter L, Guest RV, Kendall TJ, Kurian D, Kilpatrick AM, Robson AJ, O'Duibhir E, Man TY, Campana L, Starkey Lewis PJ, Wigmore SJ, Olynyk JK, Ramm GA, Tirnitz-Parker JEE, Forbes SJ. TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression. *J. Hepatol.* 2021;74(4):860-872. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.11.018.
- 18 Zhang Y, Zeng W, Xia Y. TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 2021;236(5):3304-3316. DOI: 10.1002/jcp.30089.
- 19 Shchastnyj AT, Lebedeva EI, Babenko AS. Rol' urovnya mRNK genov signal'nogo puti Notch pri inducirovannom fibrogeze pecheni krysy. *Vestnik VGMU.* 2021; T. 20, no. 2. P. 25–37.
- 20 Lebedeva EI, Babenko AS, Shchastnyj AT. Potencial tochki perekhoda fibroza v cirroz kak klyuchevogo elementa v izuchenii roli signal'nogo puti Tweak/Fn14 pri inducirovannom fibrogeze pecheni krysy. *Vestnik VGMU.* 2022; T. 21, no 3. P. 17–26.
- 21 Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. *Pharmacol. Res.* 2016; 108:57–64. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.04.010.
- 22 Wilhelm A, Shepherd EL, Amatucci A, Munir M, Reynolds G, Humphreys E, Resheq Y, Adams DH, Hübscher S, Burkly LC, Weston CJ, Afford SC. Interaction of TWEAK with Fn14 leads to the progression of fibrotic liver disease by directly modulating hepatic stellate cell proliferation. *J. Pathol.* 2016; 239(1):109-21. DOI: 10.1002/path.4707.
- 23 Dwyer BJ, Olynyk JK, Ramm GA, Tirnitz-Parker JE. TWEAK and LT $\beta$  Signaling during Chronic Liver Disease. *Front. Immunol.* 2014;5:39. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00039.
- 24 Wang X, Xiao S, Xia Y. Tumor Necrosis Factor Receptor Mediates Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Signaling. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017;43(2):579-588. DOI: 10.1159/000480530.

# INTERACTION OF NOTCH AND TWEAK/FN14 SIGNALING PATHWAYS IN EXPERIMENTAL LIVER FIBROGENESIS

---

*E. I. Lebedeva<sup>1</sup>, A. T. Shchastny<sup>1</sup>, A. S. Babenka<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus;  
<sup>2</sup>Belarussian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

**Introduction.** The knowledge gained about the interaction of signaling pathways during the initiation and development of liver fibrosis does not allow to draw specific conclusions about their role in the activation of fat-accumulating cells, polarization of macrophages, relation to the ductal reaction, capillarization of sinusoidal capillaries and other processes.

**Objective** – to look for a possible interaction between Notch and TWEAK/Fn14 signaling pathways in experimental liver fibrogenesis at nine time points.

**Materials and methods.** Liver fibrosis in Wistar rats was induced with thioacetamide solution for 17 weeks. The relative level of mRNA expression of the *Notch1*, *Notch2*, *Tweak* and *Fn14* genes was assessed by RT-PCR at nine time points. Histological preparations of the liver were stained with hematoxylin and eosin using the Mallory method. The identification of relationships between genes was performed using Spearman's nonparametric rank correlation.

**Results.** We have identified complex interactions between Notch and TWEAK/Fn14 signaling pathways. Moderate, medium and strong direct correlations between some genes were revealed ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** We believe that the Notch and TWEAK/Fn14 signaling pathways are interconnected and are involved in the processes of fibrogenesis at all its stages when using a specific model. Interactions are realized mainly due to the connection between the *Notch1* and *Tweak* genes. *Notch2*, *Tweak*, *Fn14* genes are involved in the stage of transformation of liver fibrosis into cirrhosis and reorganization of the organ parenchyma. At the same time, at the stage of cirrhosis, the connection of genes weakens, which may indicate the implementation of the pathological process according to an altered scheme with the involvement of additional signaling pathways.

**Keywords:** Wistar rats, liver cirrhosis, *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2* genes, correlation analysis.

**For citation:** Lebedeva EI, Shchastny AT, Babenka AS. Interaction of notch and tweak/fn14 signaling pathways in experimental liver fibrogenesis. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 31–36 (in Russian).

*Поступила 12.10.2022*

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОЙ СТЕРОИД-11 $\beta$ -ГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ

Ю. С. Бакакина<sup>1</sup>, Д. В. Бабарико<sup>1</sup>, А. В. Свирид<sup>2</sup>, Т. В. Шкель<sup>2</sup>,  
А. М. Тумилович<sup>2</sup>, В. Э. Сяхович<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория»,  
а.г. Лесной, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

**Введение.** В области антидопингового анализа особое внимание уделяется классу анаболических андрогенных стероидов (ААС), относящихся к группе S1 Запрещенного списка веществ Всемирного антидопингового агентства (ВАДА). В настоящее время открытым остается вопрос синтеза высококачественных стандартов различных метаболитов ААС для подтверждения положительных результатов тестирования.

**Цель исследования** – биотехнологическое получение метаболитов синтетических ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы человека.

**Материалы и методы.** Для исследования метаболизма ААС *in vitro* использовали ферментативную систему, включающую рекомбинантные стероид-11 $\beta$ -гидроксилазу человека, аденодоксинредуктазу и аденодоксин. Образование метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

**Результаты.** Было показано наличие разной степени биотрансформации синтетических ААС (метандиенон, оралтуринабол, оксиметолон, оксандролон) с участием ферментативной системы стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы. В результате реакции наблюдалось падение содержания оралтуринабола на 90 %, метандиенона – на 30 % относительно количества ААС, взятого для проведения реакции. Для оксиметолон и оксандролон не было показано падение содержания ААС.

**Заключение.** В результате выполнения работы получены 11 $\beta$ -гидроксипроизводные значимых в допинг-контроле ААС – оралтуринабола и метандиенона. Дальнейшая работа по биотехнологическому получению долгоживущих метаболитов ААС с участием ферментов семейства цитохромов P450 представляет особый интерес для допинг-контроля.

**Ключевые слова:** рекомбинантная стероид-11 $\beta$ -гидроксилаза человека, синтетические анаболические андрогенные стероиды, метаболиты, жидкостная хромато-масс-спектрометрия.

**Для цитирования.** Биотехнологическое получение метаболитов анаболических стероидов с использованием рекомбинантной стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы человека для допинг-контроля / Ю. С. Бакакина [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 37–43.

### Введение

В настоящее время неотъемлемой частью профессионального спорта является регулярное тестирование спортсменов на предмет употребления допинга. Антидопинговые меры в том виде, в каком мы их знаем сегодня, были введены в начале 1960-х годов и с тех пор подвергались постоянному пересмотру и совершенствованию [1]. В области антидопингового контроля долгосрочное обнаружение запрещенных веществ, определенных Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) [2], является одним из наиболее острых вопросов. Основным типом используемой в исследованиях матрицы является моча в связи с неинвазивностью и быстротой отбора проб. При приеме многих до-

пинговых веществ в мочу секретируется не само исходное соединение, а один или несколько его метаболитов.

Особое внимание при допинг-контроле уделяется классу анаболических андрогенных стероидов (ААС), относящихся к группе S1 Запрещенного списка веществ ВАДА, поскольку он представляет собой наиболее часто выявляемое семейство запрещенных препаратов в профессиональном спорте [3, 4].

В настоящее время актуальным остается вопрос синтеза высококачественных стандартов различных метаболитов ААС для подтверждения полученных положительных результатов тестирования.

В отличие от других классов препаратов, таких как стимуляторы, которые обычно оказывают краткосрочный эффект в связи с быстрым разрушением и выведением из организма, эффекты ААС могут быть продолжительными и сохраняться в течение длительного периода после прекращения использования стероидов. Таким образом, ААС находятся под полным запретом применения как в соревновательный, так и во внесоревновательный периоды [2].

У человека большинство стадий биосинтеза стероидов катализируются монооксигеназами из семейства цитохромов Р450 (СYP), которые вовлечены в синтез глюкокортикоидов, минералокортикоидов и половых гормонов, а также в метаболизм ксенобиотиков, включая лекарственные препараты [5]. Ферменты данного семейства считаются наиболее универсальными биокатализаторами, способными функционировать в мягких реакционных условиях регио- и стереоселективным образом, что позволяет проводить сложные реакции, которые трудно осуществить химическим путем [6].

Гидроксилирование является одной из ключевых реакций фазы I биотрансформации ААС *in vivo*, поскольку приводит к образованию гидрофильных метаболитов из аполярных стероидов, которые быстрее выводятся из организма с мочой [7]. Ферментные системы цитохрома Р450 катализируют гидроксилирование в различных положениях стероидного кольца [8].

В литературе имеются данные по получению гидроксипроизводных ААС с использованием рекомбинантных ферментов человека семейства цитохромов Р450 как в высокоочищенном виде, так и в виде белков, экспрессируемых в клетках микроорганизмов. Так, например, Zöllner с соавторами была очищена и охарактеризована стероид-11 $\beta$ -гидроксилаза человека, экспрессированная в клетках *Escherichia (E.) coli*, и показана способность фермента гидроксилировать субстраты – 11-дезоксикортикостерон и 11-дезоксикортизол в 11 $\beta$ -положении [9]. Schiffer с соавторами создали биокатализатор на основе клеток *E. coli*, экспрессирующих рекомбинантную ферментативную систему стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы, для наработки кортизола из 11-дезоксикортизола [10]. В работе Paig с соавторами показали возможность получения 11 $\beta$ -гидроксиметандиенона с использованием очищенного фермента стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы человека, экспрессированного в клетках *Schizosaccharomyces pombe* [11].

Нами предложен вариант биоконверсии ААС, включающий получение рекомбинантных ферментов человека в высокоочищенном виде. Несмотря на то что существующие аналогичные подходы опу-

бликованы и используются для модификации ряда стероидов, они не применялись комплексно на основе последовательно проводимых реакций с участием рекомбинантных ферментов человека семейства цитохромов Р450 для получения спектра метаболитов I фазы биотрансформации синтетических ААС. В настоящей работе представлены данные по получению 11 $\beta$ -гидроксипроизводных ААС.

Стероид-11 $\beta$ -гидроксилаза, относящаяся к семейству цитохромов Р450, играет важную роль в фазе I метаболизма ААС [12]. Данный фермент участвует в биосинтезе стероидных гормонов и катализирует две реакции: 11 $\beta$ -гидроксилирование 11-дезоксикортикостерона и 11-дезоксикортизола с образованием кортикостерона (прекурсора альдостерона) и глюкокортикоида кортизола соответственно [13].

Следует отметить, что 11 $\beta$ -гидроксилирование стероидной молекулы является наиболее дорогостоящим этапом многостадийного синтеза глюкокортикоидов с участием микроорганизмов и сопряжено с образованием побочных продуктов – 11 $\alpha$ -, 14 $\alpha$ - и 6 $\beta$ -гидроксипроизводных [14]. В связи с этим проблема направленного 11 $\beta$ -гидроксилирования относится к числу одной из важнейших в химии стероидов.

Цель исследования – биотехнологическое получение метаболитов синтетических ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы человека.

### Материалы и методы

Объектом исследования являлось получение 11 $\beta$ -гидроксипроизводных синтетических ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы человека.

**Получение стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы, адренодоксинредуктазы (AdR) и адренодоксина (Adx) человека.** Высокоочищенные препараты ферментов (чистота >95 % по данным электрофореза в денатурирующих условиях в 12%-м полиакриламидном геле) – рекомбинантные стероид-11 $\beta$ -гидроксилаза, адренодоксинредуктаза (AdR) и адренодоксин (Adx) человека были получены согласно [15, 16].

**Получение метаболитов ААС.** Реакционная смесь для получения метаболитов ААС включала ферментативный комплекс, состоящий из стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы, адренодоксинредуктазы (AdR) и адренодоксина (Adx) в соотношении 1:4:0,6, 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), 30 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), 0,1 мМ трис-(2-карбокситил)-фосфин гидрохлорид, 0,1 % Tween P20, 3 мМ восстановленный глутатион и 100 мкМ ААС в ко-



нечном объеме 250 мкл. Реакционная смесь также содержала НАДФН-регенерирующую систему, состоящую из 1,3 Ед/мл изоцитратдегидрогеназы и 15 мМ изоцитрата натрия. Реакцию запускали внесением 10 мМ НАДФН и инкубировали в течение 60 мин при +37 °С. В качестве контроля использовали образцы, не содержащие НАДФН. Реакцию останавливали внесением 50 % ацетонитрила. Эксперименты проводили в 3-кратной повторности для каждого образца.

Образование продуктов реакции определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС). Разделение проводили на обращенно-фазной колонке Hypersil Gold C18 (150×2,1 мм, размер частиц – 5 мкм, Thermo Scientific, США) с использованием сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США). Для разделения метаболитов ААС использовали метод с 25-минутным градиентом от 5 % до 95 % ацетонитрила (с 0,1%-й муравьиной кислотой) в воде при скорости потока 0,25 мл/мин. В качестве базового раствора использовали 0,1%-ю муравьиную кислоту в воде. Масс-спектрометрическую детекцию проводили на масс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США). В качестве внутреннего стандарта использовали метилтестостерон. Данные обрабатывали с помощью программы XCalibur (Thermo Scientific, США).

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе выполнения работы с целью исследования возможности получения гидроксипроизводных ряда синтетических ААС с использованием стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы была осуществлена постановка данной реакции в отношении эндогенного ААС – 11-дезоксикортикостерона. В работе для исследования биотрансформации ААС *in vitro* использовали очищенную рекомбинантную стероид-11 $\beta$ -гидроксилазу человека.

Данный фермент катализирует реакцию 11 $\beta$ -гидроксилирования эндогенных стероидов. Для его работы требуются белки-партнеры окислительно-восстановительного потенциала для получения электронов от НАДФН – аденодоксинредуктаза (AdR) и аденодоксин (Adx). В работе были использованы рекомбинантные препараты данных белков. Для протекания реакции было взято молярное соотношение ферментов стероид-11 $\beta$ -гидроксилаза/Adx/AdR 1:4:0,6, поскольку известно, что максимальная активность системы стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы наблюдается при соотношении P450/AdR  $\geq$  1 и избытке Adx [17].

С целью повышения эффективности протекания ферментативной реакции (увеличение количества образующихся гидроксипроизводных ААС) с участием стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы в реакционную систему вносили НАДФН-регенерирующую систему.

Как видно из данных, представленных на рисунке 1, стероид-11 $\beta$ -гидроксилаза катализирует гидроксилирование 11-дезоксикортикостерона с образованием метаболита – кортикостерона. Для установления структуры метаболита был проведен МС/МС анализ и сравнение по дочерним ионам со стандартом кортикостерона. В результате реакции гидроксилирования наблюдалось падение содержания 11-дезоксикортикостерона на 95 % и образование 65 % кортикостерона относительно количества субстрата, взятого для проведения реакции (25 нмоль).

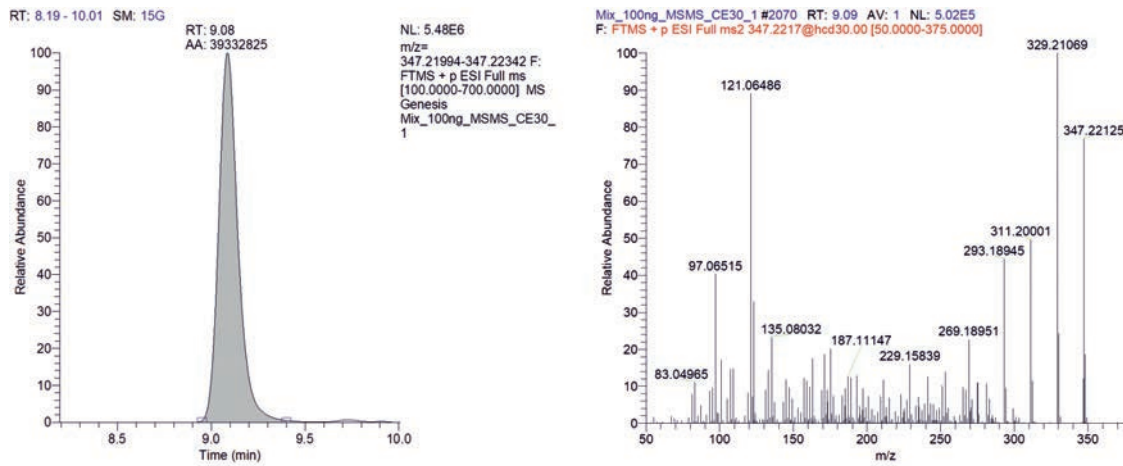
На втором этапе выполнения работы с целью получения 11 $\beta$ -гидроксипроизводных ряда синтетических ААС была осуществлена апробация работы ферментативной системы стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы в отношении данных ААС.

Для работы были выбраны наиболее часто выявляемые при допинг-контроле ААС: метандиенон, оралтуринабол, оксиметолон, оксандролон, которые различаются по структурным характеристикам, в частности, по количеству двойных связей в А-кольце, конфигурации молекулы, положению и количеству функциональных групп.

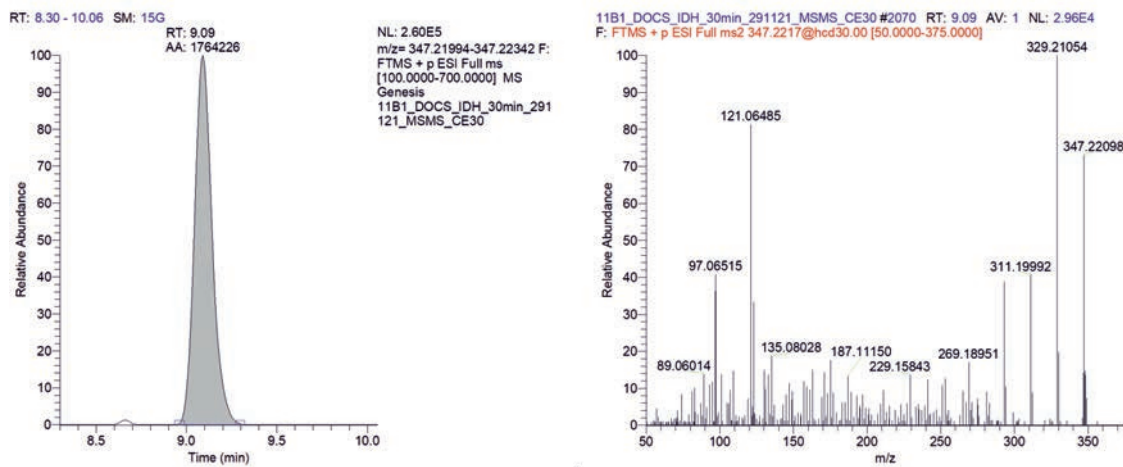
Образование 11 $\beta$ -гидроксипроизводных исследуемых ААС в результате проведения реакций было подтверждено при сравнении МС/МС-спектров продуктов реакций гидроксилирования с участием стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы с МС/МС-спектрами исходных ААС и данными по МС/МС распаду данных соединений, имеющимися в литературе.

На рисунке 2 представлена хроматограмма и МС/МС-спектр моногидроксипроизводного метандиенона, полученного из метандиенона в реакции, катализируемой ферментативной системой стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы. Следует отметить, что в результате реакции образуется один метаболит – 11 $\beta$ -гидроксиметандиенон. Аналогичные данные были получены в реакциях гидроксилирования оралтуринабола с участием ферментативной системы стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы (рисунок 3).

Исследования показали наличие разной степени биотрансформации изученных в работе синтетических ААС. В результате проведения реакции с участием ферментативной системы стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы наблюдалось падение содержания оралтуринабола на 90 %, метандиенона – на 30 % относительно количества ААС, взятого для проведения реакции (25 нмоль).



a



b

Рисунок 1 – Хроматограммы и MS/MS-спектры стандарта кортикоостерона (a) и метаболита 11-дезоксикортикоостерона, полученного при протекании реакции с участием рекомбинантной стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы человека (b)

Figure 1 – Chromatograms and MS/MS spectra of corticosterone standard (a) and 11-deoxycorticosterone metabolite converted by human recombinant steroid-11 $\beta$ -hydroxylase (b)

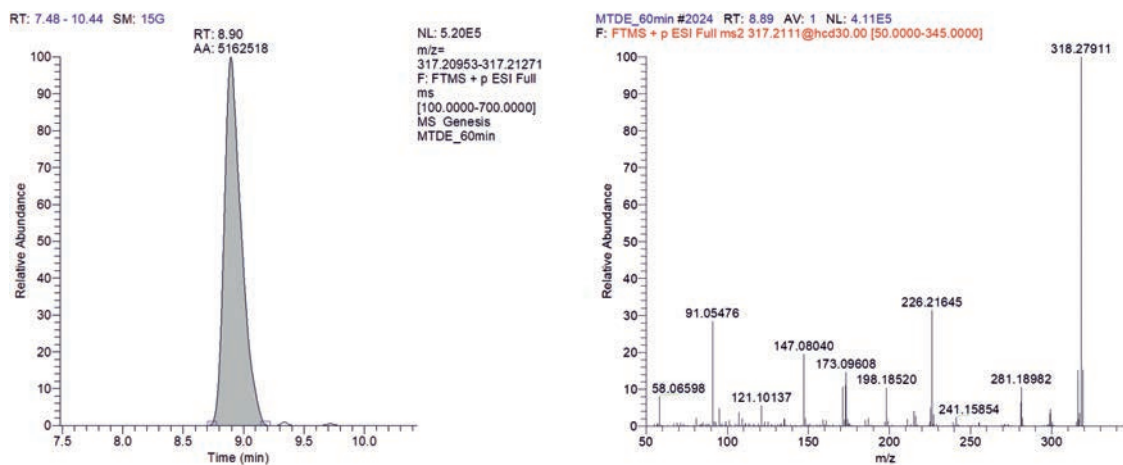


Рисунок 2 – Хроматограмма и MS/MS-спектр 11 $\beta$ -гидроксиметандиенона, полученного из метандиенона при протекании реакции с участием рекомбинантной стероид-11 $\beta$ -гидроксилазы человека

Figure 2 – Chromatogram and MS/MS spectrum of 11 $\beta$ -hydroxymethandienone converted from methandienone by human recombinant steroid-11 $\beta$ -hydroxylase

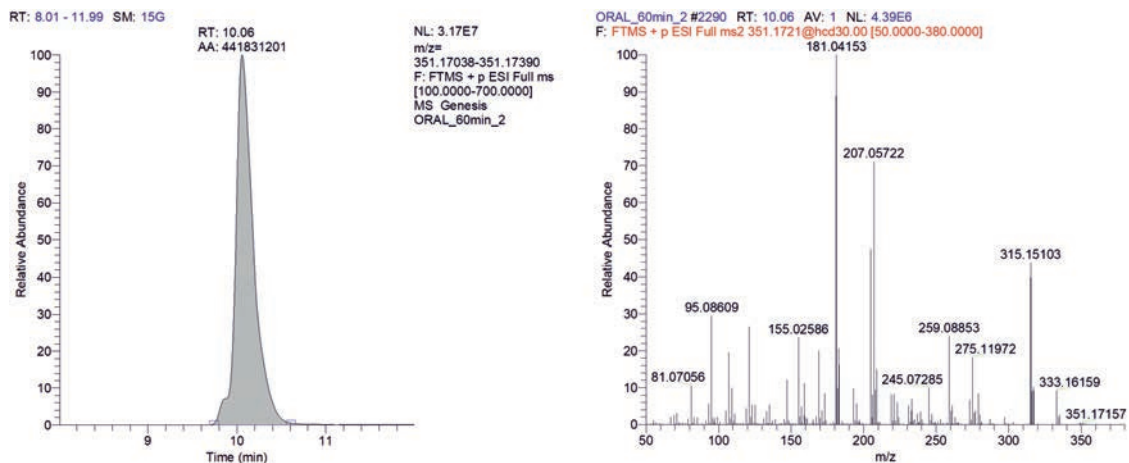


Рисунок 3 – Хроматограмма и МС/МС-спектр 11β-гидроксиоралтуринабола, полученного из оралтуринабола при протекании реакции с участием рекомбинантной стероид-11β-гидроксилазы человека

Figure 3 – Chromatogram and MS/MS spectrum of 11β-hydroxyoralturinabol converted from oralturinabol by human recombinant steroid-11β-hydroxylase

Для оксиметолонa и оксандролонa в реакции гидроксилирования с участием рекомбинантной стероид-11β-гидроксилазы человека не было показано падение содержания ААС. Отсутствие образования 11-гидроксипроизводных в результате реакции может быть связано с 5α-пространственной конфигурацией стероидной молекулы, что затрудняет ее связывание в активном центре фермента. Известно, что конфигурация молекулы стероида в 5-положении имеет существенное влияние на ее пространственное расположение [18] и, как следствие, взаимодействие с активным центром фермента.

В то же время в исследованиях по экскреции ААС с мочой было показано, например, что исходное соединение оралтуринабол обнаруживалось в моче в течение 72 ч после однократного перорального приема [19]. Далее ААС метаболизируются в организме в ходе реакций фазы I и II биотрансформации, которые включают восстановление А-кольца, изменения в структуре D-кольца (гидроксилирование, восстановление, окисление и эпимеризация), глюкуронидную конъюгацию и сульфатирование. Данные долгоживущие метаболиты выявляются в моче человека в течение 60 дней.

#### Список цитированных источников

1. Ljungqvist, A. Brief history of anti-doping / A. Ljungqvist // *Med. Sport Sci.* – 2017. – Vol. 62. – P. 1–10.
2. World Anti-Doping Agency. The 2022 prohibited list [Electronic resource]. – Mode of access: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2022list\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2022list_en.pdf). – Date of access: 17.08.2022.
3. Thevis, M. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing / M. Thevis, T. Kuuranne, H. Geyer // *Drug Test. Anal.* – 2018. – Vol. 10, № 1. – P. 9–27.

Таким образом, дальнейшая работа по биотехнологическому получению долгоживущих метаболитов ААС с участием ферментов семейства цитохромов P450, в частности, гидроксистероид дегидрогеназ и стероидгидроксилаз, а также сульфотрансфераз и глюкуронозилтрансфераз, представляет особый интерес для допинг-контроля.

#### Заключение

В ходе выполнения исследования изучена биотрансформация ряда синтетических ААС (оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон), различающихся по структурным характеристикам, с участием рекомбинантной ферментативной системы стероид-11β-гидроксилазы человека. Получены метаболиты наиболее часто выявляемых при допинг-контроле ААС – оралтуринабола и метандиенона, которые по данным ВЭЖХ-МС/МС анализа являются 11β-гидроксипроизводными данных ААС.

Используемая в данной работе ферментативная система с соотношением компонентов стероид-11β-гидроксилаза/Adx/AdR 1:4:0,6 позволяет эффективно биотрансформировать оралтуринабол и метандиенон относительно исходного количества ААС на 90 % и 30 % соответственно.

4. World Anti-Doping Agency, Anti-Doping Testing Figures 2020 [Electronic resource]. – Mode of access: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf). – Date of access: 17.08.2022.
5. Biosynthesis of organic molecules via artificial cascade reactions based on cytochrome P450 monooxygenases / R.-J. Li [et al.] // *Green Synth. Catal.* – 2020. – Vol. 1, № 1. – P. 52–59.
6. One-pot biosynthesis of 1,6-hexanediol from cyclohexane by *de novo* designed cascade biocatalysis / Z. Zhang [et al.] // *Green Chem.* – 2020. – Vol. 22, № 21. – P. 7476–7483.

7. Schiffer, L. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited / L. Schiffer, W. Arlt, K.-H. Storbeck // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 465. – P. 4–26.
8. Payne, A. H. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones / A. H. Payne, D. B. Hales // *Endocrine Rev.* – 2004. – Vol. 25. – P. 947–970.
9. Purification and functional characterization of human 11 beta hydroxylase expressed in *Escherichia coli* / A. Zöllner [et al.] // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 275. – P. 799–810.
10. A recombinant CYP11B1 dependent *Escherichia coli* biocatalyst for selective cortisol production and optimization towards a preparative scale / L. Schiffer [et al.] // *Microb. Cell Fact.* – 2015. – Vol. 14. – Article number: 25.
11. New players in the nightwatch research / M. K. Parr [et al.] // In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (Eds.). *Recent advances in doping analysis.* Sportverlag Strauß, Cologne. 2011. – Vol. 19. – P. 60–62.
12. Unexpected contribution of cytochrome P450 enzymes CYP11B2 and CYP21, as well as CYP3A4 in xenobiotic androgen elimination – insights from metandienone metabolism / M. K. Parr [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2012. – Vol. 213. – P. 381–391.
13. Hakki, T. CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets / T. Hakki, R. Bernhardt // *Pharmacol. Therapeutics.* – 2006. – Vol. 111, №1. – P. 27–52.
14. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments / P. Fernandes [et al.] // *Enzyme Microb. Tech.* – 2003. – Vol. 32, №6. – P. 688–705.
15. Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition / N. Strushkevich [et al.] // *Mol. Endocrin.* – 2013. – Vol. 27, №2. – P. 315–324.
16. Substrate-induced modulation of protein-protein interactions within human mitochondrial cytochrome P450-dependent system / E. O. Yablokov [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2021, №208. – Article number: 105793.
17. Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria / J. D. Lambeth [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 1982. – Vol. 45. – P. 13–31.
18. Miller, W. L. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders / W. L. Miller, R. J. Auchus // *Endocrine Rev.* – 2011. – Vol. 3. – P. 81–151.
19. Controlled administration of dehydrochloromethyltestosterone in humans: urinary excretion and long-term detection of metabolites for anti-doping purpose / S. Loke [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 214. – Article number: 105978.
6. Zhang Z, Li Q, Wang F, Li R, Yu X, Kang L, Zhao J, Li A. One-pot biosynthesis of 1,6-hexanediol from cyclohexane by *de novo* designed cascade biocatalysis. *Green Chem.* 2020 Sep 23; 22(21):7476-83. DOI:10.1039/D0GC02600J.
7. Schiffer L, Arlt W, Storbeck K-H. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018 Apr 15; 465:4-26. DOI:10.1016/j.mce.2017.08.016.
8. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Rev.* 2004 Dec 1; 25:947-70. DOI:10.1210/er.2003-0030.
9. Zöllner A, Kagawa N, Waterman MR, Nonaka Y, Takio K, Shiro Y, Hannemann F, Bernhardt R. Purification and functional characterization of human 11 beta hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *FEBS J.* 2008 Jan 22; 275:799–810. DOI:10.1111/j.1742-4658.2008.06253.x.
10. Schiffer L, Anderko S, Hobler A, Hannemann F, Kagawa N, Bernhardt R. A recombinant CYP11B1 dependent *Escherichia coli* biocatalyst for selective cortisol production and optimization towards a preparative scale. *Microb. Cell. Fact.* 2015 Feb 25; 14:25. DOI:10.1186/s12934-015-0209-5.
11. Parr MK, Zöllner A, Fußhöller G, Opfermann G, Hobler A, Bernhardt R, Bureik M, Schänzer W. New players in the nightwatch research. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (Eds.). *Recent advances in doping analysis.* Sportverlag Strauß, Cologne. 2011 Feb 13th to 18th; 19:60–62.
12. Parr MK, Zöllner A, Fusshöller G, Opfermann G, Schlörer N, Zorio M, Bureik M, Schänzer W. Unexpected contribution of cytochrome P450 enzymes CYP11B2 and CYP21, as well as CYP3A4 in xenobiotic androgen elimination – insights from metandienone metabolism. *Toxicol. Lett.* 2012 Sept 18; 213:381-91. DOI:10.1016/j.toxlet.2012.07.020.
13. Hakki T, Bernhardt R. CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets. *Pharmacol Therapeutics.* 2006 Jul; 111(1):27-52. DOI:10.1016/j.pharmthera.2005.07.006.
14. Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Tech.* 2003 May 20; 32(6):688-705. DOI:10.1016/S0141-0229(03)00029-2.
15. Strushkevich N, Gilep AA, Shen L, Arrowsmith CH, Edwards AM, Usanov SA, Park HW. Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition. *Mol. Endocrinol.* 2013 Feb; 27(2):315-324. DOI:10.1210/me.2012-1287.
16. Yablokov EO, Sushko TA, Kaluzhskiy LA, Kavaleuski AA, Mezentsev YV, Ershov PV, Gilep AA, Ivanov AS, Strushkevich NV. Substrate-induced modulation of protein-protein interactions within human mitochondrial cytochrome P450-dependent system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2021 Apr; 208:105793. DOI:10.1016/j.jsbmb.2020.105793.
17. Lambeth JD, Seybert DW, Lancaster JR, Jr, Salerno JC, Kamin H. Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* 1982 May 28; 45:13-31. DOI:10.1007/BF01283159.
18. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Rev.* 2011 Feb; 3:81-151. DOI:10.1210/er.2010-0013.
19. Loke S, de la Torre X, Iannone M, La Piana G, Schlörer N, Botrè F, Bureik M, Parr MK. Controlled administration of dehydrochloromethyltestosterone in humans: urinary excretion and long-term detection of metabolites for anti-doping purpose. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2021 Nov; 214:105978. DOI:10.1016/j.jsbmb.2021.105978.

## References

1. Ljungqvist A. Brief history of anti-doping. *Med. Sport. Sci.* 2017 Jun 1; 62:1-10. DOI:10.1159/000460680.
2. World Anti-Doping Agency. The 2022 prohibited list. 2022. Available online: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2022list\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2022list_en.pdf) (accessed on 17.08.2022).
3. Thevis M, Kuuranne T, Geyer H. Annual banned-substance review: analytical approaches in human sports drug testing. *Drug Test. Anal.* 2018 Dec 18; 10(1): 9-27. DOI:10.1002/dta.v10.110.1002/dta.2336.
4. World Anti-Doping Agency, Anti-Doping Testing Figures 2020. Available online: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf) (accessed on 17.08.2022).
5. Li R-J, Zhang Z, Acevedo-Rocha CG, Zhao J, Li A. Biosynthesis of organic molecules via artificial cascade reactions based on cytochrome P450 monooxygenases. *Green Synth. Catal.* 2020 Jun; 1(1):52-9. DOI:10.1016/j.gresc.2020.05.002.

# BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ANABOLIC STEROID METABOLITES USING HUMAN RECOMBINANT STEROID-11 $\beta$ -HYDROXYLASE FOR DOPING CONTROL

---

Y. S. Bakakina<sup>1</sup>, D. V. Babaryko<sup>1</sup>, A. V. Svirid<sup>2</sup>, T. V. Shkel<sup>2</sup>,  
A. M. Tumilovich<sup>2</sup>, V. E. Syakhovich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus;

<sup>2</sup>The Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus

**Introduction.** In the field of anti-doping analysis, special attention is paid to the class of anabolic androgenic steroids (AAS), belonging to group S1 of the World Anti-Doping Agency (WADA) Prohibited list. Currently, the question of synthesis high-quality reference standards for various AAS metabolites to confirm positive test results remains open.

**Objective** – biotechnological production of synthetic anabolic steroid metabolites using human recombinant steroid-11 $\beta$ -hydroxylase enzymatic system.

**Materials and methods.** Enzyme system, including human recombinant steroid-11 $\beta$ -hydroxylase, adrenodoxin reductase and adrenodoxin, were used to study AAS biotransformation in vitro. The production of metabolites was determined using high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection.

**Results.** The presence of varying degrees of biotransformation of synthetic AAS (methandienone, oralturinabol, oxymetholone, oxandrolone) with the participation of steroid-11 $\beta$ -hydroxylase enzymatic system was shown. As a result of the reaction, a decrease in the content of oralturinabol by 90 %, methandienone – by 30 % relative to the amount of AAS taken for the reaction was observed. For oxymetholone and oxandrolone, a decrease in the content of AAS was not shown.

**Conclusions.** As a result, 11 $\beta$ -hydroxyderivatives of AAS significant in doping control – oralturinabol and methandienone were obtained. Further work on the biotechnological production of long-term AAS metabolites using cytochrome P450 enzymes is of particular interest for doping control.

**Keywords:** human recombinant steroid-11 $\beta$ -hydroxylase, synthetic anabolic-androgenic steroids, metabolites, liquid chromatography-mass spectrometry.

**For citation:** Bakakina YS, Babaryko DV, Svirid AV, Shkel TV, Tumilovich AM, Syakhovich VE. Biotechnological production of anabolic steroid metabolites using human recombinant steroid-11 $\beta$ -hydroxylase for doping control. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 37–43 (in Russian).

Поступила 31.10.2022

## ОКИСЛЕНИЕ ТИОХРОМА ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТА UVA ДИАПАЗОНА

*И. И. Степура<sup>1</sup>, С. А. Агейко<sup>1</sup>, В. И. Степура<sup>2</sup>, В. Ю. Смирнов<sup>3</sup>, А. В. Янцевич<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>*Государственное научное учреждение «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси»,*

*г. Гродно, Республика Беларусь;*

<sup>2</sup>*Учреждение образования «Гродненский государственный университет им. Янки Купалы»,*

*г. Гродно, Республика Беларусь;*

<sup>3</sup>*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,*

*г. Гродно, Республика Беларусь;*

<sup>4</sup>*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,*

*г. Минск, Республика Беларусь*

**Введение** Тиохром [2,7-диметилтиохромине-8-этанол] (TChг) впервые выделен из дрожжей (20 мг из 1,2 кг), является производным тиамин и в организме испытывает превращения с образованием ряда карбонилсодержащих продуктов.

**Цель работы** – исследовать химического строения продуктов фотолиза TChг, образованных под действием ультрафиолета UVA диапазона, на его водные растворы в аэробных условиях.

**Материалы и методы.** В работе использовали TChг, полученный химическим синтезом. В качестве фотосенсибилизатора использовали рибофлавин. Источниками излучения служили ртутная лампа и солнечный свет. Разделение и идентификацию продуктов фотолиза TChг, образовавшихся после воздействия ультрафиолета на его водные растворы, проводили методом ВЭЖХ, масс-спектрометрическими и спектрально-флуоресцентными методами.

**Результаты.** Окисление TChг под действием ультрафиолета UVA диапазона протекает в аэробных условиях с участием супероксид анионов и синглетного кислорода. В результате фотохимических реакций образуются производные тиамин, содержащие в своем составе карбонильные группы. На первой стадии фотолиза образуется ODTChг, который испытывает дальнейшее превращение. Среди продуктов фотолиза TChг обнаружены ODTChг с мономолекулярной массой 278,083. OTChг с мономолекулярной массой 276,0672, а также небольшие количества 2,3-оксо-тиамин с мономолекулярной массой 295,0860.

**Заключение.** Предполагается, что фотохимические реакции окисления TChг под действием ультрафиолета, с участием супероксиданионов и синглетного кислорода протекают также и в клеточных структурах кожи и глаза.

**Ключевые слова:** тиохром, производные тиамин, клеточные структуры, ультрафиолет.

**Для цитирования.** Окисление тиохрома под действием ультрафиолета uva диапазона / И. И. Степура [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 44–52.

### 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 TChг для данного соединения [1].

TChг также получен химическим синтезом [2]. Показано, что TChг не обладает витаминной активностью [3]. Он образуется при окислении тиамин (Т) феррицианидом, пероксидом водорода, двуокисью селена в щелочной среде [4–6]. TChг поглощает при 358 и 375 нм [6] и обладает интенсивной голубой флуоресценцией в нейтральной и щелочной средах [4]. Максимум флуоресценции TChг лежит при 445 нм, а максимум возбуждения – при

365/370 нм [7, 8]. Физико-химические свойства и важность TChг для биохимии как биологически активного соединения обсуждались ранее [9].

Определение Т флуоресцентным тиохромным методом было впервые предложено В. Jansen и соавторами в 1936 г. [10]. С тех пор тиохромный метод определения Т претерпел множество модификаций и широко использовался для определения концентраций чистых его форм в водных растворах, в продуктах питания, в фармацевтических препаратах [4, 10–13].

TChг окисляется под действием диоксида азота, генерируемого высокоокисленными формами гемопротенинов в присутствии нитрита и пероксидов [8] и под действием синглетного кислорода (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)

с образованием флуорисцирующего соединения – оксодигидротиохрома 8-(2-hydroxyethyl)-2,7-dimethyl-5-oxo-5,6-dihydrothiazole-[2,3-a]pyrimido-[4,5-d]-pyrimidine (ODTchr) [14, 15].

Хроматографические и спектральные свойства TChr и продуктов его окисления [7, 8, 14], а также химическое строение продуктов фотолиза T изучались методами абсорбционной и молекулярной спектроскопии, ПМР- и масс-спектроскопии [14, 15].

Показано, что TChr под действием ультрафиолета UVA диапазона генерирует  $^1\text{O}_2$ . Квантовый выход  $^1\text{O}_2$  при воздействии ультрафиолета UVA диапазона на водные растворы TChr равен 0,16 [16].

Кинетику фотолиза TChr в водных растворах изучали методами флуоресценции и абсорбционной спектроскопии в районе значений pH среды 7,0–12,0.

TChr под действием ультрафиолета образует ODTChr, который затем окисляется с образованием нефлуоресцирующих продуктов. Скорость де-

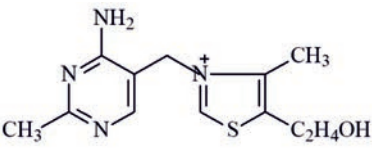
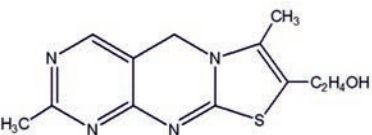
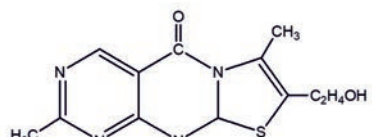
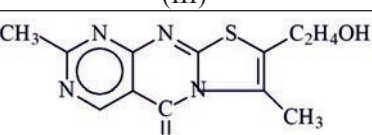
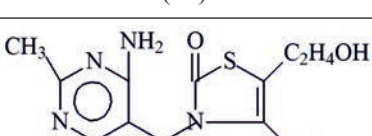
градации как TChr, так и ODTChr возрастает при увеличении значения pH среды [17].

Целью данной работы было исследование химического строения продуктов фотолиза TChr, 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

В работе использовали T и TChr фирмы Sigma (США), ферри-цитохром фирмы Fluka, ODTChr, полученный химическим синтезом [15]. В качестве фотосенсибилизатора использовали рибофлавин. Растворенный кислород удаляли, барботируя через раствор газообразный азот или добавляя в раствор высокие концентрации сульфита – 5 мМ и выше. Структурные формулы T, TChr и продуктов фотолиза TChr приведены в таблице 1. Водные

Таблица 1 – Структурные формулы T, TChr продуктов фотолиза TChr и величины m/z их молекулярных ионов  
Table 1 – Structural formulas T, TChr of photolysis products TChr and m/z values of their molecular ions

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	m/z молекулярных ионов, относительная интенсивность
<p>Тиамин (T)</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>Оксодигидротиохром (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 (OTChr)</p> <p>Массы:  <math>M_0=276,0681</math> (81,7 %)  <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-оксотиамин (2,3-охо-T)</p> <p>Массы:  <math>M_0=294,0787</math> (81,54 %)  <math>M_1=295,0813</math> (12,64 %)  <math>M_2=296,077</math> (5,06 %)</p>	 <p>(V)</p>	<p>295,0856 <math>[M_0+H]^+</math> 3847-100 %</p>

растворы TChr в кварцевой кювете облучали спектром излучения диода LED 365.

Разделение и идентификацию продуктов фотолитиза TChr, образовавшихся после воздействия ультрафиолета на его водные растворы, проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent-1100, сорбент ZORBAX-Extend-C18 с использованием соединений стандартов (TChr и ODTChr). Обработка хроматограмм проводилась в программе ChemStation B.04.01. 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 фотолитиза TChr проводили на спектрофотометре Cary-100 (США) [7].

### Результаты и их обсуждение

В Т пиримидиновый и тиазоловый компоненты соединены между собой метиленовым мостиком, фактически  $\pi$ -сопряженные системы компонентов изолированы одна от другой, и поглощают независимо. Максимумы поглощения в абсорбционном спектре Т лежат при 233 нм и 265 нм соответственно.

В спектре поглощения TChr присутствуют три полосы с максимумами 230 нм, 260 нм и 365 нм соответственно. Усиление поглощения в длинноволновой области (максимум поглощения в нейтральной среде при 365,  $\epsilon = 20\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), свидетельствует о наличии в молекуле TChr  $\pi$ -сопряженной электронной системы.

При воздействии ультрафиолета диапазона области UVA на водные растворы TChr в нейтральной среде наблюдали образование ODTChr. Максимум поглощения, характерный для TChr при 365 нм, сдвигался в коротковолновую область до 340 нм (рисунок 1), а интенсивность флуоресценции, характерной для TChr, снижается, и наблюдается небольшой коротковолновый сдвиг максимума флуоресценции,

вероятно, вызванный образованием ODTChr. На рисунке 2 представлена хроматограмма водного раствора тioxрома после облучения ультрафиолетом.

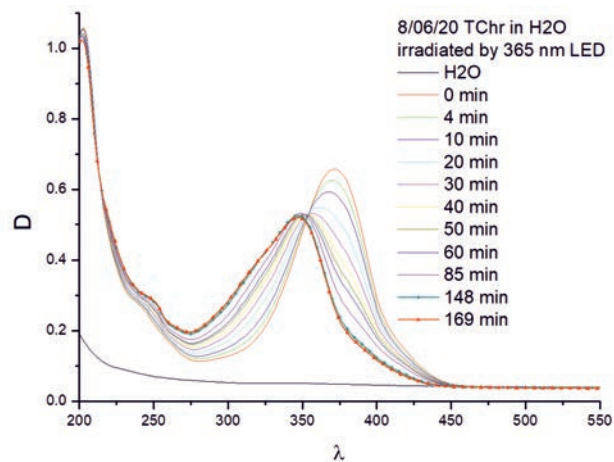


Рисунок 1 – Изменение спектров поглощения TChr в зависимости от времени воздействия UVA на его водные растворы. Водные растворы TChr в кварцевой кювете облучали спектром излучения диода LED 365 в течение 169 мин. Концентрация TChr – 35 мкМ

Figure 1 – Changes in absorption spectra TChr depending on the time of UVA exposure to its aqueous solutions. Aqueous solutions of TChr in a quartz cell were irradiated with the emission spectrum of an LED 365 diode for 169 min. TChr concentration – 35  $\mu\text{M}$

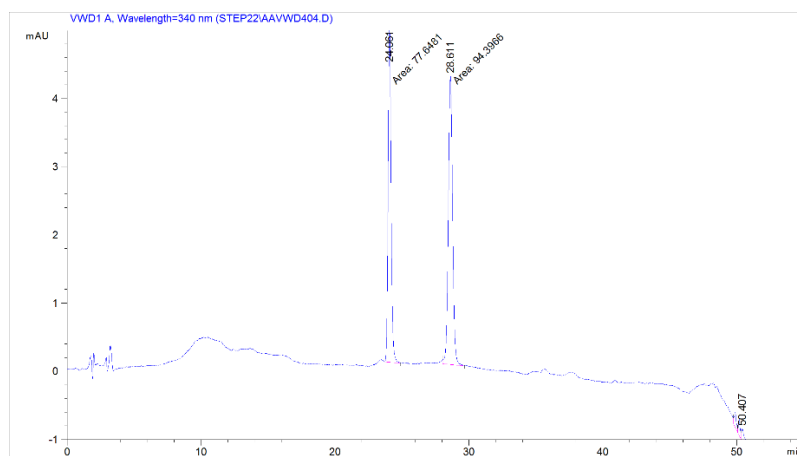


Рисунок 2 – Хроматограмма водного раствора TChr после облучения водных растворов ультрафиолетом UVA диапазона в течение 20 мин. Источник излучения – ртутная лампа ДРК-120. В качестве светофильтра пропускающего диапазон длин волн ультрафиолета UVA служила стеклянная кювета. Пик с временем удерживания  $R_t = 24,051$  мин принадлежит TChr, пик с временем удерживания  $R_t = 28,611$  мин принадлежит ODTChr

Figure 2 – Chromatogram of TChr aqueous solution exposed to UVA light during 20 min. Source of irradiation – mercury lamp DRK-120. Glass cell was used as an optical filter transmitting UVA light. The peak with retention time  $R_t = 24.05$  min corresponds to TChr, the peak with retention time  $R_t = 28.61$  min corresponds to ODTChr



Данные масс-спектропии свидетельствуют, что облучение TChr в течение небольших промежутков времени приводит к образованию ODTChr в качестве основного продукта (таблица 2).

Дальнейшее облучение растворов сопровождается снижением выхода ODTChr. Это свидетельствует о том, что ODTChr не является конечным продуктом фотолиза TChr, а испытывает дальнейшее превращение. Среди продуктов фотолиза TChr обнаружены молекулярные ионы OTChr  $m/z = 276,0672$ , а также небольшие количества молекулярных ионов 2,3-оксо-тиамина с  $m/z = 295,0860$  (V) (см. таблицу 2). Совпадение значений моноизотопных масс соответствующих изотопологов со значениями  $m/z$  пиков продуктов окислительной трансформации TChr (см. таблицу 2) позволило идентифицировать продукты фотолиза и приписать им соответствующие структуры.

Структурные формулы этих соединений приведены в таблице 1. Как видно из представленных данных, основным продуктом, в который превращается при дальнейшем облучении ODTChr, является OTChr (IV). Причем образования продуктов окисления TChr, которые имеют значение  $m/z = 295,0856$ , мало или отсутствует вовсе при малых концентрациях TChr в растворе (см. таблицу 2).

Хроматограмма водного раствора TChr, подвергнувшегося облучению светом диода LED-365 с последующим разделением продуктов

фотолиза методом ВЭЖХ и регистрацией поглощения при 320 нм, содержит интенсивный пик ODTChr с  $Rt = 26,168$  мин, а также новый пик с  $Rt = 35,632$  мин. Интенсивность пика TChr с  $Rt = 22,542$  после воздействия ультрафиолета сильно снижена (рисунок 3). Это связано не только с уменьшением концентрации TChr вследствие фотолиза, но и с тем, что максимум поглощения TChr лежит при 365 нм, а максимум поглощения OTChr лежит при 340 нм.

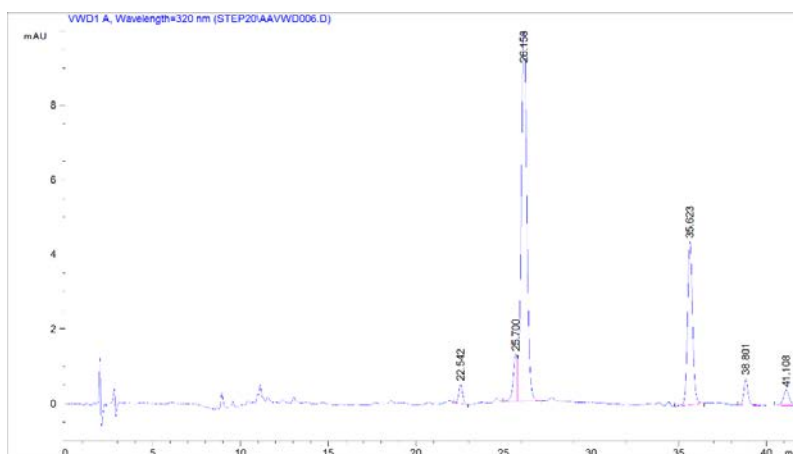


Рисунок 3 – Хроматограмма водного раствора TChr после облучения светом диода LED 365 в течение 169 мин.

Пик с временем удерживания  $Rt = 22,542$  мин принадлежит TChr, пик с временем удерживания  $Rt = 26,158$  мин принадлежит ODTChr, пик с временем удерживания  $Rt = 35,623$  мин, вероятно, принадлежит OTChr

Figure 3 – Chromatogram of an aqueous solution TChr after irradiation with LED 365 light for 169 min. Peak with retention time belongs to  $Rt = 22.542$  min belongs to TChr, peak with retention time  $Rt = 26.158$  min belongs to ODTChr, peak with retention time of  $Rt = 35.623$  min probably belongs to OTChr

Таблица 2 – Окислительная трансформация TChr под действием ультрафиолета

Table 2 – Oxidative transformation of TChr under UV Light An aqueous solution of TChr was irradiated in a quartz cuvette

Состав раствора и время воздействия UV	TChr [M <sub>0</sub> ] <sup>+</sup> $m/z = 262,0882$ , [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup> $m/z = 263,096$	ODTChr $m/z = 278,812$ [M] <sup>+</sup> $m/z = 279,0885$ [M+H] <sup>+</sup>	2,3-охо-Т $m/z = 295,0856$	OTChr $m/z = 276,0672$ $m/z = 277,076$ [M <sub>0</sub> +H] <sup>+</sup>
TChr (5 мкМ)	79 910	1348	–	–
TChr (5 мкМ) +UV-15 мин	59 873	24 831	–	–
TChr (5 мкМ) +UV-30 мин	41 169	39 266	314	–
TChr (20 мкМ)	182 111	2901	–	–
TChr (20 мкМ) +UV-15 мин	161 776	27 950	–	44681
TChr (20 мкМ) +UV-30 мин	143210	35 220	820	16354
TChr (50 мкМ) +UV-30 мин	171617	21074	3847	49 373

Примечание: водный раствор TChr облучали в кварцевой кювете. Источник ультрафиолетового излучения лампа СВД-120А. В таблице представлены значения  $m/z$  продуктов окислительной трансформации TChr.

Note: the source of ultraviolet radiation is the SVD-120A lamp. The table shows the  $m/z$  values of the products of oxidative transformation TChr.

Выход продуктов фотолиза TChr зависит от наличия растворенного в водной среде кислорода. В анаэробных условиях, после удаления растворенного кислорода барботированием азота, окисления TChr не наблюдали ни под действием полного спектра лампы СВД-120, ни под действием солнечного излучения.

Эти результаты свидетельствуют об участии кислорода в образовании продуктов фотолиза TChr. Участие кислорода в окислении TChr связано с возможным образованием активных форм кислорода –  $^1\text{O}_2$  или супероксиданионов при воздействии ультрафиолета.

В случае молекулы TChr происходит оттягивание электронной плотности с атома углерода метиленового мостика триазоловым и аминопиримидиновыми циклами. На атоме водорода возникает дробный положительный заряд.

После поглощения ультрафиолета UVA диапазона и видимого света молекулами TChr происходит переход молекулы TChr в возбужденное синглетное состояние. Короткоживущее синглетное состояние дезактивируется вследствие испускания квантов флуоресценции [7] и фотоэжектирования электронов с образованием гидратированных электронов.

Гидратированный электрон может быть представлен в виде электрона, окруженного ориентированными молекулами воды. С молекулой кислорода гидратированный электрон взаимодействует с константой скорости реакции, равной  $1,9 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  и образует супероксиданион [18]. Первичной стадией, вероятно, является перенос электрона в раствор с последующим быстрым переносом протона. Затем происходит взаимо-

действие супероксиданиона с свободным радикалом молекулы TChr, образование пероксида TChr, присоединение гидроксила к углероду метиленового мостика и после внутримолекулярной перегруппировки – образование ODTChr. Предполагаемая схема образования ODTChr при воздействии ультрафиолета UVA диапазона на водные растворы TChr в аэробных условиях представлена на рисунке 4.

В присутствии высоких концентраций цистеина, глутатиона окисление TChr сильно ингибировалось (таблица 3). Эти серосодержащие соединения с высокими константами скорости взаимодействия с гидратированными электронами и уменьшают образование супероксиданионов, а следовательно, и выход ODTChr (см. таблицу 3).

После добавления в раствор TChr ферри-цитохрома с, который является ловушкой супероксиданионов, скорость фотоокисления TChr уменьшалась, а ферри-цитохром с восстанавливался в ферро-форму.

Полученные результаты позволяют предположить, что супероксиданионы вносят значительный вклад в образование ODTChr в процессе фотолиза TChr под действием ультрафиолета UVA диапазона.

Короткоживущие синглетные состояния TChr дезактивируются не только вследствие испускания квантов флуоресценции (квантовый выход флуоресценции равен 0,28) [7] и фотоэжектирования электронов (рисунок 4), но и вследствие протекания процесса интеркомбинационной конверсии, приводящей к образованию долгоживущих триплетных состояний [16].

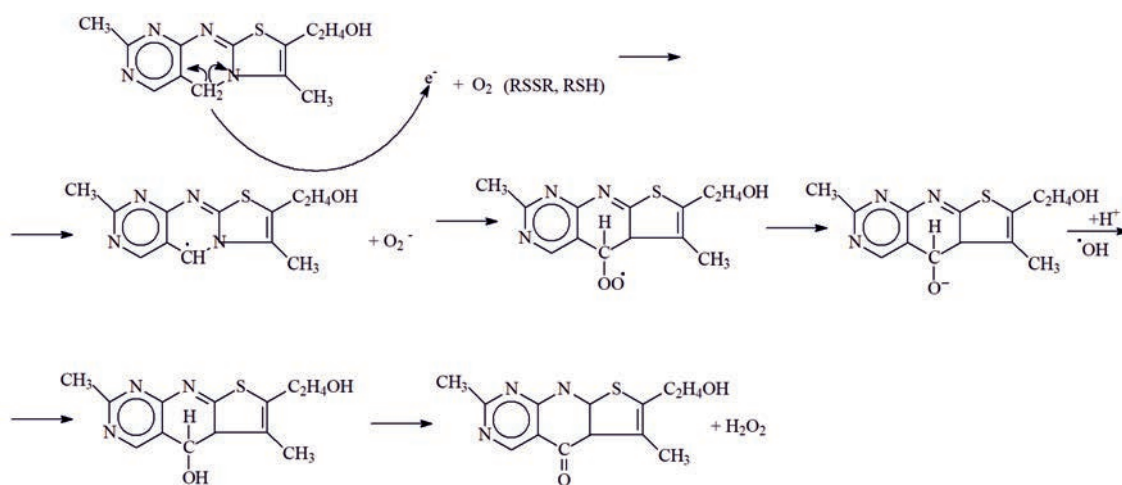


Рисунок 4 – Предполагаемая схема образования ODTChr при воздействии ультрафиолета UVA диапазона на водные растворы TChr в атмосфере воздуха

Figure 4 – Suggested Scheme of ODTChr Formation Under Exposure to UVA Range Aqueous Solutions of TChr in Air

Таблица 3 – Убыль концентрации TChr после воздействия ультрафиолета UVA диапазона на его водные растворы в присутствии акцепторов электронов

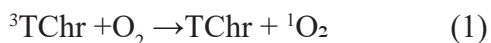
Table 3 – The decrease in TChr concentration after exposure to UVA range ultraviolet on its aqueous solutions in the presence of electron acceptors

Состав растворов и время облучения	Константы скорости реакции гидратированных электронов с аминокислотами и глутатионом М <sup>-1</sup> Ч	TChr, мкМ и (%)	ODTChr и другие продукты, мкМ и (%)
TChr без облучения	–	20 (100 %)	0
TChr после облучения	–	15,09 (75,44 %)	4,31 (24,56 %)
TChr + GSSG (0,1 мМ), после облучения	1,3 · 10 <sup>10</sup>	16,50 (82,48 %)	3,50 (17,52 %)
TChr + GSSG (0,5 мМ), после облучения	1,3 · 10 <sup>10</sup>	16,64 (83,15 %)	3,36 (16,85 %)
TChr + L-Cys (0,1 мМ), после облучения	1,3 · 10 <sup>10</sup>	16,49 (82,46 %)	3,51 (17,54 %)
TChr+ GSH (0,1 мМ), после облучения	8,7 · 10 <sup>9</sup>	17,58 (87,92 %)	2,42 (12,08 %)

*Примечание:* концентрация TChr до облучения – 20 мкМ. Начальная концентрация TChr в растворе принята за 100 %. Источник ультрафиолета UVA диапазона – ртутная лампа ДРК-120, светофильтром служат стенки стеклянной кюветы. Время облучения – 30 мин. Длина волны возбуждения флуоресценции тиохрома – 360 нм, интенсивность флуоресценции измеряли при 450 нм.

*Note:* the concentration of TChr before irradiation was 20 μM. The initial concentration of TChr in the solution was taken as 100 %. The source of ultraviolet radiation in the UVA range is a DRK-120 mercury lamp, the walls of a glass cuvette serve as a light filter. Irradiation time – 30 min. Thiochrome fluorescence excitation wavelength 360 nm, fluorescence intensity measured at 450 nm.

Константа скорости тушения кислородом триплетных состояний органических сенсibilizаторов находится в диапазоне 10<sup>9</sup> М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> – 3 · 10<sup>9</sup> М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> [20], поэтому в аэробных условиях происходит эффективное тушение кислородом долгоживущих триплетных уровней тиохрома с образованием синглетного кислорода.



Квантовый выход генерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> при воздействии ультрафиолета на молекулы TChr равен 0,16 [16].

Синглетный кислород взаимодействует с TChr и окисляет его с образованием ODTChr [19]. Дру-

гие акцепторы конкурируют за синглетный кислород и могут ингибировать реакцию окисления TChr синглетным кислородом [20, 21]. Известно, например, что 6 аминокислот взаимодействуют с синглетным кислородом [20] и при высоких концентрациях способны выступать в качестве эффективных ловушек синглетного кислорода. При концентрации аминокислоты, например, гистидина, равной 5мМ, количество синглетного кислорода уменьшится вдвое вследствие его взаимодействия с аминокислотой. Это приводит к снижению скорости окисления TChr в присутствии аминокислот (таблица 4).

После воздействия ультрафиолета диапазона UVA на водные растворы TChr в смеси с ци-

Таблица 4 – Убыль концентрации TChr после воздействия ультрафиолета UVA диапазона на его водные растворы в присутствии аминокислот

Table 4 – The decrease in TChr concentration after exposure to UVA range ultraviolet on its aqueous solutions in the presence of amino acids

Состав растворов и время облучения	Константы скорости реакции синглетного кислорода с аминокислотами М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	TChr, мкМ и (%)	ODTChr и другие продукты, мкМ и (%)
TChr без облучения		20 (100 %)	0
TChr 30 мин после облучения		15,09 (75,44 %)	4,31 (24,56 %)

Состав растворов и время облучения	Константы скорости реакции синглетного кислорода с аминокислотами $M^{-1} c^{-1}$	TChr, мкМ и (%)	ODTChr и другие продукты, мкМ и (%)
TChr + His (5 мМ), после облучения	$6,0 \cdot 10^7$	16,44 (82,21 %)	3,56 (17,79 %)
TChr + His (10 мМ), после облучения	$6,0 \cdot 10^7$	16,91 (84,57 %)	3,09 (15,43 %)
TChr + Met (5 мМ), после облучения	$3,0 \cdot 10^7$	15,32 (76,59 %)	4,68 (23,41 %)
TChr + Met (10 мМ), после облучения	$3,0 \cdot 10^7$	15,84 (79,20 %)	4,16 (20,80 %)

*Примечание:* концентрация TChr – 20 мкМ. Источник ультрафиолета UVA диапазона – ртутная лампа ДРК-120, светофильтром служат стенки стеклянной кюветы. Время облучения растворов – 30 мин. Длина волны возбуждения флуоресценции TChr – 360 нм, интенсивность флуоресценции измеряли при 450 нм.

*Note:* TChr concentration – 20  $\mu$ M. The source of ultraviolet radiation in the UVA range is a mercury lamp DRK-120, the walls of a glass cuvette serve as a light filter. Solution irradiation time – 30 min. Fluorescence excitation wavelength TChr – 360 nm, fluorescence intensity measured at 450 nm.

тохромом *c* в нейтральной среде наблюдали образование ODTChr. Максимум поглощения, характерный для TChr при 365 нм, сдвигался в коротковолновую область. Скорость фотоокисления TChr уменьшалась, а ферри-цитохром *c*, который является ловушкой супероксид анионов частично восстанавливался в ферро-форму (рисунок 5).

Кроме того, в спектре поглощения облученной смеси наблюдали образование новых полос поглощения с перекрывающимися максимумами при 310 и 320 нм, принадлежащих продуктам окисления ODTChr.

Водный раствор ферри-цитохрома *c* устойчив к действию ультрафиолета диапазона UVA и не восстанавливался в ферро-форму цитохрома *c* отсутствие в растворе TChr.

### Закключение

Суммируя полученные результаты, можно предположить, что окисление TChr под действием ультрафиолета UVA диапазона протекает в аэробных условиях с участием супероксиданионов и синглетного кислорода. В результате фотохимических реакций образуются производные тиамин, содержащие в своем составе карбонильные группы.

Супероксиданионы взаимодействуют со свободнорадикальными продуктами фотолиза TChr.

На первой стадии фотолиза образуется ODTChr, который испытывает дальнейшее превращение. Среди продуктов фотолиза TChr обнаружены ODTChr с мономолекулярной массой 278,083, ODTChr с мономолеку-

лярной массой 276,0672, а также небольшие количества 2,3-оксо-тиамина с мономолекулярной массой 295,0860.

Синглетный кислород, который генерируется молекулами TChr в водном растворе, при воздей-

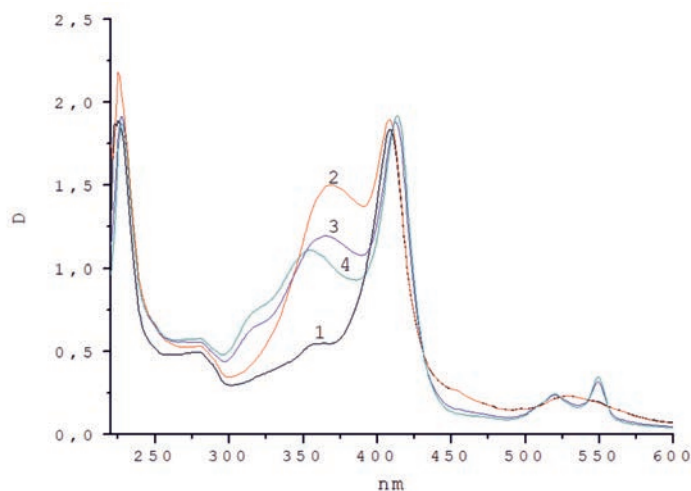


Рисунок 5 – Спектр поглощения цитохрома *c* (1) и изменение спектров поглощения водных растворов цитохрома *c* в смеси с TChr в зависимости от времени воздействия UVA (2–4).

Водные растворы цитохрома *c* в смеси с TChr в стеклянной кювете без облучения (2), после облучения 30 мин (3), после облучения 60 мин (4). Концентрация цитохрома *c* – 20 мкМ, концентрация TChr – 50 мкМ стеклянная кювета, ртутная лампа ДРК-120

Figure 5 – Absorption spectrum of Cytochrome *c* (1) and spectral changes in absorption of aqueous solution of Cytochrome *c* and TChr under exposure to UVA light with time (2–4). Aqueous solution of Cytochrome *c* with TChr in a glass cell before irradiation (2), after irradiation 30 min (3) and 60 min (4). Concentrations of Cytochrome *c* – 20  $\mu$ M, TChr – 50  $\mu$ M. Exposure in a glass cell to light of a mercury lamp DRK-120

ствии ультрафиолета UVA диапазона, окисляет молекулы TChr с образованием 2,3-оксо-тиамина молекулярной массой 295,0860.

Мы предполагаем, что эти реакции протекают в клеточных структурах глаз и кожи под действием солнечного излучения.

### Благодарности

Работа выполнялась при поддержке программы «Трансляционная медицина» на 2021–2025 годы (подпрограмма «Экспериментальная медицина») по договору от 17 февраля 2021 г. № 04/21/2021-29-019.

### Acknowledgements

This work was supported by the program «Translational Medicine» for the years 2021–2025 (subprogram «Experimental Medicine») according to the agreement as of February 2021, No 04/21/2021-29-019.

### Список цитированных источников

1. About a yellow, sulfurcontaining dye from yeast / R. Kuhn [et al.]. // *J. Physiol. Chem.* – 1935. – Vol. 234 – P. 196–198.
2. Синтез тиохрома : пат. Яп. 8287 / К. Миятакэ, Т. Ота. – Опубл. 1960.
3. Kuhn, R. Thiochrome / R. Kuhn // *Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch.* – 1935. – Vol. 68. – P. 2375–2385.
4. Березовский, В. М. Химия витаминов / В. М. Березовский – М.: Пищепромиздат, 1973. – 632 с.
5. Metzler, D. E. Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells / D. E. Metzler // N.Y.: Academic Press. – 1977. – Vol. 2. – 608 p.
6. Островский, Ю.М. Экспериментальная витаминология / Ю.М. Островский – М.: Наука и техника, 1979. – 550 с.
7. Fluorescent properties of thiochrome in solvents of different polarity / N. N. Bubeshko [et al.] // *J. Applied Spectrosc.* – 2011. – Vol. 78, № 3. – P. 337.
8. 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.
9. Stepuro, I. I. Thiamine and vasculopathies / I. I. Stepuro // *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids.* – 2005. – Vol. 72, № 2. – P. 115–127.
10. Jansen, B. C. P. A chemical determination of aneurin (vitamin B<sub>1</sub>) by the thiochrome reaction / B. C. P. Jansen // *J. Recueil des Travaux chimiques des Pays-Bas et de la Belgique.* – 1936. – Vol. 55. – P. 1046–1052.
11. Determination of urinary thiamin by the thiochrome method / M. H. Dong [et al.] // *J. Clin. Biochem.* – 1981. – Vol. 14, № 1. – P. 16–18.
12. Spectrofluorimetric determination of vitamin B1 using horseradish peroxidase as catalyst in the presence of hydrogen peroxide / M. A. Khan [et al.] // *J. Luminescence.* – 2009. – Vol. 24, № 2. – P. 73–78.
13. 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.
14. Structure of a thiochrome transformation product / D. A. Oparin [et al.] // *J. Chem. Natur. Comp.* – 1985. – Vol. 21, № 5. – P. 688–689.
15. 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.
16. Photosensitized formation of singlet oxygen by vitamins of the B group / B. M. Dzharov [et al.] // *J. Applied. Spectrosc.* – 1995. – Vol. 62, № 2. – P. 285–289.
17. Photolysis of thiochrome in aqueous solution: A kinetic study / Z. Anwar [et al.] // *J. Photochem. Photobiol.* – 2020. – Vol. 203. – P. 111766.

18. Swallow, A. J. Radiation chemistry / A. J. Swallow; ed. I. V. Vereshchinsky. – М.: Longman. – 1973. – 280 p.
19. Riboflavin-photosensitized thiamine oxidation in aqueous solutions on exposure to ultraviolet and visible light / I. I. Stepuro [et al.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series.* – 2020. – Vol. 65, № 2. – P. 199–211. DOI:29235/1029-8940-2020-65-2-000-000.
20. Foote, Ch. S. Photosensitized oxidation and singlet oxygen. Biological consequences / Ch. S. Foote // *J. Free Radic. Biol.* – 1979. – P. 96–150.
21. Krasnovsky, A. A. Photodynamic regulation of biological processes: primary mechanisms // *Problems of regulation in biological processes* / A. A. Krasnovsky; ed. A. B. Rubin. – М.: Izhevsk: Research Center «Regular and Chaotic Dynamics». – 2006. – P. 223–254.

### References

1. Kuhn R, Wagner-Jauregg T, van Klaveren FW, Vetter H, Kuhn R. About a yellow, sulfurcontaining dye from yeast. *Journal of Physiology Chemistry*, 1935, vol. 234, pp.196–198.
2. Miyatake, K, Ohta, G, Uchimaru, F.: Synthesis of Thiazole Derivatives. IV. On the Formation of Thiochrome. – 1960.
3. Kuhn R. Thiochrome. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1935, vol. 68, pp. 2375–2385.
4. Berezovsky VM. *Vitamin Chemistry*, Pishchevaya Premyshlennost. Moscow, 1973, p. 632.
5. Metzler DE. Biochemistry. *The Chemical Reactions of Living Cells*, N.Y.: Academic Press, 1977, vol. 2. 608 p.
6. Ostrovsky YuM. *Experimental vitaminology* / Yu.M. Ostrovsky – М.: Science and Technology, 1979, 550 p.
7. Bubeshko NN, Stsiapura VI, Stepuro II. Fluorescent properties of thiochrome in solvents of different polarity. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2011, vol. 78, no. 3, pp. 337.
8. Stepuro II, Oparin AY, Stsiapura VI, Maskevich SA, Titov VY. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide. *Journal of Biochemistry*, 2012, vol. 77, no. 1, pp. 41–55.
9. Stepuro II. Thiamine and vasculopathies. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 2005, vol. 72, no. 2, pp. 115–127.
10. Jansen BCP. A chemical determination of aneurin (vitamin B1) by the thiochrome reaction. *Recueil des Travaux chimiques des Pays-Bas et de la Belgique*, 1936, vol. 55, pp. 1046–1052.
11. Dong MH, Green MD, Sauberlich HE. Determination of urinary thiamin by the thiochrome method. *Journal of Clinical and Biochemistry*, 1981, vol. 14, no. 1, pp. 16–18.
12. Khan MA, Jin SO, Lee SH, Chung HY. Spectrofluorimetric determination of vitamin B1 using horseradish peroxidase as catalyst in the presence of hydrogen peroxide. *Journal of Luminescence*, 2009, vol. 24, no. 2, pp. 73–78.

- 13 Zhu J, Liu S, Liu Z, Li Y, Qiao M, Hu X. Enhanced spectrofluorimetric determination of hypochlorite based on the catalytic oxidation of thiamine to thiochrome in the presence of trace ferrocyanide. *RSC Advances*, 2014, vol. 4, no. 12, pp. 5990–5994.
- 14 Oparin DA, Stepuro II, Kondakov VI, Zimatkina TI, Buko VU, Larin FS, Ostrovskii YM. Structure of a thiochrome transformation product. *Journal of Chemistry Nature Compact*, 1985, vol. 21, no. 5, pp. 688–689.
- 15 Stepuro II, Oparin DA, Ignatenko VA, Zabrodskaya SV, Zimatkina TI, Volkova GN. Structure of the product of photochemical oxidation of thiochrome. *Journal of Chemistry Nature Compact*, 1989, vol. 25, no. 4, pp. 503–504.
- 16 Dzhagarov BM, Kruk NN, Konovalova NV, Solodunov AA, Stepuro II. Photosensitized formation of singlet oxygen by vitamins of the B group. *Journal of Applied Spectroscopy*, 1995, vol. 62, no. 2, pp. 285–289.
- 17 Anwar Z, Sheraz MA, Ahmed S, Mustaan N, Khurshid A, Gul W, Ahmad I. Photolysis of thiochrome in aqueous solution: A kinetic study. *Journal of Photochemistry Photobiology*, 2020, vol. 203, pp. 111766.
- 18 Swallow AJ. *Radiation chemistry*. Ed. I.V. Vereshchinsky. M: Moscow Longman, 1973. 280 p.
- 19 Stepuro II, Labor SA, Stsiapuro VI, Yantsevich AV. Riboflavin-photosensitized thiamine oxidation in aqueous solutions on exposure to ultraviolet and visible light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 199–211. DOI:29235/1029-8940-2020-65-2-000-000.
- 20 Foote ChS. Photosensitized oxidation and singlet oxygen. Biological consequences. *Journal Free Radicals in Biology*, 1979, pp. 96–150.
- 21 Krasnovsky AA. *Photodynamic regulation of biological processes: primary mechanisms // Problems of regulation in biological processes*. Ed. AB Rubin. M. Izhevsk: Research Center «Regular and Chaotic Dynamics», 2006, pp. 223–254.

## THIOCHROME OXIDATION ON EXPOSURE TO ULTRAVIOLET OF UVA RANGE

---

*I. I. Stepuro<sup>1</sup>, S. A. Ageiko<sup>1</sup>, V. I. Stsiapura<sup>2</sup>, V. Yu. Smirnov<sup>3</sup>, A. V. Yantsevich<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, Belarus*

**Introduction.** Thiochrome [2,7-dimethylthiochromine-8-ethanol] (TChr) was first isolated from yeast (20 mg per 1.2 kg), is a thiamine derivative and undergoes transformations in the body with the formation of a number of carbonyl-containing products.

**Objective** – to study the chemical structure of TChr photolysis products formed under the action of UVA ultraviolet on its aqueous solutions under aerobic conditions.

**Materials and methods.** We used TChr obtained by chemical synthesis. Riboflavin was used as a photosensitizer. The sources of radiation were a mercury lamp and sunlight. Separation and identification of the photolysis products of TChr, formed after exposure to ultraviolet light on its aqueous solutions, was carried out by HPLC, mass spectrometry, and spectral fluorescence methods.

**Results.** Oxidation of TChr under the action of ultraviolet UVA range proceeds under aerobic conditions with the participation of superoxide anions and singlet oxygen. As a result of photochemical reactions, thiamine derivatives containing carbonyl groups are formed. At the first stage of photolysis, ODTChr is formed, which undergoes further transformation. Among the products of TChr photolysis, ODTChr with a monomolecular mass of 278.083 was found. OTChr with a monomolecular weight of 276.0672, as well as small amounts of 2,3-oxo-thiamine with a monomolecular weight of 295.0860.

**Conclusions.** It is assumed that photochemical reactions of TChr oxidation under the influence of ultraviolet, with the participation of superoxide anions and singlet oxygen, also occur in the cellular structures of the skin and eyes.

**Keywords:** thiochrome, thiamine derivatives, cell structures, ultraviolet.

**For citation:** Stepuro II, Ageiko SA, Stsiapura VI, Smirnov VYu, Yantsevich AV. Thiochrome oxidation on exposure to ultraviolet of UVA range. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 44–52 (in Russian).

*Поступила 09.01.2023*

## ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТАНОЛАМИДОВ И ДИЭТАНОЛАМИДОВ ПАЛЬМИТИНОВОЙ И РИЦИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ *IN VITRO*

Т. И. Терпинская<sup>1</sup>, Т. Л. Янченко<sup>1</sup>, М. В. Лисовская<sup>2</sup>, Е. Ф. Полукошко<sup>1</sup>, А. Л. Михальчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Государственное научное учреждение «Институт физиологии

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

**Введение.** Данные о биологической активности этаноламидов жирных кислот свидетельствуют о перспективности поиска в этой группе новых соединений с противоопухолевым эффектом.

**Цель исследования** – сравнительное исследование противоопухолевого эффекта этанол- и диэтанол-амидов пальмитиновой и рицинолевой кислоты.

**Материалы и методы.** Оценивали влияние моно- и диэтанол-амидов пальмитиновой и рицинолевой кислоты на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток глиомы *S6* и *Hela* после 48-часового культивирования методом проточной цитометрии.

**Результаты.** Пальмитоилэтанол-амид снижал жизнеспособность клеток глиомы *S6* на 10 % и пролиферацию на 24 %, но не влиял на клетки *Hela*. Рициноилэтанол-амид снижал жизнеспособность клеток глиомы *S6* на 2 %, а пролиферативную активность – на 29 %, не влияя на жизнеспособность клеток *Hela*, но снижая их пролиферацию на 37 %. Пальмитоилдиэтанол-амид снижал жизнеспособность и пролиферацию клеток глиомы *S6* на 49 и 74 %, *Hela* – на 35 и 74 %. Рициноилдиэтанол-амид снижал жизнеспособность клеток глиомы *S6* на 14 %, пролиферацию – на 37 %, клеток *Hela* – на 1 и 48 % соответственно. Показана дозозависимость эффектов исследованных соединений.

**Заключение.** Противоопухолевый эффект изученных этаноламидов жирных кислот определяется их структурой и зависит от типа клеток. Из исследованных соединений наиболее выраженные цитотоксический и антипролиферативный эффекты показал пальмитоилдиэтанол-амид.

**Ключевые слова:** этаноламиды жирных кислот, рициноилэтанол-амид, пальмитоилэтанол-амид, рициноилдиэтанол-амид, пальмитоилдиэтанол-амид, рак, опухоль.

**Для цитирования.** Противоопухолевая активность этаноламидов и диэтанол-амидов пальмитиновой и рицинолевой кислоты *in vitro* / Т. И. Терпинская [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 53–59.

### Введение

Этанол-амиды жирных кислот (ЭАЖК) представляют собой большую группу соединений, включающую вещества с плейотропной биологической активностью. Среди наиболее изученных соединений этого класса – пальмитоилэтанол-амид (ПЭА). Показано, что ПЭА проявляет противовоспалительную, анальгетическую, антиаллергическую активность [1]. Эксперименты продемонстрировали противоопухолевое действие ПЭА и ряда других соединений со сходной структурой в отношении колоректального рака [2], рака легких [3], нейроblastомы [4] и меланомы [5]. Это свидетельствует о перспективности поиска новых противоопухолевых агентов среди соединений этой группы.

Цель данного исследования – провести сравнительное исследование противоопухолевого эффекта нескольких различных по структуре ЭАЖК.

Выбранные для исследования ЭАЖК различаются как по жирнокислотному, так и по этанола-

минному фрагментам молекулы, в качестве базовой структуры которой мы будем рассматривать ПЭА как наиболее представительного члена этого ряда. Помимо эффектов ПЭА, содержащего ацильный остаток насыщенной жирной кислоты (пальмитиновой), в работе изучены эффекты рициноилэтанол-амида (РЭА), содержащего ацильный остаток  $C_{18}$ - $\omega$ -9-12-ОН карбоновой кислоты (рицинолевая, или 12-гидрокси-9-*цис*-октадецен-овая кислота). Кроме того, в работе исследовано влияние на жизнеспособность и пролиферацию опухолевых клеток изменения этанола-амидного фрагмента ЭАЖК – с эффектами моноэтанол-амидов ПЭА и РЭА сравнили эффекты пальмитоилдиэтанол-амида (ПДЭА) и рициноилдиэтанол-амида (РДЭА).

### Материалы и методы

**Клеточные линии.** Работа проведена на клеточных линиях *Hela* (рак шейки матки, человек)

и глиома С6 (крыса) из коллекции РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь.

**Исследуемые соединения:** этаноламиды и диэтанолламиды пальмитиновой и рицинолевой кислот – ПЭА, ПДЭА, РЭА и РДЭА – получены в рамках общих синтетических методов органического синтеза. В частности, ПЭА и ПДЭА получены аминлизом метилового эфира этанол- и диэтанолламидами и по усовершенствованному методу смешанных ангидридов [6]. РЭА получен аминлизом метилового эфира рицинолевой кислоты этаноламином и методом смешанных ангидридов с промежуточной защитой гидроксильной группы. РДЭА получен аминлизом метилового эфира рицинолевой кислоты в условиях щелочного катализа.

**Проведение экспериментов.** Клетки высевали в лунки 96-луночных планшетов (Corning) в среде ДМЕМ с добавлением 10 % ЭТС и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В) (все Sigma). Вносили в лунки ЭАЖК в конечной концентрации 500 мкМ, либо в концентрациях, снижающихся от 500 до 0,05 мкМ при десятичных разведениях. В контроле вместо ЭАЖК вносили растворитель (диметилсульфоксид в конечной концентрации 0,1 %). Общий объем клеточной суспензии в лунках составлял 220 мкл. Культивировали 48 ч при +37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Затем снимали клетки с планшета. Для этого из лунки забирали всю среду с не прикрепившимися клетками и переносили в пробирку для проточной цитометрии. В лунку вносили 100 мкл раствора трипсина – ЭДТА (0,25 % трипсин – 0,02 % ЭДТА, Sigma-Merck), через 10–15 мин снимали клетки с подложки и переносили в ту же пробирку для цитометрии. Открепление клеток от субстрата и полноту их снятия с подложки контролировали с помощью инвертированного микроскопа (Leica DMIL). Затем вносили в лунку еще 100 мкл изотонического раствора хлорида натрия, мягко пипетировали и переносили в пробирку, добавляя к той же пробе. Общий объем пробы, полученной из каждой лунки, составлял 420 мкл. Для оценки жизнеспособности клетки окрашивали красителем пропидий йодидом (Sigma). Для определения количества клеток использовали референтные флуоросферы FLOW-COUNT™ (Beckman Coulter) согласно инструкции производителя. Клеточные пробы анализировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II с программным обеспечением Diva 7.0 (Becton Dickinson).

**Статистическая обработка.** Полученный цифровой материал обрабатывали стандартными статистическими методами с помощью пакетов программ Excel и Statistica 7. При расчетах объединяли данные 2–5 независимых экспериментов, в каждом из которых  $n = 4–6$ . Общее количество

повторностей ( $n$ ) при изучении ЭАЖК в дозах 500 мкМ – от 14 до 24, при исследовании дозовой зависимости – от 8 до 16 в различных сериях. Данные представлены в виде средней и ее стандартной ошибки. Различия между сериями считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  согласно критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Исследования жизнеспособности клеток глиомы С6, подвергшихся влиянию исследуемых ЭАЖК, показали, что ПЭА снижал этот показатель на 10 %, РЭА – на 3 % (рисунок 1 а). ПДЭА способствовал снижению жизнеспособности клеток в 2 раза, РДЭА – на 14 % (см. рисунок 1 а). Таким образом, ПЭА проявлял цитотоксический эффект. Остаток рицинолевой кислоты в сравнении с пальмитиновой кислотой в составе ацильных фрагментов моноэтаноламидов слабо изменял цитотоксический эффект, а дополнительная этанольная группа в структуре этаноламинного фрагмента способствовала значительному усилению цитотоксического действия ПДЭА по сравнению с ПЭА.

В составе ацильного фрагмента диэтанолламида остаток рицинолевой кислоты по сравнению с остатком пальмитиновой кислоты снижал цитотоксичность. Из рисунка 1 а видно, что ПДЭА проявлял большую цитотоксическую активность, чем РДЭА.

При оценке роли дополнительной этанольной группы в амидном фрагменте соединений, содержащих рицинолеву кислоту, видно, что РДЭА более цитотоксичен, чем РЭА, но этот эффект выражен слабо.

Таким образом, усилению цитотоксичности в отношении глиомы С6 способствовали остаток пальмитиновой кислоты в структуре жирнокислотного фрагмента и дополнительная этанольная группа в составе аминного фрагмента.

В опытах с клетками *Hela* при действии ПЭА и РЭА не выявлено клеточной гибели, ПДЭА и РДЭА снижали количество жизнеспособных клеток в пробах на 35 и 1 % (рисунок 1 б). Следовательно, клетки *Hela* были менее чувствительны к цитотоксическому действию этих ЭАЖК, чем клетки глиомы С6. Как и в опытах с клетками глиомы С6, ПДЭА проявлял более выраженный эффект, чем ПЭА, присутствие остатка рицинолевой кислоты вместо пальмитиновой значительно снижало эффект дополнительной этанольной группы. Остаток пальмитиновой кислоты в ацильном фрагменте диэтаноламидов способствовал большей цитотоксичности по сравнению с остатком рицинолевой кислоты.

Все исследуемые ЭАЖК подавляли пролиферацию опухолевых клеток. Эффекты ПЭА и РЭА на



глиому *C6* практически не отличались, снижая концентрацию клеток в пробах на 24 и 29 % (рисунок 2 *a*). Диэтаноламиды более выражено снижали пролиферативную активность по сравнению с моноэтаноламидами – при действии ПДЭА концентрация клеток была на 74 % меньше, чем в контроле, при действии РДЭА – на 37 % (см. рисунок 2 *a*).

Клетки *Hela* были нечувствительны к действию ПЭА, в то время как РЭА подавлял их пролиферацию на 37 % (рисунок 2 *b*). Диэтаноламиды подавляли пролиферацию в большей степени, чем этаноламиды: ПДЭА – на 74, а РДЭА – на 48 %.

Как свидетельствуют эти данные, клетки глиомы *C6* были более чувствительны к ПЭА, чем клетки *Hela*, в то время как антипролиферативное действие других исследованных ЭАЖК в отношении двух типов клеток было сходным. Остаток рицинолевой кислоты в сравнении с остатком пальмитиновой кислоты в составе моноэтаноламидов не влиял на антипролиферативный эффект в отношении глиомы *C6* и усиливал его в отношении клеток *Hela*. Дополнительная этанольная группа в составе диэтаноламидного фрагмента в ЭАЖК, содержащих в качестве ацильного фрагмента пальмитиновую кислоту, способствовала антипролиферативному действию. Если вместо остатка пальмитиновой кислоты в соединении присутствовал остаток рицинолевой кислоты, то эффект моно- и диэтаноламидов отличался слабо.

Общий эффект ЭАЖК на опухолевые клетки, обусловленный цитотоксическим и антипролиферативным действием, представлен на рисунке 3. Количество жизнеспособных клеток в пробах глиомы *C6* под действием ПЭА и РЭА было снижено на 28 и 30 % соответственно (рисунок 3 *a*). ПДЭА оказывал значительно более мощный эффект, чем ПЭА, снижая количество живых клеток в пробах на 84 %.

При действии РДЭА выявлена тенденция к усилению эффекта по сравнению с РЭА, хотя и не достигающая статистической значимости.

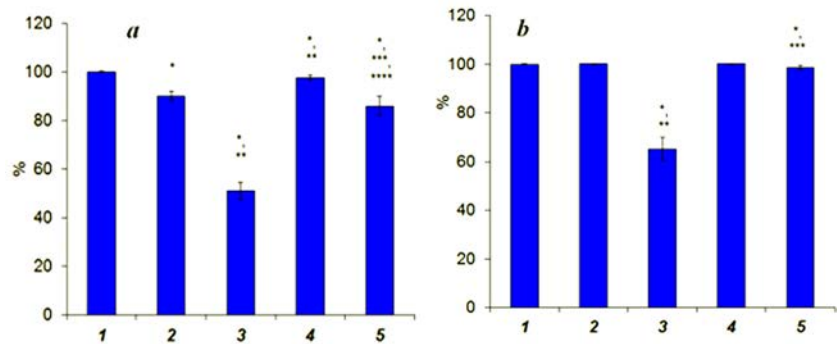


Рисунок 1 – Жизнеспособность клеток глиомы *C6* (*a*) и *Hela* (*b*) при воздействии 0,1 % диметилсульфоксида (контроль) – 1, 500 мкМ пальмитоилэтаноламида – 2, пальмитоилдиэтаноламида – 3, рициноилэтаноламида – 4, рициноилдиэтаноламида – 5. По горизонтальной оси – серия опыта, по вертикальной оси – жизнеспособность клеток, % от контроля. \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем (серия 1), \*\*  $p < 0,05$  при сравнении серий 2–3, 2–4; \*\*\*  $p < 0,05$  при сравнении серий 3–5; \*\*\*\*  $p < 0,05$  при сравнении серий 4–5 (те же обозначения и на рисунках 2, 3)

Figure 1 – Viability of glioma *C6* (*a*) and *Hela* (*b*) cells exposed to 0.1 % dimethyl sulfoxide (control) – 1, 500  $\mu$ M palmitoylethanolamide – 2, palmitoyldiethanolamide – 3, ricinoylethanolamide – 4, ricinoyldiethanolamide – 5. On the horizontal axis – a series of experiences, on the vertical axis - cell viability, % of control. \*  $p < 0.05$  with control; \*\*  $p < 0.05$  when comparing series 2–3, 2–4; \*\*\*  $p < 0.05$  when comparing series 3–5; \*\*\*\*  $p < 0.05$  when comparing series 4–5 (the same designations are in figures 2, 3)

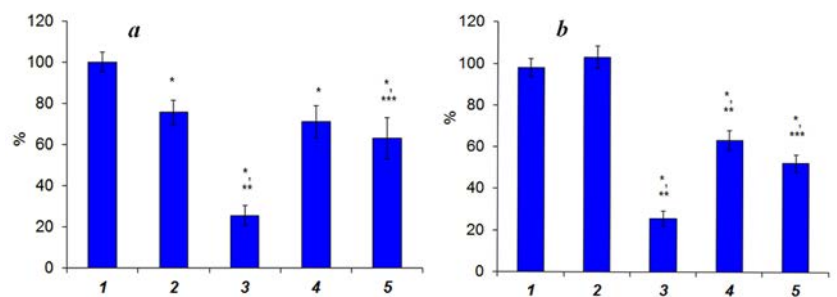


Рисунок 2 – Концентрация клеток глиомы *C6* (*a*) и *Hela* (*b*) в пробах при воздействии 0,1 % диметилсульфоксида (контроль) – 1, 500 мкМ пальмитоилэтаноламида – 2, пальмитоилдиэтаноламида – 3, рициноилэтаноламида – 4, рициноилдиэтаноламида – 5. По горизонтальной оси – серия опыта, по вертикальной оси – концентрация клеток в пробах, % от контроля

Figure 2 – The concentration of cells in glioma *C6* (*a*) and *Hela* (*b*) samples exposed to 0.1 % dimethyl sulfoxide (control) – 1, 500  $\mu$ M palmitoylethanolamide – 2, palmitoyldiethanolamide – 3, ricinoylethanolamide – 4, ricinoyldiethanolamide – 5. On the horizontal axis – a series of experiences, on the vertical axis – cell concentration in samples, % of control

В отношении клеток *Hela* ПЭА не оказал эффекта, РЭА снизил концентрацию жизнеспособных клеток в пробах на 37 % (рисунок 3 *b*). Как и в опытах с глиомой *C6*, эффект диэтаноламидов был более выражен, чем эффект соответствующих моноэтаноламидов: ПДЭА снижал концентрацию жизнеспособных клеток в пробах на 84, РДЭА – на 49 %. Из рисунка 3 видно, что роль дополнительной гидроксильной группы в противоопухолевом

эффекте четко выявляется в ЭАЖК, содержащих ацильный фрагмент пальмитиновой кислоты.

Была также исследована дозовая зависимость эффекта ЭАЖК. Опыты с использованием десятичных разведений показали, что в дозах 50 мкМ и ниже заметное влияние оказывал только ПДЭА. При этом снижение жизнеспособности клеток глиомы *C6* не превышало 3 %, а снижения жизнеспособности клеток *Hela* не выявлено (данные не

представлены). Однако выявлено существенное снижение клеточной пролиферации, что обуславливает противоопухолевый эффект соединения. На рисунке 4 представлен график, отражающий влияние ПДЭА на количество жизнеспособных клеток в пробах глиомы *C6* и *Hela*. Статистически значимый противоопухолевый эффект ПДЭА в отношении клеток глиомы *C6* выявлен при дозах 5 мкМ и выше, в отношении клеток *Hela* – при дозах 50 мкМ и выше (см. рисунок 4).

ПЭА в дозах 50 мкМ и ниже не оказывал противоопухолевого эффекта, РЭА и РДЭА оказывали слабое влияние. РЭА в дозах 0,5–50 мкМ подавлял пролиферацию глиомы *C6* на 16–9 %, а РДЭА на 2–3 % снижал жизнеспособность этих клеток (данные не показаны).

Известно, что биологические эффекты ЭАЖК, довольно подробно изученные на примере ПЭА, реализуются через ионные каналы временного рецепторного потенциала, относящиеся к подсемейству ваниллоидных рецепторов – TRPV1: рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором – PPAR $\alpha$ ; белки из семейства рецепторов, сопряженных с G-белком – GPR55 и GPR119. Кроме того, полагают, что ПЭА может опосредованно повышать активность каннабиноидных рецепторов CB1 и CB2, способствуя повышению уровня их эндогенных лигандов – анандамида и 2-пальмитоилглицерида. Это реализуется посредством конкурентного связывания ПЭА с ферментами, гидролизующими анандамид и 2-пальмитоилглицерид [5]. Такой механизм кос-

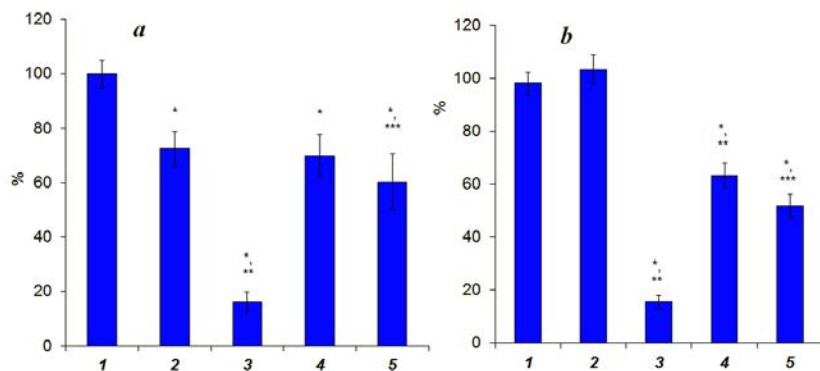


Рисунок 3 – Концентрация живых клеток глиомы *C6* (*a*) и *Hela* (*b*) в пробах при воздействии 0,1 % диметилсульфоксида (контроль) – 1, 500 мкМ пальмитоилэтаноламида – 2, пальмитоилдиэтаноламида – 3, рициноилэтаноламида – 4, рициноилдиэтаноламида – 5. По горизонтальной оси – серия опыта, по вертикальной оси – концентрация живых клеток в пробах, % от контроля

Figure 3 – The concentration of viable cells in glioma *C6* (*a*) and *Hela* (*b*) samples exposed to 0.1 % dimethyl sulfoxide (control) – 1, 500 μM palmitoylethanolamide – 2, palmitoyldiethanolamide – 3, ricinoylethanolamide – 4, ricinoyldiethanolamide – 5. On the horizontal axis – a series of experiences, on the vertical axis – cell concentration in samples, % of control

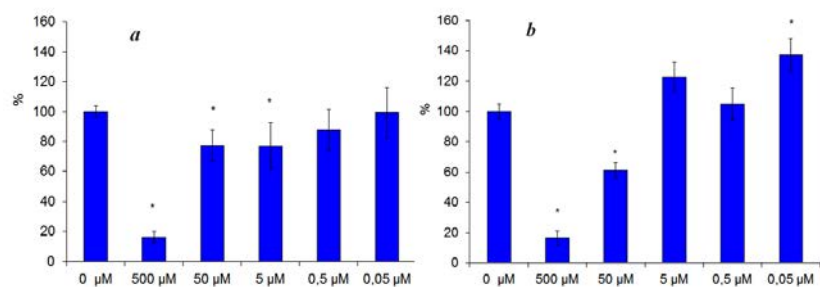


Рисунок 4 – Концентрация живых клеток глиомы *C6* (*a*) и *Hela* (*b*) в пробах при воздействии различных доз пальмитоилдиэтаноламида; \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем (серия 1). По горизонтальной оси – доза пальмитоилдиэтаноламида, по вертикальной оси – концентрация живых клеток в пробах, % от контроля

Figure 4 – The concentration of viable cells in glioma *C6* (*a*) and *Hela* (*b*) samples exposed to different doses of palmitoyldiethanolamide; \*  $p < 0.05$  when compared with control (series 1). On the horizontal axis – the dose of palmitoyldiethanolamide, on the vertical axis – the concentration of living cells in the samples, % of the control

венного участия ПЭА в активации каннабиноидных рецепторов получил название «эффект антуража». Считают, что в этом случае основной мишенью ПЭА является гидролаза амидов жирных кислот [7, 8]. Возможно также, что ПЭА повышает экспрессию СВ2 посредством активации PPAR $\alpha$  [9].

Данные литературы свидетельствуют, что клетки глиомы *C6* экспрессируют рецепторы СВ1 [10] и СВ2 [11], TRPV [12], PPAR $\alpha$  [13], GPR55 [14]. В клетках *Hela* также экспрессируются СВ1, СВ2, TRPV1 [15], PPAR $\alpha$  [16]. Все это позволяет полагать, что использованные в нашей модели клетки имеют целевые рецепторы для ЭАЖК в целом и ПЭА в частности.

Что касается молекулярных механизмов, обуславливающих антипролиферативное действие исследуемых ЭАЖК, на клетках рака толстой кишки НСТ116 и Сасо-2 выявлено повышение под действием ПЭА синтеза циклина В1/CDK1, регулирующего переход G2/М. Это, как полагают, приводит к остановке клеточного цикла и накоплению клеток в фазе G2/М [2]. На клетках рака молочной железы MCF-7 продемонстрирована способность ПЭА усиливать ингибирующее действие анандамида на экспрессию Trk-рецепторов – рецепторов фактора роста нервов, что способствует торможению пролиферации. Это связывают с подавлением гидролиза анандамида в присутствии ПЭА [17], т. е. с уже упомянутым выше эффектом антуража. Хотя в нашем эксперименте мы не использовали экзогенный анандамид, но данный эндоканнабиноид синтезируется в клетках. Исходя из этого, можно предполагать, что антипролиферативное и цитотоксическое действие ЭАЖК в наших экспериментах в значительной мере может быть обусловлено ингибированием гидролиза и повышением уровня внутриклеточных эндоканнабиноидов, прежде всего анандамида. Молекулярные механизмы антипролиферативного действия анандамида изучены более детально, чем механизмы действия ПЭА, и связаны с ингибированием клеточного цикла посредством нарушения образования комплексов циклинов с циклин-зависимыми киназами, подавлением синтеза циклического аденозинмонофосфата, повышением уровня активных форм кислорода, негативной регуляции сигнального пути фосфоинозитид-3-киназа/АКТ. Индукция апоптоза характеризуется помимо вышеперечисленного повышением активности каспаз 8/9, индукция аутофагии – повышением уровня церамидов, белка LC3-II, стрессом эндоплазматического ретикулама [18].

Уровень эндогенных ЭАЖК в клетке регулируется, с одной стороны, скоростью биосинтеза, а с другой – скоростью деградации посредством

гидролитических ферментов, основными из которых являются гидролаза амидов жирных кислот и амидаза N-ацилэтанолоаминовой кислоты. Эти ферменты расщепляют ПЭА и его конгенеры, а также эндогенные каннабиноиды анандамид, 2-пальмитоилглицерид и ряд сходных по структуре соединений [7, 8, 19]. Ингибирование гидролиза ЭАЖК [3–5] и создание устойчивых к гидролизу синтетических ЭАЖК [20] усиливают противоопухолевый эффект соединений этого класса.

Можно предположить, что факторами, от которых зависит действие ПЭА на определенные типы клеток, являются наличие и концентрация мембранных и внутриклеточных рецепторов, опосредующих действие ЭАЖК, хотя вопрос о выраженности экспрессии этих молекул в различных типах клеток остается открытым. В частности, сравнительных исследований, касающихся клеток глиомы *C6* и *Hela*, не проводилось. Также необходимы исследования взаимодействия синтетических ЭАЖК помимо ПЭА с этими рецепторами. В качестве гипотезы, объясняющей более мощное цитотоксическое и антипролиферативное действие ПДЭА по сравнению с ПЭА, можно выдвинуть предположение о большей устойчивости ПДЭА к внутриклеточному гидролизу. Однако, для того чтобы подтвердить или опровергнуть эту гипотезу, требуются дальнейшие исследования гидролитической активности клеточных ферментов в отношении синтетических ЭАЖК.

### Заключение

Полученные данные позволяют заключить, что соединения из ряда ЭАЖК – пальмитоилэтанолоамид и его конгенеры – оказывают в отношении клеток глиомы *C6* и *Hela* противоопухолевый эффект, который в большей степени обусловлен подавлением клеточной пролиферации и в меньшей – гибелью клеток. Выраженность противоопухолевого действия соединений определяется их структурой и зависит от типа клеток.

Дополнительная этанольная группа диэтанолоамидного фрагмента значительно усиливает противоопухолевую активность соединения, содержащего ацильный фрагмент пальмитиновой кислоты, в то время как в соединениях, содержащих ацильный фрагмент рицинолевой кислоты, эта закономерность выражена слабо.

В диэтанолоамидах жирных кислот остаток пальмитиновой кислоты способствует более сильному противоопухолевому эффекту по сравнению с остатком рицинолевой кислоты.

Наиболее выраженным противоопухолевым эффектом из исследованных соединений обладает ПДЭА, дозозависимо снижающий как жизнеспособность, так и пролиферативную активность клеток.

## Благодарности

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект M22-027).

## Acknowledgements

This study was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (projects No. M22-027).

## Список цитированных источников:

1. Palmitoylethanolamide: A Natural Compound for Health Management / P. Clayton [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 10 – P. 1–22.
2. Palmitoylethanolamide Reduces Colon Cancer Cell Proliferation and Migration, Influences Tumor Cell Cycle and Exerts In Vivo Chemopreventive Effects / E. Pagano [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 16, № 13.
3. Fatty acid amide hydrolase inhibitors confer anti-invasive and antimetastatic effects on lung cancer cells / K. Winkler [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 12. – P. 15047–15064.
4. Increasing antiproliferative properties of endocannabinoids in N1E-115 neuroblastoma cells through inhibition of their metabolism / L. Hamtiaux [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 10.
5. The association of N-palmitoylethanolamine with the FAAH inhibitor URB597 impairs melanoma growth through a supra-additive action / L. Hamtiaux [et al.] // *BMC Cancer*. – 2012.
6. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт – М.: Мир, 1985. – 258 с.
7. Petrosino, S. The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations / S. Petrosino, V. Di Marzo // *Br. J. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 174, № 11. – P. 1349–1365.
8. Rankin, L. The Basal Pharmacology of Palmitoylethanolamide / L. Rankin, C.J. Fowler // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 26, № 21. – P. 7942.
9. Palmitoylethanolamide induces microglia changes associated with increased migration and phagocytic activity: involvement of the CB2 receptor / F. Guida [et al.] // *Sci Rep*. – 2017.
10. Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells / G. Esposito [et al.] // *J. Neurochem*. – 2001. – Vol. 4. – P. 835–41.
11. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor / C. Sánchez [et al.] // *Cancer Res*. – 2001. – Vol. 61, № 15. – P. 5784–5789.
12. Jacobsson, S. O. Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors. / S. O. Jacobsson, T. Wallin, C. J. Fowler // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. – 2001. – Vol. 299, № 3. – P. 951–959.
13. A PPARs cross-talk concertedly commits C6 glioma cells to oligodendrocytes and induces enzymes involved in myelin synthesis / A. V. Leisewitz [et al.] // *J. Cell. Physiol*. – 2008. – Vol. 217, № 2. – P. 367–376.
14. Concurrent activation of  $\beta$ 2-adrenergic receptor and blockage of GPR55 disrupts pro-oncogenic signaling in glioma cells. / A. Wnorowski [et al.] // *Cell Signal*. – 2017. – Vol. 36. – P. 176–188.
15. Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1 / E. Contassot [et al.] // *Gynecol Oncol*. – 2004. – Vol. 93, № 1. – P. 182–188.
16. Fenofibrate decreases radiation sensitivity via peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -mediated superoxide dismutase induction in HeLa cells / X. Liu [et al.] // *Radiat. Oncol. J.* – 2012. – Vol. 30, № 2. – P. 88–95.
17. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells / V. Di Marzo [et al.] // *L. Biochem. J.* – 2001. – Vol. 358, Pt 1. – P. 249–255.
18. Molecular Mechanism of Cannabinoids in Cancer Progression / C. Pagano [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 7. – P. 3680.
19. Fonseca, B. M. Cannabinoid-induced cell death in endometrial cancer cells: involvement of TRPV1 receptors in apoptosis / B. M. Fonseca, G. Correia-da-Silva, N. A. Teixeira // *J. Physiol. Biochem*. – 2018. – Vol. 74, № 2. – P. 261–272.
20. Synthesis, Molecular Modeling and Biological Evaluation of Metabolically Stable Analogues of the Endogenous Fatty Acid Amide Palmitoylethanolamide / A. D'Aloia [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020.

## References

1. Clayton P, Hill M, Bogoda N, Subah S, Venkatesh R. Palmitoylethanolamide: A Natural Compound for Health Management. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 May 18;22(10):5305. DOI: 10.3390/ijms22105305.
2. Pagano E, Venneri T, Lucariello G, Cicia D, Brancaleone V, Nani MF, Cacciola NA, Capasso R, Izzo AA, Borrelli F, Romano B. Palmitoylethanolamide Reduces Colon Cancer Cell Proliferation and Migration, Influences Tumor Cell Cycle and Exerts In Vivo Chemopreventive Effects. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 16;13(8):1923. DOI: 10.3390/cancers13081923.
3. Winkler K, Ramer R, Dithmer S, Ivanov I, Merkord J, Hinz B. Fatty acid amide hydrolase inhibitors confer anti-invasive and antimetastatic effects on lung cancer cells. *Oncotarget*. 2016 Mar 22;7(12):15047-64. DOI: 10.18632/oncotarget.7592.
4. Hamtiaux L, Hansoulle L, Dauguet N, Muccioli GG, Gallez B, Lambert DM. Increasing antiproliferative properties of endocannabinoids in N1E-115 neuroblastoma cells through inhibition of their metabolism. *PLoS One*. 2011;6(10):e26823. DOI: 10.1371/journal.pone.0026823.
5. Hamtiaux L, Masquelier J, Muccioli GG, Bouzin C, Feron O, Gallez B, Lambert DM. The association of N-palmitoylethanolamine with the FAAH inhibitor URB597 impairs melanoma growth through a supra-additive action. *BMC Cancer*. 2012 Mar 19;12:92. DOI: 10.1186/1471-2407-12-92.
6. Jakubke HD, Jeschkeit H. Aminosäuren, Peptide, Proteine. Weinheim: Verlag Chemie, 1982. 505 p. DOI: 10.1002/ciuz.19830170209.
7. Petrosino S, Di Marzo V. The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations. *Br. J. Pharmacol*. 2017 Jun;174(11):1349-1365. DOI: 10.1111/bph.13580. Epub 2016 Sep 29.
8. Rankin L, Fowler CJ. The Basal Pharmacology of Palmitoylethanolamide. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 Oct 26;21(21):7942. DOI: 10.3390/ijms21217942.
9. Guida F, Luongo L, Boccella S, Giordano ME, Romano R, Bellini G, Manzo I, Furiano A, Rizzo A, Imperatore R, Iannotti FA, D'Aniello E, Piscitelli F, Sca Rossi F, Cristino L, Di Marzo V, de Novellis V, Maione S. Palmitoylethanolamide induces microglia changes associated with increased migration and phagocytic activity: involvement of the CB2 receptor. *Sci. Rep*. 2017 Mar 23;7(1):375. DOI: 10.1038/s41598-017-00342-1.

- 10 Esposito G, Izzo AA, Di Rosa M, Iuvone T. Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells. *J. Neurochem.* 2001 Aug;78(4):835-41. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00465.x.
- 11 Sánchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramón y Cajal S, Guzmán M. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res.* 2001 Aug 1;61(15):5784-9.
- 12 Jacobsson SO, Wallin T, Fowler CJ. Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Dec;299(3):951-9.
- 13 Leisewitz AV, Urrutia CR, Martinez GR, Loyola G, Bronfman M. A PPARs cross-talk concertedly commits C6 glioma cells to oligodendrocytes and induces enzymes involved in myelin synthesis. *J. Cell. Physiol.* 2008 Nov;217(2):367-76. DOI: 10.1002/jcp.21509.
- 14 Wnorowski A, Such J, Paul RK, Wersto RP, Indig FE, Jozwiak K, Bernier M, Wainer IW. Concurrent activation of  $\beta_2$ -adrenergic receptor and blockage of GPR55 disrupts pro-oncogenic signaling in glioma cells. *Cell. Signal.* 2017 Aug;36:176-188. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.05.006. Epub 2017 May 8.
- 15 Contassot E, Tenan M, Schnüriger V, Pelte MF, Dietrich PY. Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecol. Oncol.* 2004 Apr;93(1):182-8. DOI: 10.1016/j.ygyno.2003.12.040.
- 16 Liu X, Jang SS, An Z, Song H, Kim WD, Yu JR, Park WY. Fenofibrate decreases radiation sensitivity via peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -mediated superoxide dismutase induction in HeLa cells. *Radiat. Oncol. J.* 2012 Jun;30(2):88-95. DOI: 10.3857/roj.2012.30.2.88. Epub 2012 Jun 30.
- 17 Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem. J.* 2001 Aug 15;358(Pt 1):249-55. DOI: 10.1042/0264-6021:3580249.
- 18 Pagano C, Navarra G, Coppola L, Bifulco M, Laezza C. Molecular Mechanism of Cannabinoids in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 Apr 1;22(7):3680. DOI: 10.3390/ijms22073680.
- 19 Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. Cannabinoid-induced cell death in endometrial cancer cells: involvement of TRPV1 receptors in apoptosis. *J. Physiol. Biochem.* 2018 May;74(2):261-272. DOI: 10.1007/s13105-018-0611-7. Epub 2018 Feb 13.
- 20 D'Aloia A, Arrigoni F, Tisi R, Palmioli A, Ceriani M, Artusa V, Airoidi C, Zampella G, Costa B, Cipolla L. Synthesis, Molecular Modeling and Biological Evaluation of Metabolically Stable Analogues of the Endogenous Fatty Acid Amide Palmitoylethanolamide. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 Nov 28;21(23):9074. DOI: 10.3390/ijms21239074.

## ANTI-TUMOR ACTIVITY OF ETHANOLAMIDES AND DIETHANOLAMIDES OF PALMITIC AND RICINOLIC ACID *IN VITRO*

*T. I. Terpinskaya<sup>1</sup>, T. L. Yanchenko<sup>1</sup>, M. U. Lisouskaya<sup>2</sup>, A. F. Palukoshka<sup>1</sup>, A. L. Mikhal'chuk<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Institute of Physiology 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*

**Introduction.** Data on the biological activity of fatty acid ethanolamides indicate that the search for new compounds with an antitumor effect in this group is promising.

**Objective** – is a comparative study of the antitumor effect of ethanol- and diethanolamides of palmitic and ricinoleic acids.

**Materials and methods.** The effect of palmitic and ricinoleic acid mono- and diethanolamides on the viability and proliferative activity of glioma *C6* and *Hela* cells after 48-hour cultivation was evaluated by flow cytometry.

**Results.** Palmitoylethanolamide reduced the viability of glioma *C6* cells by 10 % and proliferation by 24 %, but did not affect *Hela* cells. Ricinoylethanolamide reduced the viability of glioma *C6* cells by 2 %, and proliferative activity by 29 %, without affecting the viability of *Hela* cells, but reducing their proliferation by 37 %. Palmitoyldiethanolamide reduced the viability and proliferation of glioma *C6* cells by 49 and 74 %, *Hela* – by 35 and 74 %. Ricinoyldiethanolamide reduced the viability of glioma *C6* cells by 14 %, proliferation by 37 %, and *Hela* cells – by 1 and 48 %, respectively. The dose-dependence of the effects of the studied compounds was shown.

**Conclusions.** The antitumor effect of the studied fatty acid ethanoamides is determined by their structure and depends on the cell type. Of the studied compounds, the most pronounced cytotoxic and antiproliferative effects were shown by palmitoyldiethanolamide.

**Keywords:** fatty acid ethanolamides, palmitoylethanolamide, ricinoylethanolamide, palmitoyldiethanolamide, ricinoyldiethanolamide, cancer, tumor.

**For citation:** Terpinskaya TI, Yanchenko TL, Lisouskaya MU, Palukoshka AF, Mikhal'chuk AL. Anti-tumor activity of ethanolamides and diethanolamides of palmitic and ricinolic acid in vitro. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 53–59 (in Russian).

*Поступила 29.08.2022*

## ТРАНСФОРМАЦИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СПЕКТРА В МОЗЖЕЧКЕ, СТРИАТУМЕ И ГИПОТАЛАМУСЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АНТИРЕТРОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ЗИДОВУДИН

*Н. И. Филина, М. Н. Курбат, Е. М. Дорошенко*

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

**Введение.** Информация о воздействии препарата Зидовудин (AZT) на мозг ограничена и требует дальнейшего изучения механизмов нейротоксичности нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ), в том числе и AZT.

**Цель исследования** – установить изменения содержания протеиногенных аминокислот (АК) в стриатуме, мозжечке и гипоталамусе головного мозга крыс при воздействии препарата AZT.

**Материалы и методы.** Проведено определение свободных аминокислот в гипоталамусе, мозжечке и стриатуме головного мозга крыс с помощью обращеннофазной ВЭЖХ.

**Результаты.** Исследуемые структуры головного мозга характеризуются трансформацией пула аминокислот. Выявлены особенности изменения отношений между определенными классификационными группами аминокислот: аминокислоты с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ) / ароматические АК (ААК) и заменимые/незаменимые в условиях данного эксперимента.

**Заключение.** Введение препарата AZT вызывает дисбаланс в концентрациях протеиногенных аминокислот (метионин, лизин, триптофан, треонин, аргинин, гистидин) в изученных отделах головного мозга крыс, выраженность которого варьирует в зависимости от длительности воздействия. Установлена трансформация пула АРУЦ и незаменимых АК в сторону снижения при введении препарата во всех исследуемых отделах.

**Ключевые слова:** аминокислоты, Зидовудин, нейротоксичность, дисбаланс аминокислот, отделы головного мозга.

**Для цитирования.** Филина, Н. И. Трансформация аминокислотного спектра в мозжечке, стриатуме и гипоталамусе головного мозга крыс при воздействии антиретровирусного препарата Зидовудин / Н. И. Филина, М. Н. Курбат, Е. М. Дорошенко // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 60–64.

### Введение

Несмотря на успех комбинированной высокоактивной антиретровирусной терапии в лечении вирусных инфекций, в первую очередь таких, как ВИЧ, потенциальная токсичность антиретровирусных препаратов для структур и клеток ЦНС остается мало изученной и вызывает особый интерес [1].

3'-азидо-3'-дезокситимидин, или Зидовудин (AZT), был первым использованным антиретровирусным препаратом, и его терапевтический эффект включает блокаду цитопатического эффекта и ингибирование активности вирусной обратной транскриптазы [2].

Несмотря на высокую эффективность, рядом исследований выявлены гепатотоксические побочные эффекты AZT, включая остановку клеточного цикла, окислительное повреждение митохондрий, увеличение выработки лактата [3].

Информация о воздействии AZT на мозг ограничена. Недавние исследования показали, что препарат быстро всасывается и проникает через ГЭБ,

достигая максимальной концентрации через 30 мин после однократного введения (доза – 50 мг/кг); в основном распределяется в мозолистом теле, бледном шаре, стриатуме и области неокортекса [4].

Что касается побочных реакций со стороны ЦНС, то рядом исследований установлено, что воздействие AZT приводит к делеции мтДНК в нейронах коры головного мозга мыши, митохондриальной токсичности, нарушению нейрогенеза и повреждению нейронных дендритов и пресинаптических окончаний [5].

Установлено, что AZT повышает уровень провоспалительных цитокинов, включая ИЛ-1 $\beta$ , ФНО и ИЛ-6 в различных областях ЦНС, а также активирует белок Wnt5a, ключевой регулятор нейровоспаления [6].

Следовательно, потенциал нейронных повреждений и дисфункции является значительным и подчеркивает необходимость дальнейшего изучения механизмов нейротоксичности НИОТ, в том числе и AZT, индивидуально и в комбинации. Так

как пул свободных аминокислот является интегральным показателем изменений в обмене веществ, охватывающим практически все метаболические пути, цель исследования – установить изменения содержания протеиногенных аминокислот в стриатуме, мозжечке и гипоталамусе головного мозга крыс при воздействии нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ (Зидовудина, AZT). Это позволит использовать его не только для получения информации об общей направленности биохимических процессов, но и для определения эффективной коррекции возникающих нарушений.

### Материалы и методы

Исследование проведено на 21 особи белых нелинейных крыс-самцов массой 232,5(±20,35) г. Крысы были разделены на 3 группы: контрольную и две опытные по 7 особей в каждой группе. Все препараты вводили внутривенно (в/в) через зонд в суспензии на 0,9-м% растворе натрия хлорида. Животным 1-й опытной группы вводили AZT в дозе 100 мг/кг/сутки 7 суток («AZT-7»). Животным 2-й группы вводили AZT в аналогичной дозе 21 сутки («AZT-21»). Контрольные животные получали в/в эквивалентное количество 0,9%-го раствора натрия хлорида. За 12 ч до забоя животных лишали пищи с сохранением воды в качестве источника питья. Забой животных первой группы проводили на 8-е сутки, второй – на 22-е сутки. После декапитации животных извлекали головной мозг, промывали охлажденным 0,9%-м раствором натрия хлорида и выделяли исследуемые отделы (стриатум, гипоталамус и мозжечок), которые замораживали в жидком азоте. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с исполь-

зованием экспериментальных животных» [7]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (заседание комитета по биомедицинской этике от 30.01.2018, протокол №1).

Содержание свободных аминокислот в пробах определяли после осаждения белков. Для этого образец гомогенизировали в 10 объемах 0,2 М раствора хлорной кислоты, содержащем 0,2 ммоль/л норвалина (nVal), 1 мкмоль/л ванилиновой кислоты, а также 50 мг/л ЭДТА, 50 мг/л метабисульфита натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). После тщательного перемешивания пробы центрифугировали при +4 °С 15 мин при 15000 g, супернатанты отделяли и хранили при –18 °С.

Определение свободных аминокислот проводили в тех же хлорнокислых экстрактах с помощью обращеннофазной ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции [8].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (серийный номер AXAR207F394425FA-Q). Для характеристики фонда АК рассчитывали содержание АРУЦ (сумма АК с разветвленной углеводородной цепью), ААК (ароматические аминокислоты), заменимых и незаменимых АК.

### Результаты и их обсуждение

Исследуемые структуры головного мозга характеризуются трансформацией пула протеиногенных аминокислот при введении AZT. При данных экспериментальных условиях регистрируются колебания содержания свободных АК в зависимости от длительности воздействия (таблица).

Таблица – Содержание свободных протеиногенных аминокислот в гипоталамусе, мозжечке и стриатуме головного мозга крыс (нмоль/г) при воздействии препарата Зидовудин (AZT)

Table – The content of free amino acids in the hypothalamus, cerebellum and striatum of the rat brain (nmol/g) under action of drug Zidovudine (AZT)

Аминокислота	Контроль	AZT – 7 суток (1-я группа)	AZT – 21 сутки (2-я группа)
Гипоталамус			
Аспарагиновая кислота	1914,27±58,82	2237,48±123,03*	1661,63±151,58 <sup>+</sup>
Гистидин	33,85±1,84	36,32±5,40	42,15±2,39*
Глицин	733,81±83,99	844,86±88,56	534,53±48,54 <sup>+</sup>
Треонин	343,02±20,07	420,94±10,48*	270,67±26,43 <sup>++</sup>
Метионин	24,54±1,21	23,43±0,96	20,09±1,53*
Лизин	187,40±10,25	174,87±17,03	120,03±13,32 <sup>++</sup>
Триптофан	21,64±1,51	25,38±0,75*	16,92±1,76 <sup>+</sup>
Мозжечок			
Треонин	275,87±21,62	371,55±6,74*	252,42±21,93 <sup>+</sup>
Аргинин	252,80±4,20	247,17±1,33	261,97±3,83 <sup>+</sup>
Лизин	229,48±20,29	242,60±13,32	160,69±9,95 <sup>++</sup>
Триптофан	20,39±1,87	23,92±0,63	16,82±0,80 <sup>+</sup>

Аминокислота	Контроль	AZT – 7 суток (1-я группа)	AZT – 21 сутки (2-я группа)
Стриатум			
Глутаминовая кислота	6733,82±103,78	6532,06±170,61	5968,68±276,19*
Треонин	377,91±27,35	464,29±18,00*	296,83±26,02**
Аргинин	253,56±2,82	250,79±1,86	263,01±3,31**
Валин	63,90±3,40	54,82±1,58*	60,19±8,45
Метионин	28,41±1,93	25,01±1,67	21,94±1,36*
Изолейцин	23,38±1,44	22,33±1,31	21,32±4,34†
Триптофан	20,23±1,74	21,99±1,64	16,79±1,08†

Примечание: \*статистически значимые различия с контролем; †с 1-й группой;  $p < 0,05$ .

Note: \*statistically significant differences with control; †with the 1st group;  $p < 0,05$ .

Обращает на себя внимание снижение уровня метионина во всех исследуемых структурах в двух опытных группах в сравнении с контролем. При этом воздействие препаратом в течение 21 суток привело к уменьшению содержания данной АК в гипоталамусе и стриатуме соответственно на 17 и 22 % ( $p < 0,05$ ). Низкое содержание метионина влечет за собой снижение выработки SAMe, тем самым влияя на эпигенетические модификации (метилирование ДНК, модификацию гистонов, ремоделирование хроматина), подавляя рост клеток [9].

Гепатотоксичность AZT несомненна [4], поэтому можем предположить, что снижение биодоступности метионина связано с нарушением его метаболизма в поврежденной печени.

Интересным на наш взгляд является изменение уровня незаменимой АК треонин: в опытной группе «AZT-7» наблюдалось повышение, а в группе «AZT-21» – снижение в тканях всех исследуемых отделов ( $p < 0,05$ ).

В группе «AZT-21» снижение концентрации лизина составило 17 и 31% соответственно в гипоталамусе и мозжечке ( $p < 0,05$ ).

Это может быть результатом воздействия препарата, так как установлено, что избыток незаменимой аминокислоты *L*-лизина увеличивает уровень вирусной нагрузки, патогенетически усугубляя иммуносупрессию и способствуя клиническому прогрессированию заболевания. Так, наличие достаточной концентрации данной АК в инфицированной ВИЧ клетке позволяет активировать тРНК<sup>Lys</sup> и инициировать репликацию вируса [10].

Концентрация гистидина увеличивается на 27 % ( $p < 0,05$ ) в группе «AZT-21» в гипоталамусе головного мозга крыс. Установлено, что рост содержания гистидина увеличивает скорость синтеза гистамина, который служит нейротрансмиттером и контролирует разнообразные функции головного мозга [11].

В таламической области снижение показателя содержания АРУЦ составило 9 % от значения кон-

трольной группы. В стриатуме и мозжечке данный показатель снизился незначительно.

Обратим внимание на существенное снижение содержания незаменимых АК в среднем на 15 % в группе «AZT-21» в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ) во всех исследуемых отделах. При этом количество заменимых АК в той же опытной группе всех исследуемых отделов сохранялось в пределах контрольных значений. Это находит отражение в возрастании показателя заменимые/незаменимые АК и свидетельствует о преобладании заменимых АК в общем пуле АК исследуемых отделов головного мозга.

Вместе с тем введение препарата в течение 7 суток привело к строго противоположному результату: содержание незаменимых АК увеличилось в среднем на 13 % в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ) в трех исследуемых отделах.

Содержание триптофана в гипоталамусе возросло на 19 % в 1-й группе ( $p < 0,05$ ) и снизилось на 22 % во 2-й группе в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ). Существует вероятность того, что последнее можно рассматривать как проявление терапевтического эффекта AZT, который в последние годы активно используется для лечения опухолей, в то время как метаболизм триптофана оказывает глубокое влияние на функцию головного мозга и является основным метаболическим путем, который ограничивает противоопухолевый иммунитет, в том числе при глиомах мозга [12, 13].

Вероятным объяснением выявленного дисбаланса является нарушение функционирования ГЭБ, а именно переносчика больших нейтральных АК- LAT-1. Последний участвует в транспорте тех АК, изменение концентраций которых было отмечено: АРУЦ, триптофан, гистидин, метионин.

Имеется ряд исследований, показавших роль высокоактивной антиретровирусной терапии (в том числе использование AZT) в образовании свободных радикалов и гибели эндотелиальных клеток ГЭБ, опосредованной митохондриальной дисфункцией [14].



## Заклучение

Введение препарата AZT вызывает значительный дисбаланс в концентрациях протеиногенных аминокислот (метионин, лизин, триптофан, треонин, аргинин, гистидин) в изученных отделах головного мозга крыс, выраженность которого варьирует в зависимости от длительности воздействия. Установлена трансформация пула АРУЦ и незаменимых АК в сторону снижения при введении AZT во всех исследуемых отделах, что может быть следствием нарушения их катаболизма или изменений систем транспорта данных АК в головной мозг.

## Список цитированных источников

1. Antiretroviral drugs induce oxidative stress and neuronal damage in the central nervous system / C. Akay [et al.] // *J. Neurovirol.* – 2014. – Vol. 20. – P. 39–53. – DOI:10.1007/s13365-013-0227-1.
2. The toxicity of azidithymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial / D. D. Richman [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1987. – Vol. 318, iss. 4. – P.192–197.
3. AZT-induced mitochondrial toxicity: an epigenetic paradigm for dysregulation of gene expression through mitochondrial oxidative stress / C. A. Koczor [et al.] // *Physiol. Genomics.* – 2015. – Vol. 47, iss. 10. – P.447–454. – DOI: 10.1152/00045.2015.
4. Mdanda, S. Zidovudine and Lamivudine as potential agents to combat HIV-Associated neurocognitive disorder / S. Mdanda, S. Ntshangase, S. D. Singh // *ASSAY Drug Dev. Technol.* – 2019. – Vol. 17, iss. 7. – P. 322–329. – DOI:10.1089/2019.941.
5. Sánchez, A. B. Antiretrovirals, Methamphetamine, and HIV-1 Envelope Protein gp120 Compromise Neuronal Energy Homeostasis in Association with Various Degrees of Synaptic and Neuritic Damage / A. B. Sánchez, G. P. Varano, M. Kaul // *Biology Antimicrob. Agents and Chemother.* – 2015. – Vol. 60, iss. 1. – P.168–179. – DOI:10.1128/AAC.01632-15.
6. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) induce proinflammatory cytokines in the CNS via Wnt5a signaling / T. Wu [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, iss. 1. – P. 4117.
7. Надлежащая лабораторная практика: ТКП 125-2008(02040): введ. 28.03.08 / Министерство здравоохранения Республики Беларусь. – Минск, 2008. – 35 с.
8. Дорошенко, Е. М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлением хронической сердечной недостаточности / Е. М. Дорошенко, В. А. Снежицкий, В. В. Лелевич // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та.* – 2017. – Т. 15, №5. – С. 551–555.
9. Xu, Q. HNF4a regulates sulfur amino acid metabolism and confers sensitivity to methionine restriction in liver cancer / Q. Xu // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 7, iss. 11. – P. 39–78.
10. Буторов, Е. В. Корреляция CD4 и вирусной нагрузки с уровнем лизина плазмы у ВИЧ-больных / Е. В. Буторов // *Инфекция и иммунитет.* – 2015. – Т. 5, №3. – С. 253–264. – DOI:10.15789/2220-7619-2015-3-253-264.
11. Yoshikawa, T. Histamine N-Methyltransferase in the Brain / T. Yoshikawa, T. Nakamura, K. Yanai // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 10, iss. 20(3). – P. 737. – DOI:10.3390/ijms20030737.
12. Hsieh, Y. Azidothymidine (AZT) Inhibits Proliferation of Human Ovarian Cancer Cells by Regulating Cell Cycle

Progression / Y. Hsieh, J. Tseng // *Anticancer Res.* – 2020. – Vol. 40, iss. 10. – P. 5517–5527. – DOI:10.21873/anticancer.14564.

13. Tryptophan metabolism in brain tumors – IDO and beyond / M. Platten [et al.] // *Curr. Opin. Immunol.* – 2021. – Vol. 70. – P. 57–66. – DOI:10.1016/j.coi.2021.03.005.
14. Manda, K. R. Highly active antiretroviral therapy drug combination induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in immortalized human blood-brain barrier endothelial cells / K. R. Manda, A. Banerjee, W. A. Banks, N. Ercal // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 50, iss. 7. – P. 801–810. – DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.029.

## References

1. Akay C, Cooper M, Odeleye A, Jensen B, White MJ, Vassoler F, Gannon PJ, Mankowski J, Dorsey JL, Cook DR, Peña MM. Antiretroviral drugs induce oxidative stress and neuronal damage in the central nervous system. *J. Neurovirol*, 2014, vol. 20, pp. 39–53. DOI:10.1007/s13365-013-0227-1.
2. Richman DD, Fischl MA, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom J, Groopman J, Mildvan D, Hirsch M. The toxicity of azidithymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. of Med*, 1987, vol. 318, iss. 4, pp.192–197.
3. Koczor CA, Jiao Z, Fields E, Russ R, Ludaway T, Lewis W. AZT-induced mitochondrial toxicity: an epigenetic paradigm for dysregulation of gene expression through mitochondrial oxidative stress. *Physiol. Genomics*, 2015, vol. 47, iss. 10, pp. 447–454. DOI: 10.1152/00045.2015.
4. Mdanda S, Ntshangase S, Singh S, Kruger H, Bajinath S, Govender T. Zidovudine and Lamivudine as potential agents to combat HIV-Associated neurocognitive disorder. *ASSAY Drug Dev. Technol.*, 2019, vol. 17, iss. 7, pp. 322–329. DOI:10.1089/2019.941.
5. Sánchez A, Sánchez AB, Varano GP, Kaul M. Antiretrovirals, Methamphetamine, and HIV-1 Envelope Protein gp120 Compromise Neuronal Energy Homeostasis in Association with Various Degrees of Synaptic and Neuritic Damage. *Biology Antimicrob. Agents and Chemother.*, 2015, vol. 60, iss. 1, pp.168–179. DOI:10.1128/AAC.01632-15.
6. Wu T, Zhang J, Mingxing G, Tang Sh, Wenping Zh, Shu J. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) induce proinflammatory cytokines in the CNS via Wnt5a signaling. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, iss. 1, pp. 4117.
7. Good laboratory practice: TCP 125-2008(02040): introduction [Надлежащая лабораторная практика: ТКП 125-2008(02040): введ.]03.28.08 Ministry of Health of the Republic of Belarus. Minsk, 2008, p. 35. (in Russian).
8. Doroshenko EM, Snezhitskii VA, Lelevich VV. Structure of the pool of free amino acids and their derivatives in plasma of patients with ischemic heart disease and chronic cardiac insufficiency. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta [Journal of Grodno State Medical University]*, 2017, vol. 15, №5, pp. 551–555 (in Russian).
9. Xu Q, Li Y, Gao X, Kang K, Williams GJ, Tong L, Liu J, Ji M, Deterding LJ, Tong X, Locasale JW, Li L, Shats I, Li X. HNF4a regulates sulfur amino acid metabolism and confers sensitivity to methionine restriction in liver cancer. *Nat Commun*, 2020, vol. 7, iss. 11, pp. 39–78.
10. Butorov EV, Correlation of CD4 and viral load with plasma lysine levels in HIV patients [Корреляция CD4 и вирусной нагрузки с уровнем лизина плазмы у ВИЧ-больных] *Infection and immunity*, 2015, №5 (3), pp. 253–264. DOI:10.15789/2220-7619-2015-3-253-264. (in Russian).
11. Yoshikawa T, Nakamura T, Yanai K. Histamine N-Methyltransferase in the Brain. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 10, iss. 20(3), pp. 737. DOI:10.3390/ijms20030737.

- 12 Hsieh Y, Tseng J. Azidothymidine (AZT) Inhibits Proliferation of Human Ovarian Cancer Cells by Regulating Cell Cycle Progression. *Anticancer Res*, 2020, vol. 40, iss. 10, pp. 5517–5527. DOI:10.21873/anticancerres.14564.
- 13 Platten M, Friedrich M, Wainwright DA, Panitz V, Opitz ChA. Tryptophan metabolism in brain tumors – IDO and beyond. *Curr. Opin. Immunol.*, 2021, vol. 70, pp. 57–66. DOI:10.1016/j.coi.2021.03.005.
- 14 Manda KR, Banerjee A, Banks WA, Ercal N. Highly active antiretroviral therapy drug combination induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in immortalized human blood-brain barrier endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, vol. 50, iss. 7, pp. 801–810. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.029.

## TRANSFORMATION OF THE AMINO ACID SPECTRUM IN THE CEREBELLUM, STRIATUM AND HYPOTHALAMUS OF THE RAT BRAIN UNDER ACTION OF THE ANTIRETROVIRAL DRUG ZIDOVUDINE

---

*N. I. Filina, M. N. Kurbat, E. M. Doroshenko*

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

**Introduction.** Information on the effects of Zidovudine (AZT) on the brain is limited and requires further study of the mechanisms of NRTI neurotoxicity, including AZT.

**Objective** – to study changes in the content of proteinogenic amino acids in the striatum, cerebellum and hypothalamus of the rat brain exposed to AZT.

**Materials and methods.** The determination of free amino acids in the hypothalamus, cerebellum and striatum of the rat brain was carried out using reverse-phase HPLC.

**Results.** The studied brain structures are characterized by the transformation of the AA pool. The peculiarities of changes the ratio between certain classificational groups of amino acids: the branched-chain acids /aromatic AA and nonessential/essential AA under the conditions of this experiment are revealed.

**Conclusions.** The administration of the drug Zidovudine causes a imbalance in the concentrations of proteinogenic amino acids (methionine, lysine, tryptophan, threonine, arginine, histidine) in the studied regions of the rat brain, the severity of which varies depending on the duration of exposure. The transformation of the pool of BCAA and essential AA in the downward direction was established with the introduction of drug in all studied regions.

**Keywords:** amino acids, Zidovudine, neurotoxicity, imbalance of amino acids, departments of the brain.

**For citation:** Filina NI, Kurbat MN, Doroshenko EM. Transformation of the amino acid spectrum in the cerebellum, striatum and hypothalamus of the rat brain under action of the antiretroviral drug zidovudine. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 60–64 (in Russian).

*Поступила 09.01.2023*

## ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗАМЕНЫ В СТРУКТУРЕ ГЕНОВ IL6 И TNF $\alpha$ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

*Е. А. Хотько, А. Д. Таганович, Г. В. Шабаев, А. Г. Кадушкин*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Введение.** Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – полидетерминированное заболевание, для которого характерно аномальное воспаление легочной ткани. При ХОБЛ активированные макрофаги, Т-клетки и фибробласты активно синтезируют интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Полиморфизмы генов, кодирующих образование этих интерлейкинов, могут обуславливать аномальное усиление их синтеза.

**Цель исследования** – определить частоту носительства генотипов полиморфных локусов rs1800795 (IL6) и rs1800629 (TNF $\alpha$ ) у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей и их связь с развитием заболевания.

**Материалы и методы.** С использованием ПЦР в реальном времени определено носительство генотипов полиморфизмов rs1800629 (TNF $\alpha$ ) и rs1800795 (IL6) у 95 пациентов с ХОБЛ и 95 здоровых лиц.

**Результаты.** Оценка генотипов и аллелей точки rs1800795 гена IL6 показала, что среди пациентов с ХОБЛ преобладают носители гетерозиготного генотипа GC (56,2 %) в сравнении с контрольной группой (40,0 %). Не обнаружено статистически значимых отличий в частоте встречаемости генотипов, содержащих минорную аллель, локуса rs1800629 гена TNF $\alpha$  у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей ( $p > 0,05$ ), а доля носителей генотипа GA составила 28,4 % и 22,1 % соответственно.

**Заключение.** У лиц, страдающих ХОБЛ, вероятность носительства генотипов CG/GG полиморфного локуса rs1800795 гена IL6 в 2,38 раза выше по сравнению со здоровыми людьми.

**Ключевые слова:** цитокины, полиморфизм, хроническая обструктивная болезнь легких.

**Для цитирования.** Однонуклеотидные замены в структуре генов IL6 и TNF $\alpha$  при хронической обструктивной болезни легких / Е. А. Хотько [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 65–71.

### Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) поражает каждого десятого взрослого и входит в число самых распространенных причин смерти во всем мире [1]. В Республике Беларусь насчитывается около 40 тысяч пациентов с ХОБЛ.

Центральным звеном патогенеза ХОБЛ является формирование воспалительной реакции в очаге повреждения. Вдыхание частиц сигаретного дыма или производственной пыли приводит к активации альвеолярных макрофагов и эпителиальных клеток. Эти клетки участвуют в регуляции воспаления путем секреции медиаторов белковой природы – цитокинов. Высвобождающиеся медиаторы связываются со своими рецепторами, активируют и привлекают из крови в очаг воспаления нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки и лимфоциты. Иначе говоря, они выполняют функцию своеобразных «дирижеров», которые координируют работу клеток, вовлеченных в развитие ХОБЛ.

Широкая плейотропия и элемент избыточности в семействе цитокинов, когда каждый цитокин имеет много перекрывающихся функций и каждая функция потенциально опосредована более чем

одним цитокином, делают классификацию этих белковых молекул сложной задачей. К провоспалительным цитокинам относятся IL1, фактор некроза опухоли (TNF), IL6, фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) и фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов (G-CSF).

TNF и IL6 являются эндогенными пирогенами и способствуют лейкоцитозу за счет высвобождения нейтрофилов из костного мозга [2]. TNF $\alpha$  может стимулировать эпителиальные клетки дыхательных путей к выработке других цитокинов, включая CCL5 и IL8, путем активации ядерного фактора  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), а также индуцирует пролиферацию фибробластов [3]. TNF $\alpha$  стимулирует выработку бронхиальными эпителиальными клетками тенасцина – гликопротеина внеклеточного матрикса, который может способствовать ремоделированию дыхательных путей [4]. Повышенный уровень TNF $\alpha$  в сыворотке крови был отмечен у пациентов с выраженной потерей массы тела, страдающих ХОБЛ [5]. Кроме того, в индуцированной мокроте пациентов со стабильным течением ХОБЛ наблюдалось увеличение содержания как TNF $\alpha$ , так и IL6 [6].

Потенциальная роль самого IL6 в патогенезе ХОБЛ подтверждается исследованиями, показывающими, что высокий уровень этого цитокина в сыворотке крови и мокроте связан с быстрым снижением функции легких [7]. IL6 также ассоциирован со слабостью скелетных мышц, обострениями и легочными инфекциями у пациентов с ХОБЛ [8]. Кроме того, избыточная экспрессия IL6 в легких мышцей приводила к увеличению воздушного пространства дыхательных путей, подобному эмфиземе [9]. Эти данные подтверждают, что IL6 является не только маркером воспаления дыхательных путей, но и фактором, ответственным за ремоделирование бронхиального дерева и потерю эластичности эпителиальной ткани [10].

Многочисленные исследования, направленные на раскрытие механизмов патогенеза ХОБЛ, указывают на то, что одной из причин усиленного синтеза цитокинов является измененная экспрессия генов, кодирующих структуру этих образований. В свою очередь, измененная экспрессия обусловлена наличием полиморфизма этих генов [11], поэтому изучение связи между генным полиморфизмом и измененной экспрессией генов цитокинов дает возможность углубить имеющиеся представления о молекулярных событиях ХОБЛ.

Среди описанных полиморфизмов гена TNF $\alpha$  (более 10) лишь rs1800629 (G308A), как полагают, может влиять на классический вариант молекулярного взаимодействия лиганда с рецептором. Это связано с тем, что появление аденина (A) вместо гуанина (G) в промоторной области влияет на изменение транскрипции и продукции TNF $\alpha$ . Показано, что у гетерозиготных носителей (AG) продукция этого цитокина выше, чем у людей – носителей гомозиготной аллели GG.

Сведения об ассоциации полиморфизма G308A TNF $\alpha$  с ХОБЛ носят противоречивый характер. Было показано, что носительство полиморфного варианта гена связано с повышенной чувствительностью пациентов к ХОБЛ [12]. Однако другие исследователи не обнаружили корреляции между наличием полиморфизма G308A и риском развития ХОБЛ [13]. Ввиду противоречивости имеющихся сведений, целесообразно проведение оценки полиморфизма rs1800629 в качестве маркера риска развития этого заболевания.

Цитогенетическое расположение IL6 – хромосома 7p15.3. Промотор гена включает в себя многочисленные регуляторные сайты, позволяющие контролировать индукцию экспрессии гена, например, посредством глюкокортикостероидов и цАМФ [14]. В гене расположен особо важный регуляторный сайт для связывания универсального ядерного фактора транскрипции «каппа-би» (NF-kB) [15]. NF-kB стимулирует экспрессию интерлейкина-6 в клетке

под влиянием интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли- $\alpha$ , что объясняет повышенный уровень этого цитокина при хронических воспалительных заболеваниях [15]. Стероидные гормоны, такие как эстрадиол или глюкокортикостероиды, ингибируют транскрипцию гена IL6 [16].

В кодирующей последовательности гена IL6, а также в области промотора были найдены многочисленные однонуклеотидные полиморфизмы. Одним из наиболее часто встречающихся и изученных является rs1800795 (G174C). Он характеризуется появлением цитозина (C) в 174 положении промотора вместо гуанина (G). Примечательно, что у гомозиготных носителей мажорной аллели G наблюдается повышение концентрации IL6 [17]. Показано, что среди пациентов с IV стадией ХОБЛ носители генотипа GG встречаются на 12 % чаще, чем среди пациентов со II и I стадиями [18].

В свою очередь, другие исследователи представили результаты, свидетельствующие о связи между наличием двух промоторных полиморфизмов IL6 – G174C и G572C и повышенным уровнем этого цитокина в крови. Результаты проведенного мета-анализа показали значительно более высокий риск развития ХОБЛ у носителей полиморфизма G174C [19]. Кроме того, носительство этого ОНП сопряжено с повышенным риском развития ХОБЛ у курильщиков [19].

Наряду с этими данными имеются результаты исследований, согласно которым не обнаружено существенных различий частоты полиморфизма rs1800795 у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей [18]. Неоднозначность имеющихся сведений служит основанием для проведения в будущем более полного исследования полиморфизма rs1800795 интерлейкина-6 в развитии этого заболевания.

Цель исследования – определить частоту носительства генотипов полиморфных локусов rs1800795 гена IL6 и rs1800629 гена TNF $\alpha$  у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей и оценить ассоциацию генотипов с развитием заболевания.

### Материалы и методы

Обследование 95 пациентов с ХОБЛ и 95 здоровых людей, а также забор биологического материала проводились на базе учреждения здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический центр». В качестве материала для исследования использована ДНК клеток, выделение которой осуществлялось с использованием набора NucleoSpin Blood с помощью методики, рекомендованной производителем (MACHERY-NAGEL, Германия). Поиск полиморфной аллели осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с помощью детектирующего амплификатора ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия). Иденти-

фикация мажорной или минорной аллели проводилась на основании появления флюоресценции не позже 32 цикла амплификации. Для статистической обработки данных использовались пакеты программ «IBM SPSS Statistics 23» и «Microsoft Excel». Для сравнительной оценки носительства генотипов и аллелей у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей вычисляли критерий  $\chi^2$ . В случае, если количество носителей генотипа/аллели было  $\leq 5$ , вместо  $\chi^2$  применяли точный критерий Фишера. Для оценки связи того или иного генотипа и аллели с вероятностью развития ХОБЛ рассчитывали параметр отношения шансов (ОШ) и 95%-й доверительный интервал (ДИ). Статистически значимыми принимали результаты при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Оценку репрезентативности проводили, определяя критерий  $\chi^2$  и критерий значимости  $p$  (Microsoft Excel, USA). Значение  $p < 0,05$  в контрольной группе при соответствующей оценке причин наблюдаемого отклонения частот генотипов от ожидаемого служило основанием для исключения полиморфизма из дальнейшего анализа с целью предотвращения верификации случайных отличий, не отражающих явление в исследуемой популяции (таблицы 1, 2).

В отношении полиморфного локуса rs1800795 (IL6) оценка встречаемости генотипов в группе

пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц соответствию HWE показала, что сформированные для исследования выборки являются репрезентативными.

При анализе полиморфизма rs1800629 (TNF $\alpha$ ) распределение генотипов не подчинялось HWE в группе пациентов, страдающих ХОБЛ. Однако это обстоятельство не было препятствием для дальнейшего анализа данного полиморфного локуса, поскольку в основе исследования типа «случай – контроль» лежит предположение о том, что именно контрольная группа является репрезентативной выборкой исследуемой популяции, в то время как группа «случай» отражает проявление изучаемого фенотипа. HWE предполагает идеальную популяцию без вмешательства эволюционных факторов. В генах, участвующих в контроле иммунитета и воспаления, дисбаланс HWE, вероятнее всего, обусловлен эволюционным отбором определенной аллели, которая ассоциирована с более эффективным иммунным или воспалительным ответом. Следовательно, нарушение равновесия у пациентов с ХОБЛ, наблюдаемое в отношении полиморфизма rs1800629 (TNF $\alpha$ ), не требует исключения из исследования ассоциации в группах, которые представляют собой часть одной и той же популяции.

На следующем этапе были сопоставлены частоты распространенности генотипов и аллелей для этих полиморфных вариантов генов у пациентов с ХОБЛ

Таблица 1 – Результаты оценки частот встречаемости генотипов полиморфизма rs1800795 гена IL6 на соответствие уравнению Харди-Вайнберга в группах пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Table 1 – The results of assessing the frequency of genotypes of the rs1800795 polymorphism of the IL6 gene for compliance with the Hardy-Weinberg equation in groups of patients with COPD and healthy individuals

Генотип	Пациенты с ХОБЛ, %	HWE, %	$\chi^2$ ( $p$ )	Здоровые лица, %	HWE, %	$\chi^2$ ( $p$ )
CC	19,0	20,5	0,38 (0,54)	35,8	31,1	3,57 (0,06)
CG	52,6	49,6		40,0	49,3	
GG	28,4	29,9		24,2	19,5	

Примечание (здесь и в таблице 2): HWE – Hardy-Weinberg Equilibrium (ожидаемые частоты генотипов согласно уравнению Харди-Вайнберга);  $\chi^2$  – критерий хи-квадрат;  $p < 0,05$  – распределение наблюдаемых частот не соответствует равновесию ожидаемых частот.

Note (here and in Table 2): HWE – Hardy-Weinberg Equilibrium (expected genotype frequencies according to the Hardy-Weinberg equation);  $\chi^2$  – chi-square test;  $p < 0.05$  – the distribution of observed frequencies does not correspond to the equilibrium of expected frequencies.

Таблица 2 – Результаты оценки частот встречаемости генотипов полиморфизма rs1800629 гена TNF $\alpha$  на соответствие уравнению Харди-Вайнберга в группах пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Table 2 – Results of assessing the frequency of genotypes of the rs1800629 polymorphism of the TNF $\alpha$  gene for compliance with the Hardy-Weinberg equation in groups of patients with COPD and healthy individuals

Генотип	Пациенты с ХОБЛ, %	HWE, %	$\chi^2$ ( $p$ )	Здоровые лица, %	HWE, %	$\chi^2$ ( $p$ )
GG	62,1	58,2	4,61 (0,03)	74,7	73,5	0,92 (0,34)
GA	28,4	36,2		22,1	24,4	
AA	9,5	5,6		3,2	2,1	

и здоровых людей. При сравнительной оценке частот встречаемости генотипов и аллелей при аддитивном, рецессивном, доминантном и мультипликативном наследовании использовался критерий  $\chi^2$  (таблица 3).

Анализ распределения частот генотипов и аллелей у пациентов и здоровых людей не выявил статистически значимой разницы для рассматриваемого локуса гена TNF $\alpha$ . В литературе имеются указания, что у пациентов с ХОБЛ чаще встречается носительство гетерозиготного генотипа GA полиморфного локуса rs1800629 (TNF $\alpha$ ) по сравнению с людьми, не страдающими этим заболеванием, но подвергающимися воздействию продуктов горения биомассы (11,0 % против 3,1 %) [20]. Несмотря на отсутствие в нашем исследовании статистически значимых различий по частотам генотипов между изучаемыми выборками, носительство GA полиморфизма rs1800629 в группах пациентов с ХОБЛ и здоровых людей также распределяется подобным образом (28,4 % против 22,1 %).

Оценка генотипов и аллелей точки rs1800795 гена IL6 показала, что среди пациентов с ХОБЛ преобладают носители гетерозиготного генотипа GC (56,2 %) в сравнении с контрольной группой (40,0 %). Картина аллельного статуса, подобная

обнаруженной нами, наблюдалась и среди контрольной группы людей европейского происхождения в исследовании Seifart et al., 2005, где большая часть таких индивидов были носителями сочетания GC (44,0 %), а меньшая – сочетаний GG (37,1 %) и CC (18,9 %). Несмотря на это, результаты исследования жителей Испании показали, что по сравнению с выборкой, сформированной из числа пациентов с ХОБЛ, в группе здоровых людей незначительно преобладают носители генотипа GC (42,9 % и 44,3 % соответственно) [21]. Среди жителей Республики Башкортостан, напротив, частота встречаемости GC превалировала в отношении пациентов с ХОБЛ (51,5 %) по сравнению с группой контроля (44,9 %). Таким образом, частота минорной аллели С в белорусской популяции, согласно результатам нашего исследования (44,2 %) близка к средневропейской (44,0 %).

В дальнейшем был проведен анализ, направленный на определение генотипов/аллелей полиморфного варианта гена IL6, ассоциированных с развитием ХОБЛ. С этой целью были рассчитаны значения ОШ в аддитивной, рецессивной, доминантной и мультипликативной моделях наследования (таблица 4).

Таблица 3 – Частота встречаемости генотипов и аллелей по полиморфным вариантам генов у пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Table 3 – The frequency of genotypes and alleles for gene polymorphisms in patients with COPD and healthy individuals

Ген/rs	Генотип/ Аллель	Частота носительства, %		p
		Пациенты с ХОБЛ, n = 95	Здоровые лица, n = 95	
TNF $\alpha$ rs1800629	GG <sup>1</sup>	62,1 (59)	74,7 (71)	>0,05
	GA	28,4 (27)	22,1 (21)	
	AA	9,5 (9)	3,2 (3)	
	GG/GA <sup>2</sup>	90,5 (86)	96,8 (92)	>0,05
	AA	9,5 (9)	3,2 (3)	>0,05
	GA/ AA <sup>3</sup>	37,9 (36)	25,3 (24)	
	GG	62,1 (59)	74,7 (71)	
	аллель G <sup>4</sup>	76,3 (145)	85,8 (163)	>0,05
аллель A	23,7 (45)	14,2 (27)		
IL6 rs1800795	CC <sup>1</sup>	19,0 (18)	35,8 (34)	<b>0,03</b>
	CG	52,6 (50)	40,0 (38)	
	GG	28,4 (27)	24,2 (23)	
	CC/CG <sup>2</sup>	71,6 (68)	75,8 (72)	>0,05
	GG	28,4 (27)	24,2 (23)	<b>0,010</b>
	CG/GG <sup>3</sup>	81,1 (77)	64,2 (61)	<b>0,041</b>
	CC	19,0 (18)	35,8 (34)	
	аллель C <sup>4</sup>	45,3 (86)	55,8 (106)	
	аллель G	54,7 (104)	44,2 (84)	

*Примечание:* в скобках указано количество носителей генотипа/аллели; <sup>1</sup> – аддитивная модель наследования; <sup>2</sup> – рецессивная модель наследования; <sup>3</sup> – доминантная модель наследования; <sup>4</sup> – мультипликативная модель наследования; жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ).

*Note:* the number of carriers of the genotype/allele is indicated in brackets; <sup>1</sup> – additive model; <sup>2</sup> – recessive model; <sup>3</sup> – dominant model; <sup>4</sup> – multiplicative model; statistically significant differences are shown in bold ( $p < 0.05$ ).

Таблица 4 – Вероятность встречаемости генотипов при ХОБЛ (отношение шансов) для анализируемых полиморфных вариантов

Table 4 – The probability of genotype frequency in COPD (odds ratio) for the analyzed polymorphisms

Ген/rs	Генотип/ Аллель	Частота носительства, %		$\chi^2$ (p)	ОШ	95 % ДИ
		Пациенты с ХОБЛ, n = 95	Здоровые лица, n = 95			
IL6 rs1800795	CC <sup>1</sup>	19,0 (18)	35,8 (34)	6,88 (0,03)	0,42	0,22–0,82
	CG	52,6 (50)	40,0 (38)		1,66	0,94–2,96
	GG	28,4 (27)	24,2 (23)		1,24	0,65–2,38
	CC/CG <sup>2</sup>	71,6 (68)	75,8 (72)	0,43 (0,51)	0,81	0,42–1,54
	GG	28,4 (27)	24,2 (23)	1,24	0,65–2,38	
	CG/GG <sup>3</sup>	81,1 (77)	64,2 (61)	6,78 (0,010)	2,38	1,23–4,63
	CC	19,0 (18)	35,8 (34)	0,42	0,22–0,82	
	аллель С <sup>4</sup>	45,3 (86)	55,8 (106)	4,83 (0,041)	0,66	0,44–0,98
	аллель G	54,7 (104)	44,2 (84)	1,53	1,02–2,29	

Примечание: <sup>1</sup> – аддитивная модель наследования; <sup>2</sup> – рецессивная модель наследования; <sup>3</sup> – доминантная модель наследования; <sup>4</sup> – мультипликативная модель наследования

Note: <sup>1</sup> – additive model; <sup>2</sup> – recessive model; <sup>3</sup> – dominant model; <sup>4</sup> – multiplicative model

Наблюдалось уменьшение числа носителей генотипа CC полиморфизма rs1800795 (IL6) у пациентов, страдающих ХОБЛ, в 2,38 раза по сравнению с группой здоровых людей (ОШ = 0,42; ДИ = [0,22–0,82],  $p = 0,03$ ). Другие исследователи в результате проведенного мета-анализа также обнаружили значительную связь между rs1800795 и ХОБЛ в отношении такого же аллельного носительства. Отношение шансов для носителей аллели С составило 0,06 (ДИ = [0,00–0,57],  $p = 0,01$ ). В другой работе частота носительства генотипа GG этого же полиморфного локуса у пациентов с IV стадией ХОБЛ была значительно выше, чем при II и III стадиях заболевания [25].

Стоит отметить, что данный полиморфный маркер находится в той области гена, которая связывается с глюкокортикоидным рецептором. При наличии аллели С в данном полиморфном локусе формируется участок для связывания ядерного фактора NF-1. Показано, что носительство генотипа CC сопряжено со сниженной экспрессией провоспалительного интерлейкина 6 в отличие от гомозиготного носительства GG [24], что, полагают, замедляет образование патологического очага.

### Заключение

У лиц, страдающих ХОБЛ, вероятность носительства генотипов CG/GG полиморфного локуса rs1800795 гена IL6 в 2,38 раза выше по сравнению со здоровыми людьми.

### Список цитированных источников

- Zeng, G. Non-smoking-related chronic obstructive pulmonary disease: A neglected entity? / G. Zeng, B. Sun, N. Zhong // *Respirology*. – 2012. – Vol. 17, № 6. – P. 908–912.
- Duque, G. A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases / G. A. Duque, A. Descoteaux // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 5, № 491. – P. 1–12.

- Role of epithelial chemokines in the pathogenesis of airway inflammation in asthma / C. Liu [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – Vol. 17, № 5. – P. 6935–6941.
- Matera, M. G. TNF- $\alpha$  inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water / M. G. Matera, L. Calzetta, M. Cazzola // *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. – 2010. – Vol. 23, № 2. – P. 121–150.
- Tumor necrosis factor-alpha serum levels, weight loss and tissue oxygenation in chronic obstructive pulmonary disease / G. Pitsiou [et al.] // *Respir. Med.* – 2002. – Vol. 96, № 8. – P. 594–598.
- Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease / S. S. Hacievliyagil [et al.] // *Respir. Med.* – 2006. – Vol. 100, № 5. – P. 846–85.
- Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD / J.-Q. He [et al.] // *Thorax*. – 2009. – Vol. 64, № 8. – P. 698–704.
- Jaitovich, A. Skeletal Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. What We Know and Can Do for Our Patients / A. Jaitovich, E. Barreiro // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2018. – Vol. 198, № 2. – P. 175–186.
- Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung / C. Kuhn 3rd [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 22, № 3. – P. 289–295.
- Rincon, M. Role of IL-6 in Asthma and Other Inflammatory Pulmonary Diseases / M. Rincon, C. G. Irvin // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, № 9. – P. 1281–1290.
- Miners, J. O. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance / J. O. Miners, R. A. McKinnon, P. I. Mackenzie // *Toxicology*. – 2002. – Vol. 181, № 182. – P. 453–456.
- Hornung, F. TNF- $\alpha$ -induced secretion of C-C chemokines modulates C-C chemokine receptor 5 expression on peripheral blood lymphocytes / F. Hornung, G. Scala, M. J. Lenardo // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164, № 12. – P. 6180–6187.
- Gene polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease / X. Wu [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2014. – Vol. 18, № 1. – P. 15–26.
- Luo, Y. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms [Electronic resource] / Y. Luo, S. G. Zheng //

- Front Immunol. – Mode of access: 115 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5165036/>. – Date of access: 30.12.2019. – DOI: 10.3389/fimmu.2016.00604.
15. Neurath, M. F. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer / M. F. Neurath, S. Finotto // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2011. – Vol. 2, №22. – P. 83–89.
  16. Smoak, K. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation / K. A. Smoak, J. A. Cidlowski // *Mech. Ageing Dev.* – 2004. – Vol. 125, №10. – P. 697–706.
  17. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women / S. L. Ferrari [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 88, №1. – P. 255–259.
  18. Association of cytokines genes (ILL, IL1RN, TNF, LTA, IL6, IL8, IL0) polymorphic markers with chronic obstructive pulmonary disease / K. V. Danilko [et al.] // *Mol. Biol. (Mosk).* – 2007. – Vol. 41, №1. – P. 26–36.
  19. Interleukin-6 gene – 174 G>C polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis / X. M. Xie [et al.] // *Genetics and Molecular Researc.* – 2015. – Vol. 14, №3. – P. 8516–8525.
  20. TNF promoter polymorphisms are associated with genetic susceptibility in COPD secondary to tobacco smoking and biomass burning / J. M. Reséndiz-Hernández [et al.] // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2018. – Vol. 13. – P. 627–637.
  21. Association of IL-6 gene polymorphisms and COPD in a Spanish population / E. Córdoba-Lanús [et al.] // *Respir. Med.* – 2008. – Vol. 102, №12. – P. 1805–1811.
  9. Kuhn C 3rd, Homer RJ, Zhu Z, Ward N, Flavell RA, Geba GP, Elias JA Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung. *Am. J. Respir Cell. Mol. Biol.* 2000 Mar;22(3):289-95. DOI: 10.1165/ajrcmb.22.3.3690.
  10. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2012;8(9):1281-90. DOI: 10.7150/ijbs.4874.
  11. Miners JO, McKinnon RA, Mackenzie PI. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:453-6. DOI: 10.1016/s0300-483x(02)00449-3.
  12. Hornung F, Scala G, Lenardo MJ. TNF-alpha-induced secretion of C-C chemokines modulates C-C chemokine receptor 5 expression on peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6180-7. DOI: 10.4049/jimmunol.164.12.6180.
  13. Wu X, Yuan B, López E, Bai C, Wang X. Gene polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Cell. Mol. Med.* 2014 Jan;18(1):15-26. DOI: 10.1111/jcmm.12159.
  14. Luo Y, Zheng SG. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Front Immunol.* 2016 Dec 19;7:604. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00604.
  15. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Apr;22(2):83-9. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.02.003.
  16. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing. Dev.* 2004 Oct-Nov;125(10-11):697-706. DOI: 10.1016/j.mad.2004.06.010. PMID: 15541765.
  17. Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnero P, Humphries SE, Greenspan SL. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 Jan;88(1):255-9. DOI: 10.1210/jc.2002-020092.
  18. Danilko KV, Korytina GF, Akhmidishina LZ, Ianbaeva DG, Zagidullin ShZ, Victorova TV. [Association of cytokines genes (ILL, IL1RN, TNF, LTA, IL6, IL8, IL0) polymorphic markers with chronic obstructive pulmonary disease]. *Mol. Biol. (Mosk).* 2007 Jan-Feb;41(1):26-36.
  19. Xie XM, Ke R, Zhang YH, Wang GZ, Zhu YT, Hussian T, Yang L, Li MX. Interleukin-6 gene -174G>C polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis. *Genet. Mol. Res.* 2015 Jul 28;14(3):8516-25. DOI: 10.4238/2015.
  20. Reséndiz-Hernández JM, Ambrocio-Ortiz E, Pérez-Rubio G, López-Flores LA, Abarca-Rojano E, Pavón-Romero GF, Flores-Trujillo F, de Jesús Hernández-Zenteno R, Camarena Á, Pérez-Rodríguez M, Salazar AM, Ramírez-Venegas A, Falfán-Valencia R. TNF promoter polymorphisms are associated with genetic susceptibility in COPD secondary to tobacco smoking and biomass burning. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2018 Feb 16; 13:627-637. DOI: 10.2147/COPD.S147688.
  21. Córdoba-Lanús E, de-Torres JP, López-Aguilar C, Rodríguez-Pérez MC, Maca-Meyer N, Montejo-de-Garcini A, Aguirre-Jaime A, Pérez-Méndez L, Casanova C. Association of IL-6 gene polymorphisms and COPD in a Spanish population. *Respir Med.* 2008 Dec;102(12):1805-11. DOI: 10.1016/j.rmed.2008.06.012.

## References

- 1 Zeng G, Sun B, Zhong N. Non-smoking-related chronic obstructive pulmonary disease: a neglected entity? *Respirology.* 2012 Aug; 17(6):908-12. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2012.02152.x
- 2 Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014 Oct 7; 5:491. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00491.
- 3 Liu C, Zhang X, Xiang Y, Qu X, Liu H, Liu C, Tan M, Jiang J, Qin X. Role of epithelial chemokines in the pathogenesis of airway inflammation in asthma (Review). *Mol. Med. Rep.* 2018 May; 17(5):6935-6941. DOI: 10.3892/mmr.2018.8739.
- 4 Matera MG, Calzetta L, Cazzola M. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2010 Apr;23(2):121-8. DOI: 10.1016/j.pupt.2009.10.007
- 5 Pitsiou G, Kyriazis G, Hatzizisi O, Argyropoulou P, Mavrofridis E, Patakas D. Tumor necrosis factor-alpha serum levels, weight loss and tissue oxygenation in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 2002 Aug;96(8):594-8. DOI: 10.1053/rmed.2002.1322.
- 6 Hacievliyagil SS, Gunen H, Mutlu LC, Karabulut AB, Temel I. Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 2006 May;100(5):846-54. DOI: 10.1016/j.rmed.2005.08.022.
- 7 He JQ, Foreman MG, Shumansky K, Zhang X, Akhbir L, Sin DD, Man SF, DeMeo DL, Litonjua AA, Silverman EK, Connett JE, Anthonisen NR, Wise RA, Paré PD, Sandford AJ. Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD. *Thorax.* 2009 Aug;64(8):698-704. DOI: 10.1136/thx.2008.111278.
- 8 Jaitovich A, Barreiro E. Skeletal Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. What We Know and Can Do for Our Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2018 Jul 15;198(2):175-186. DOI: 10.1164/rccm.201710-2140CI.



# SINGLE NUCLEOTIDE POLIMORPHISMS IN THE STRUCTURE OF IL6 AND TNFA GENES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

---

*E. A. Khotko, A. D. Tahanovich, G. V. Shabaev, A. H. Kadushkin*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

**Introduction.** Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a polydetermined disease characterized by abnormal inflammation of the lung tissue. In COPD, activated macrophages, T-cells, and fibroblasts actively synthesize interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Polymorphisms of the genes encoding the formation of these interleukins can cause an abnormal increase in their synthesis.

**Objective** – to determine the frequency of genotype carriage of the rs1800795 (IL6) and rs1800629 (TNF $\alpha$ ) polymorphisms in patients with COPD and healthy people and their association with the development of the disease.

**Materials and methods.** Carriage of rs1800629 (TNF $\alpha$ ) and rs1800795 (IL6) polymorphism genotypes in 95 patients with COPD and 95 healthy individuals was determined using real-time PCR.

**Results.** Evaluation of genotypes and alleles of the rs1800795 (IL6) showed that carriers of the heterozygous genotype GC predominate among patients with COPD (56.2 %) compared to the control group (40.0 %). No statistically significant differences were found in the frequency of genotypes with the minor allele of rs1800629 (TNF $\alpha$ ) in patients with COPD and healthy people ( $p > 0.05$ ), and the share of the GA genotype carriers was 28.4 % and 22.1%, respectively.

**Conclusions.** In COPD patients, the probability of carrying the CG/GG genotypes of the polymorphism rs1800795 of the IL6 gene is 2.38 times higher compared to healthy people.

**Keywords:** cytokines, polymorphism, chronic obstructive pulmonary disease.

**For citation:** Khotko EA, Tahanovich AD, Shabaev GV, Kadushkin AH. Single nucleotide polymorphisms in the structure of il6 and tnfa genes in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 64–71 (in Russian).

*Поступила 08.09.2022*

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНОГО МАСЛА *HUMULUS SPP.*

*И. С. Черней, В. Т. Чещевик*

*Учреждение образования «Полесский государственный университет»,  
г. Пинск, Республика Беларусь*

**Введение.** Эфирные масла характеризуются многокомпонентностью, которая обуславливает разнообразие их биологических эффектов, в том числе и антиоксидантных свойств.

**Цель исследования** – изучение антиоксидантной активности эфирного масла, полученного из растительного сырья хмеля *Humulus spp.* следующих культивируемых в Беларуси сортов: Магnum, Перле, Геркулес, Сладек, Норден Бревер, Шпальтер Селект, Традиционный.

**Материалы и методы.** Эфирное масло получали методом гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджерера. Компонентный состав масла определяли с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии. Антиоксидантную активность определяли спектрофотометрически с использованием DPPH и ABTS<sup>+</sup> радикал-генерирующих систем.

**Результаты.** β-Мирцен, α-гумулен, β-пинен и β-кариофиллен являются преобладающими компонентами эфирных масел. Антиоксидантная активность (АОА) эфирных масел в DPPH- и ABTS-тестах изменялась пропорционально изменению их концентрации. Наибольшей АОА в двух тестах обладало эфирное масло, полученное из хмеля сорта Геркулес, его IC<sub>50</sub> составила 0,108 мг/мл по отношению к DPPH и 0,062 мг/мл по отношению ABTS<sup>+</sup>.

**Заключение.** Эфирное масло хмеля сорта Геркулес по содержанию основных компонентов незначительно отличается от других исследованных сортов. Вследствие этого наиболее вероятным является то, что более высокие антиоксидантные свойства эфирного масла сорта Геркулес обусловлены содержанием специфических для него минорных компонентов.

**Ключевые слова:** эфирное масло, антиоксидантная активность, *Humulus spp.*, DPPH, ABTS.

**Для цитирования.** Черней, И. С. Антиоксидантная активность эфирного масла *Humulus spp.* / И. С. Черней, В. Т. Чещевик // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 72–77.

### Введение

Антиоксиданты широко используются в качестве пищевых добавок и консервантов [1]. Кроме того, антиоксиданты играют важную роль в терапии различных заболеваний, ассоциированных с генерацией активных форм кислорода и перекисным окислением липидов. Исследования последних лет указывают на то, что низкомолекулярные антиоксиданты природного происхождения могут рассматриваться как наиболее перспективные и безопасные защитные агенты, уменьшающие окислительное повреждение клеток и тканей организма человека в случае истощения или неэффективности ферментативных и неферментативных компонентов собственной антиоксидантной системы. Также природные антиоксиданты могут быть хорошей альтернативой синтетическим в пищевой промышленности, для предотвращения окисления пищевых продуктов, богатых ненасыщенными жирными кислотами [2]. В связи с этим каждый год растет интерес к веществам, обладающим антиоксидантной активностью (АОА) и поступающим в организм человека и животных вместе с продуктами питания. Пища, богатая антиоксиданта-

ми, снижает риск многих заболеваний, в частности, сердечно-сосудистой системы и онкологических заболеваний [3].

В природе известно множество веществ растительного происхождения, которые обладают АОА. Значительное количество видов растений уже проверены на АОА, но наиболее перспективными являются те, которые в своем составе имеют флавоноиды, различные фенолы, антоцианы и эфирные масла [4].

Особенностью эфирных масел является многокомпонентность, которая обуславливает разнообразие биологических эффектов, в том числе и антиоксидантные свойства [5]. В то же время биологическая активность эфирного масла зависит от его компонентного состава, на который оказывают влияние различные условия выращивания растений [6].

АОА эфирных масел обусловлена содержанием в их составе фенолов (карвакрол, тимол, эвгенол), которые по своей АОА вдвое превосходят синтетический антиоксидант ионол. Кроме того, такие компоненты, относящиеся к монотерпенам, как γ-терпинен и α-терпинолен, сесквитерпены (зин-

гиберен и  $\beta$ -кариофиллен) и цитраль, также обладают высоким противоокислительным действием [7]. Известно, что на АОА эфирных масел влияет не только повышенное содержание основных компонентов, но и синергическое взаимодействие компонентов между собой.

Хмель (*Humulus spp.*) культивируется почти во всех странах мира. В Беларуси хмель распространен по всей территории и выращивается в коммерческих целях на сельскохозяйственном предприятии на юго-западе нашей страны с 1993 г. Широкое распространение и масштабное выращивание хмеля связано с его богатым химическим составом и свойствами, которые нашли свое применение в разных отраслях промышленности. В своем составе *Humulus spp.* содержит различные биологически активные вещества, включая и эфирные масла.

Содержание эфирного масла в растительном сырье хмеля колеблется в пределах 0,5 до 3 % [6]. Самыми распространенными компонентами эфирного масла хмеля являются монотерпеновые углеводороды с мирценом в качестве основного вещества и сесквитерпеновые углеводороды, такие как  $\alpha$ -гумулен,  $\beta$ -кариофиллен, (E)- $\beta$ -фарнезен [8]. Кроме того, эфирное масло хмеля содержит различные группы полифенольных соединений с пренилфлавоноидами, которые являются наиболее ценными соединениями, так как обладают АОА, противовоспалительной и антипролиферативной активностью [9].

В связи с вышеизложенным, принимая во внимание тот факт, что выращиваемый в Беларуси хмель широко применяется в пищевой промышленности и других отраслях, целью данной работы явилось исследование антиоксидантной активности эфирного масла, полученного из хмеля следующих культивируемых в Беларуси сортов: Магнум, Перле, Геркулес, Сладек, Норден Бревер, Шпальтер Селект, Традиционный.

### Материалы и методы

В работе использовано сырье хмеля (сорт Магнум, Перле, Геркулес, Сладек, Норден Бревер, Шпальтер Селект, Традиционный), предоставленное ООО «Бизон», DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил), ABTS (2,2'-Азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфо кислота) диаммониевая соль), Trolox (6-Гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), DMSO (диметилсульфоксид),  $K_2S_2O_8$  (персульфат калия) производства Sigma Aldrich (США).

Получение эфирного масла проводили методом гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджера. В колбу емкостью 1000 см<sup>3</sup> помещали 30 г измельченного в мелкую фракцию сырья

и заливали его дистиллированной водой до 2/3 объема. Колбу помещали в колбонагреватель. Конденсацию смеси воды и эфирного масла осуществляли с помощью обратного холодильника. Процесс гидродистилляции в стадии кипения продолжался не более 3 ч. Отбор эфирного масла осуществляли с использованием шприца. Гидродистилляцию проводили в трехкратном повторении для каждого вида исследуемого сырья.

Компонентный состав эфирных масел определяли с помощью газового хромато-масс-спектрометра Shimadzu QP2010 (EI ионизация) с использованием неполярной капиллярной колонки (30 м  $\times$  0,32 мм  $\times$  0,5 мкм, активная фаза Rtx-1MS Restek). Анализ был выполнен при следующем температурном режиме: начальная температура +50 °С на протяжении 3 мин, далее температура повышалась на 4 °С/мин до +310 °С. Газ-носитель – гелий с постоянным давлением 49,5 кПа, режим инъекции – с расщеплением потока 1/3. Пробоподготовка: эфирное масло объемом 10 мкл смешивали с 1,5 мл дихлорметана. Объем пробы эфирного масла, вносимый в газовый хроматограф, составил 1 мкл. Идентификацию компонентов эфирного масла проводили с помощью базы данных Wiley.

Антиоксидантная активность эфирного масла исследовали спектрофотометрически с использованием DPPH-радикал-генерирующей системы [10]. DPPH представляет собой стабильный свободный радикал, который используется для тестирования АОА химических компонентов эфирных масел, экстрактов и других веществ из натуральных продуктов. Антиоксидантные соединения, присутствующие в эфирном масле, реагируют с DPPH, превращая его в 1-дифенил-2-пикрилгидразин, при этом меняется цвет раствора с фиолетового на желтый [11]. В свежеприготовленный спиртовой раствор DPPH (57 мкМ) добавляли раствор эфирного масла хмеля в диапазоне концентраций 0,01–5 мг/мл. В качестве растворителя эфирного масла использовали DMSO. В контрольной и опытных пробах концентрация DMSO составляла 5 %. Регистрация изменений оптической плотности раствора DPPH после инкубации с исследуемым эфирным маслом при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин осуществлялась на длине волны 515 нм. Измерения проводили в трех повторностях.

АОА образцов рассчитывали по формуле 1.1.

$$AOA(\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{Образец}}{A_{DPPH}} \times 100\% \quad (1.1)$$

где:  $A_{DPPH}$  – оптическая плотность контрольной пробы;  $A_{Образец}$  – оптическая плотность опытной пробы.

Значение оптической плотности DPPH в контрольной пробе принимали за 100 %. Результаты выражены как IC50 для каждого из исследуемых образцов эфирного масла. Концентрация образца, при которой процент ингибирования достигает 50 %, является IC50.

Элиминация радикалов ABTS широко используется для оценки АОА, особенно в пищевых продуктах [12]. Анализ удаления радикалов ABTS первоначально состоит из превращения ABTS (бесцветная окраска) в ABTS<sup>+</sup> (синий цвет), что происходит при добавлении K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. В присутствии соединений-антиоксидантов ABTS<sup>+</sup> снова переходит в нейтральную ABTS (бесцветную) форму [11]. Радикал ABTS (2 мМ) окисляли персульфатом калия (0,17 мМ) в бидистиллированной воде после инкубации при комнатной температуре в темноте 18 ч. Раствор ABTS<sup>+</sup> доводили этанолом до оптической плотности 0,7(±0,02) при длине волны 745 нм. В подготовленный раствор ABTS<sup>+</sup> добавляли раствор эфирного масла хмеля в диапазоне концентраций 0,01–1 мг/мл. В качестве растворителя для эфирных масел использовали DMSO. В контрольных и опытных пробах концентрация DMSO составляла 5 %. Регистрацию изменения оптической плотности раствора ABTS<sup>+</sup> после инкубации с исследуемым эфирным маслом при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин осуществляли на длине волны 745 нм. Измерение проводили в трех повторностях.

АОА образцов рассчитывали по формуле 1.2

$$AOA(\%) = \frac{A_{ABTS} - A_{Образец}}{A_{ABTS}} \times 100\% \quad (1.2)$$

где:  $A_{ABTS}$  – оптическая плотность контрольной пробы;  $A_{Образец}$  – оптическая плотность опытной пробы.

Уровень оптической плотности ABTS в контрольной пробе принимали за 100 %. Результаты выражены как IC50 для каждого из исследуемых образцов эфирного масла.

В качестве стандартного антиоксиданта использовали Trolox (0,39–6,3 мкг/мл) при исследовании антиоксидантной активности в отношении DPPH и ABTS радикалов.

Статистическую обработку результатов и вычисление значений IC50 осуществляли с использованием программы статистического анализа GraphPad Prism7.

### Результаты и их обсуждение

Процентный выход эфирного масла хмеля исследованных сортов составил от 0,42(±0,04) до 2,05(±0,26) %. Наибольший выход эфирного масла был характерен для сорта Магнум.

Состав основных компонентов эфирного масла из хмеля исследуемых сортов Магнум, Перле, Геркулес, Сладек, Норден Бревер, Шпальтер Селект, Традиционный представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Состав измеряемых компонентов эфирного масла из различных сортов хмеля, %

Table 1 – The composition of the measured components of essential oil from various hop varieties, %

Сорт/Компонент	β-мирцен	α-гумулен	β-пинен	β-кариофиллен	β-фарнезен
Магнум	48,73	32,93	0,98	8,44	–
Перле	29,12	45,15	0,55	13,36	1,45
Геркулес	37,17	38,07	1,11	9,46	–
Сладек	25,07	34,90	0,47	8,80	17,11
Норден Бревер	48,97	31,96	0,79	9,55	1,35
Шпальтер Селект	39,29	19,01	1,06	7,23	9,85
Традиционный	0,72	0,63	34,41	52,31	–

Исследуемые эфирные масла хмеля, полученные из различных сортов, произрастающих в одинаковых климатогеографических условиях, имеют незначительные отличия в качественном компонентном составе. β-Мирцен и α-гумулен являются главными компонентами почти в каждом сорте хмеля, за исключением сорта Традиционный, в нем содержание β-мирцена и α-гумулена, по отношению к среднему содержанию, снижено на 98 %. Преобладающими компонентами в сорте Традиционный являются β-пинен и β-кариофиллен, содержание которых по сравнению с другими сортами в среднем повышено на 97,9 и 93 %, соответственно. Компонент β-фарнезен не был обнаружен в трех сортах хмеля: Магнум, Геркулес, Традиционный. Отличия по компонентному составу эфирных масел хмеля обусловлены в основном биологическими особенностями исследуемых сортов, так как все сорта произрастали в одинаковых климатогеографических условиях.

АОА эфирных масел по отношению к DPPH и ABTS радикалам изменялась прямопропорционально изменению их концентрации. Чем ниже значение IC50, тем выше антиоксидантная активность тестируемого образца. IC50 эфирных масел по отношению к DPPH и ABTS радикалам представлены на рисунках 1 и 2.

Эфирное масло из сорта Магнум обладает наиболее низкой АОА по отношению к DPPH радикалам в сравнении с эфирным маслом из других сортов хмеля. Наилучшее действие показало эфирное масло, полученное из сорта Геркулес, IC50 для которого составила 0,108 мг/мл. В то же время по

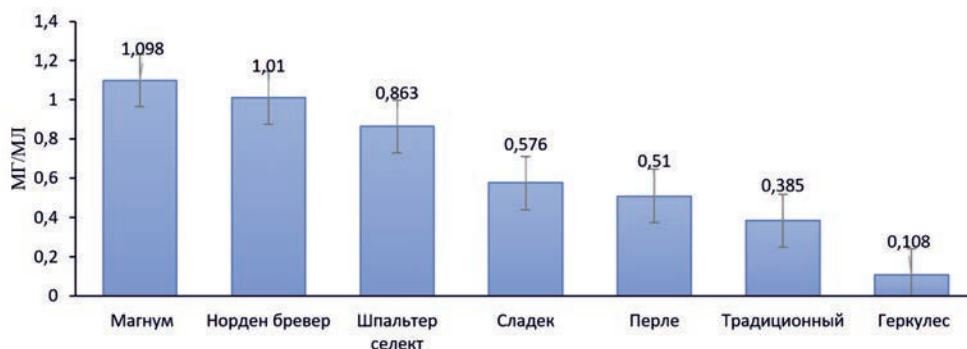


Рисунок 1 – IC50 эфирных масел из различных сортов хмеля в тесте с DPPH

Picture 1 – IC50 of essential oils from various hop varieties relative to DPPH

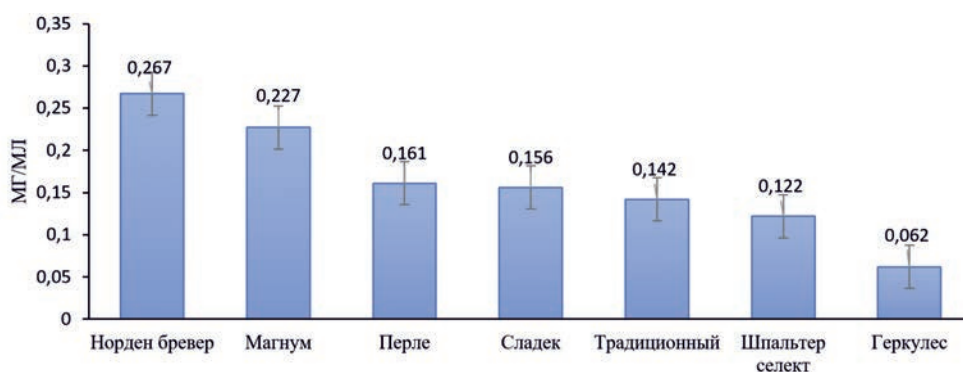


Рисунок 2 – IC50 эфирных масел из различных сортов хмеля в тесте ABTS+

Picture 2 – IC50 of essential oils from various hop varieties relative to ABTS+

сравнению с Тролокс, IC50 которого составила 0,0025 мг/мл, АОА данного сорта хмеля была гораздо ниже. Следует отметить, что эфирные масла, полученные из сортов Магнум, Сладек, Перле, Норден Бреввер, не обладают АОА при концентрации от 0,05 мг/мл и ниже.

Исследование АОА в отношении радикала ABTS<sup>+</sup> обусловлено его большей реакционной способностью и отличием механизмов нейтрализации по сравнению с радикалом DPPH [13].

Анализ данных показывает, что АОА исследуемых сортов хмеля (последовательность увеличения АОА в ряду сортов хмеля) отличаются от установленных методом DPPH.

Как и в тест-системе с DPPH, в ABTS<sup>+</sup> системе наибольшей АОА обладает эфирное масло хмеля сорта Геркулес (IC50 – 0,062 мг/мл), но по сравнению со стандартным антиоксидантом Тролокс (IC50 – 0,0011 мг/мл), АОА все равно оставалась более низкой.

## Заключение

Наибольшей АОА в двух тестах обладало эфирное масло, полученное из хмеля сорта Геркулес, его IC50 составило 0,108 мг/мл в тесте с DPPH и 0,062 мг/мл в тесте с ABTS<sup>+</sup>. Эфирное масло хмеля сорта Геркулес по содержанию основных компонентов незначительно отличается от других исследованных сортов (см. таблицу 1). Вследствие этого наиболее вероятным является то, что более высокие антиоксидантные свойства эфирного масла сорта Геркулес по сравнению с другими сортами обусловлены содержанием специфических для него минорных компонентов. Поскольку концентрация минорных компонентов в эфирном масле значительно ниже, чем концентрация используемого стандартного антиоксиданта Тролокса в тестах с DPPH и ABTS<sup>+</sup>, то можно предположить, что в случае сопоставимых концентраций эффективность эфирных масел как антиоксидантов может быть значительно выше, чем у Тролокса.

## Список цитированных источников

1. Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants / Adel F. Ahmed [et.al.] // Food Science and Human Wellness. – 2019. – Vol. 8. – P.299–305. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.07.004.

2. Amzad Hossain, M. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis* / M. Amzad Hossain, Muhammad Dawood Shah // Arabian Journal of Chemistry. – 2015. – Vol.8, №1. – P.66–71. – DOI:10.1016/j.arabjc.2011.01.007.

3. Majhenic, L. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts / L. Majhenic, M. Skerget, Z. Knez // *Food Chemistry*. – 2007. – Vol.104, № 3. – P. 1258–1268.
4. Зыкова, И. Д. Антиоксидантная активность различных фракций эфирного масла вислоплодников борщевика рассеченного и пастернака лесного / И. Д. Зыкова, А. А. Ефремов, Л. В. Наймушина // *Вестник КрасГАУ*. – 2017. – № 3. – С.114–119.
5. Chemical composition, antioxidant capacity, toxicity and antibacterial activity of the essential oils from *Acantholippia deserticola* (Phil.) Moldenke (Rica rica) and *Artemisia copa* Phil. (Copa copa) extracted by microwave-assisted hydrodistillation / M. Larrazabal-Fuentes [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2019. – Vol.142, № 12. – P. 1–8. – DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111830.
6. Черней, И. С. Влияние процесса озонирования на компонентный состав эфирных масел *Artemisia absinthium* и *Humulus lupulus* / И. С. Черней, А. Бекхтер, В. Т. Чещевик, К. Smigielski // *Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология*. – 2022. – № 2 (259). – С. 182–190.
7. Самусенко, А. Л. Изучение зависимости антиоксидантной активности эфирных масел кориандра, имбиря, семян тмина и розового грейпфрута от концентрации масла в системе методом капиллярной газовой хроматографии / А. Л. Самусенко // *Химия растительного сырья*. – 2014. – № 2. – С. 97–102.
8. Composition and In Vitro Effects of Cultivars of *Humulus lupulus* L. Hops on Cholinesterase Activity and Microbial Growth / J. Kobus-Cisowska [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11, № 6. – P. 1377–1381. – DOI:10.3390/nu11061377.
9. Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (*Humulus lupulus* L.) of five health and infected polish cultivars / L. Pistelli [et al.] // *Industrial Crops and Products*, 2018. – Vol. 124. – P. 653–662. – DOI:10.1016/j.indcrop.2018.08.009.
10. Zengin, H. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy / H. Zengin, Ayse H. Baysal // *Molecules*. – 2014. № 19. – P. 17773–17798. DOI:10.3390/molecules191117773.
11. Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications / L. D. Nascimento [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 988. – P. 1–35. DOI:10.3390/biom10070988.
12. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdari* a leaves / J. Zhen [et al.] // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 190. – P. 673–680.
13. Dawidowicz, A. L. Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds / A. L. Dawidowicz, M. Olszowy // *Talanta*. – 2012. – Vol. 97. – P. 312–317. – DOI:10.1016/j.talanta.2012.04.036.
3. Majhenic L, Skerget M, Knez Z, Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 2007, vol. 104:3, pp. 1258–1268.
4. Zykova ID, Efremov AA, Naimushina LV, Antioxidant activity of various fractions of cremocarp essential oil of cleaved parsnip and dissected woodland parsnip. *Vestnik Krasnojarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University], 2017, no. 3, pp. 114–119.
5. Larrazabal-Fuentes M, Palma J, Paredes A, Mercado A, Neira I, Lizama C, Sepulveda B, Bravo J. Chemical composition, antioxidant capacity, toxicity and antibacterial activity of the essential oils from *Acantholippia deserticola* (Phil.) Moldenke (Rica rica) and *Artemisia copa* Phil. (Copa copa) extracted by microwave-assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 2019, vol.142:12, pp. 1–8. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111830.
6. Chernei IS, Bekhter A, Cheshchevik VT, Smigielski K. Influence of the ozonation process on the composition of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Humulus lupulus*. *Proceedings of BSTU, issue 2, Chemical Engineering, Biotechnologies, Geoecology*, 2022, no. 2 (259), pp. 182–190 (In Russian).
7. Samusenko AL. Study of the dependence of the antioxidant activity of essential oils of coriander, ginger, cumin seeds and pink grapefruit on the oil concentration in the system by capillary gas chromatography. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja* [Chemistry of plant raw material], 2014, no. 2, pp. 97–102.
8. Kobus-Cisowska J, Szymanowska-Powalowska D, Szczepaniak O, Kmiecik D, Przeor M, Gramza-Michałowska A, Szulc P. Composition and In Vitro Effect of Cultivars of *Humulus lupulus* L. Hops on Cholinesterase Activity and Microbial Growth. *Nutrients*, 2019, no. 11(6), pp. 1377–1381. DOI:10.3390/nu11061377.
9. Pistelli L, Ferria B, Cionia PL, Koziara M, Agacka M, Skomra U. Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (*Humulus lupulus* L.) of five health and infected polish cultivars. *Industrial Crops and Products*, 2018, vol. 124, pp. 653–662. DOI:10.1016/j.indcrop.2018.08.009.
10. Zengin H, Baysal AH. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*, 2014, no. 19, pp. 17773–17798. DOI:10.3390/molecules191117773.
11. Nascimento LD, Moraes AAB, Costa KSD, Pereira JM, Taube PS, Costa CML, Neves CJ, Aguiar AEH, Faria LJG, Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. *Biomolecules*, 2020, vol. 10:988, pp. 1–35. DOI:10.3390/biom10070988.
12. Zhen J, Villani TS, Guo Y, Qi Y, Chin K, Pan MH, Ho CT, Simon JE, Wu Q. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdari* a leaves. *Food Chemistry*, 2016, vol. 190, pp. 673–680.
13. Dawidowicz AL, Olszowy M, Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds. *Talanta*, 2012, vol. 97, pp. 312–317. DOI:10.1016/j.talanta.2012.04.036.

## References

- 1 Adel FA, Fatma AKA, Zhenhua L, Changqin L, Jinfeng W, Wenyi K, Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, 2019, vol. 8:3, pp. 299–305. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.07.004.
- 2 Amzad HM, Shah MD, A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent

# ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *HUMULUS SPP.*

---

*I. S. Chernei, V. T. Cheshchevik*

*Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus*

**Introduction.** Essential oils are characterized by a multicomponent nature, which determines the diversity of their biological effects, including antioxidant properties.

**Objective** – the purpose of this work was to study the antioxidant activity of the essential oils obtained from plant raw materials of *Humulus spp.* of the following varieties cultivated in Belarus: Magnum, Perle, Herkules, Sladek, Northern Brewer, Spalter Select, Tradition.

**Materials and methods.** The essential oils were obtained by hydrodistillation using the Clevenger apparatus. The component composition of the oil was determined using gas chromatography-mass spectrometry. Antioxidant activity was determined spectrophotometrically using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical generating systems.

**Results.**  $\beta$ -Myrcene,  $\alpha$ -humulene,  $\beta$ -pinene and  $\beta$ -caryophyllene are the predominant components of essential oils. The antioxidant activity of essential oil with respect to DPPH and ABTS radicals changed in direct proportion to the change in their concentration. The essential oil obtained from the Hercules hop variety had the highest antioxidant activity in the two test systems, its IC<sub>50</sub> being 0.108 mg/ml in relation to DPPH and 0.062 mg/ml in relation to ABTS<sup>+</sup>.

**Conclusions.** The essential oil of the Hercules hop variety differs slightly from the other studied varieties in terms of the content of the main components. As a result, it is most likely that the higher antioxidant properties of the essential oil of the Hercules variety compared to other varieties are due to the content of minor components specific to it.

**Keywords:** essential oil, antioxidant activity, *Humulus spp.*, DPPH, ABTS.

**For citation:** Chernei IS, Cheshchevik VT. Antioxidant activity of essential oil of *Humulus spp.* *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1 pp. 72– 77 (in Russian).

*Поступила 29.08.2022*

## ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОЙ МОЩНОСТИ

Н. Н. Веялкина<sup>1,2</sup>, А. С. Пилотович<sup>1</sup>, О. С. Аксененко<sup>1</sup>, В. М. Щемелев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Гомель, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

**Введение.** Влияние ионизирующего излучения на организм человека неуклонно растет, что делает актуальным исследование радиационно-индуцированных эффектов. Изменение показателей уровня оксидативного стресса в печени и в целом в организме зависит от многих факторов, в том числе от дозы и режима облучения.

**Цель исследования** – оценить влияние однократного общего рентгеновского облучения в дозе 3 Гр на динамику показателей состояния АОС печени мышей линии С57В1/6 в остром постлучевом периоде.

**Материалы и методы.** Облучение животных проводилось при помощи рентгеновской установки биологического назначения X-Rad 320, мощность дозы – 98,8 сГр/мин. Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-е и 7-е сутки после облучения. В гомогенатах печени животных определяли концентрацию общего белка, ТБК-реактивных продуктов, восстановленного глутатиона, активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД).

**Результаты.** Содержание ТБК-активных продуктов в ткани печени мышей возрастало на 3-и и 7-е сутки после облучения ( $p < 0,05$ ). Отмечено снижение активности СОД и каталазы в печени облученных животных, наиболее выраженное к 3 суткам для каталазы и к 7 суткам для каталазы и СОД ( $p < 0,05$ ).

**Закключение.** Общее однократное облучение мышей линии С57В1/6 в дозе 3 Гр индуцирует развитие оксидативного стресса в печени животных, что характеризуется повышением ПОЛ и снижением активности ферментов АОС печени.

**Ключевые слова:** рентгеновское излучение, мыши, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион, ТБК-реактивные продукты.

**Для цитирования.** Динамика показателей антиоксидантной системы печени мышей после воздействия рентгеновского излучения высокой мощности / Н. Н. Веялкина [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 78–82.

### Введение

Влияние ионизирующего излучения на организм человека неуклонно растет вследствие проведения медицинских диагностических и терапевтических процедур при лучевой терапии онкологических заболеваний. Также сохраняется опасность сверхнормативного облучения персонала и населения в случае аварийных ситуаций, что делает актуальным исследование радиационно-индуцированных эффектов и поиск средств снижения повреждающего действия ионизирующего излучения.

Облучение нормальных тканей вызывает ряд событий, среди которых одним из основных является повышение уровня образования активных форм кислорода (АФК) и азота, как следствие, активация свободнорадикального окисления и развитие оксидативного стресса [1, 2]. АФК и оксидативный стресс способствуют развитию

радиационно-индуцированной цитотоксичности, биохимических и морфологических изменений в живом организме. Печень является основным органом, подверженным действию АФК [3], а окислительный стресс – одним из патологических механизмов, который приводит к возникновению и прогрессированию различных заболеваний печени и других внутренних органов в отдаленном постлучевом периоде [4, 5].

Функциональная активность ферментативного и неферментативного звеньев АОС печени важна для снижения уровня АФК. Изменение таких показателей, как активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатион-пероксидазы и глутатион-редуктазы, а также уровня глутатиона, реактивных соединений тиобарбитуровой кислоты (ТБК-реактивных продуктов) и др. является чувствительным биомаркером уровня оксидативного стресса в печени и в целом в ор-



ганизме [6]. При этом направленность изменений данных показателей зависит от многих факторов, в том числе от дозы и режима облучения, а также от срока после облучения, на котором проводится анализ [7, 8].

Цель исследования – оценить влияние однократного общего рентгеновского облучения в дозе 3 Гр на динамику показателей состояния АОС печени мышей линии С57В1/6 в остром постлучевом периоде.

### Материалы и методы исследований

Эксперименты проведены на лабораторных мышках линии С57В1/6 обоего пола в возрасте 2,5–3 месяца. Каждая группа состояла из 5 самок и 5 самцов. Животных содержали в условиях стационарного вивария Института радиобиологии НАН Беларуси, согласно установленным нормам. Все манипуляции с лабораторными животными в эксперименте выполнялись в соответствии с международными рекомендациями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [9].

Мышей подвергали общему однократному облучению в дозе 3 Гр с помощью рентгеновской установки биологического назначения X-Rad 320 Precision X-ray Inc (напряжение на трубке – 320 кВ, сила тока – 12,5 мА, мощность дозы – 98,8 сГр/мин, фильтр №2 (1,5 мм Al, 0,25 мм Cu, 0,75 мм – Sn) расстояние до объекта 50 см).

Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-е и 7-е сутки после облучения на фоне эфирного наркоза путем декапитации, немедленно проводилось вскрытие животных и выделение печени. Кусочки печени экспериментальных и контрольных животных взвешивали. Далее образцы печени гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльведжейма на протяжении 30–40 с в буфере при соотношении массы ткани и объем буфера 1:9. Все манипуляции проводились на льду. Полученные гомогенаты печени центрифугировали для получения цитозольно-микросомальной фракции, отбирали супернатант, который хранили при –80 °С.

Концентрацию белка в общей и цитозольной фракции ткани печени определяли методом Lowry в модификации Петерсона [10].

Определение содержания ТБК-реактивных продуктов в гомогенатах ткани печени оценивали методом, основанном на образовании окрашенного комплекса в реакции взаимодействия тиобарбитуровой кислоты с вторичными продуктами липопероксидации (преимущественно малоновым ди-

альдегидом), содержащимися в ткани печени [11]. Интенсивность окраски образующегося комплекса, измеряемая фотометрически при длине волны 540 нм, прямопропорциональна концентрации вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Концентрацию восстановленного глутатиона в гомогенатах ткани печени определяли с использованием реактива Элмана. При этом восстановленный глутатион определяли после осаждения белков трихлоруксусной кислотой [11].

Активность каталазы в цитозольно-микросомальной фракции гомогенатов ткани печени определялась спектрофотометрическим методом с использованием в качестве субстрата пероксида водорода [11]. Активность СОД в цитозольно-микросомальной фракции гомогенатов ткани печени определялась методом, основанным на утилизации СОД супероксиданион-радикала ( $O_2^{\cdot -}$ ), образующегося в результате реакции автоокисления адреналина (эпинефрина) в щелочной среде (рН 9,7) [12].

Измерения оптической плотности выполнялись на микропланшетном ридере Tecan Infinite M200 (Tecan Ltd., Swiss) с использованием 96-луночных микропланшетов (SARSTEDT) и специализированного программного обеспечения Tecan Magellan (v 7.2). Активность ферментов выражалась в виде удельной активности (Ед/мг белка) и рассчитывалась согласно общепринятым подходам для выражения ферментативной активности.

Статистическую обработку полученного материала проводили с использованием пакета прикладных программ «IBM SPSS Statistics 22». Результаты анализа считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . На рисунках данные представлены в виде медианы, 25%-, 75%-квартилей и min-, max-значений.

### Результаты и их обсуждение

В течение периода наблюдения не отмечено гибели животных в контрольной и опытных группах, через 7 суток после начала эксперимента животные имели несколько сниженный прирост массы тела, в среднем не более чем на 1–2 %, что может быть обусловлено как стрессовым состоянием, вызванным проводимыми манипуляциями, так и реакцией на облучение. Исходя из наших предыдущих исследований и публикаций других авторов значимые изменения массы тела животных на сроках до 7 суток наблюдаются при облучении в дозах от 5–6 Гр, тогда как при облучении в дозе 3 Гр и близких значимое снижение массы

тела животных наблюдается в более отдаленный период – 14–20 суток [13].

Общее однократное облучение животных в дозе 3 Гр вызвало усиление ПОЛ в печени, о чем свидетельствует повышение уровня ТБК-реактивных продуктов; наиболее выраженным был рост на 3-и и 7-е сутки после облучения ( $p < 0,05$ ) (рисунок 1).

Воздействие ионизирующего излучения вызывает немедленное образование активных форм кислорода и ожидаемо было наблюдать значимый

рост ТБК-реактивных продуктов уже в первые сутки после облучения. Возможно, при общем облучении в дозе 3 Гр значимое увеличение ТБК-реактивных продуктов на 3-и и 7-е сутки свидетельствует о развитии системной реакции на облучение.

В цитозольно-микросомальной фракции гомогенатов ткани печени облученных животных отмечено снижение активности СОД и каталазы (рисунок 2). Активность СОД значимо снижалась только к 7-м суткам после облучения, в среднем на 27,1 % по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Активность каталазы уже на первые сутки после облучения имела тенденцию к снижению, а более выраженное изменение наблюдалось к 3-м суткам на 37,8 % и на 49,6 % к 7-м суткам после облучения ( $p < 0,01$ ).

Другими авторами было отмечено повышение активности СОД и каталазы в печени лабораторных мышей при воздействии ионизирующего излучения, но данное повышение отмечалось на сроках наблюдения 15 мин при облучении в дозах 2–6 Гр [14] и 16 ч при облучении в дозе 8 Гр [7]. Тогда как в более отдаленные сроки после облучения наблюдается снижение активности данных ферментов, что может объяснять развитие оксидативного стресса [5].

Содержание восстановленного глутатиона (GSH) в ткани печени мышей, имело тенденцию к повышению

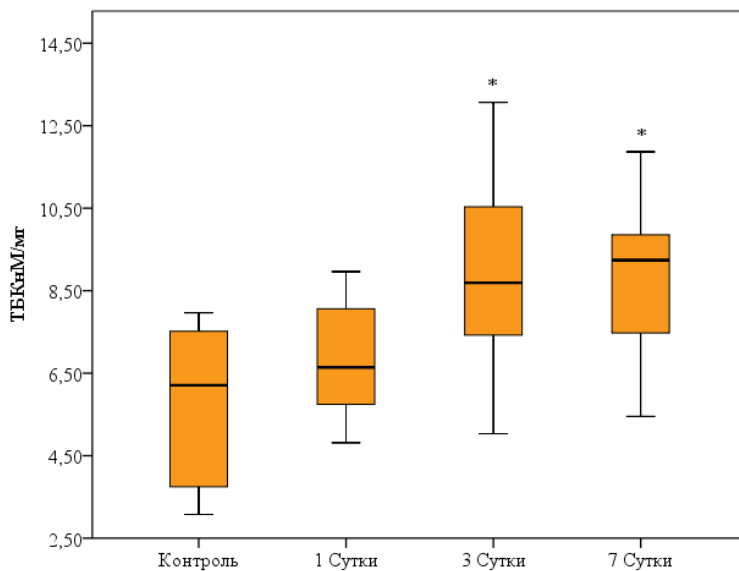


Рисунок 1 – Содержание ТБК-реактивных продуктов в ткани печени мышей контрольной группы и после облучения в дозе 3 Гр (\* $p < 0,05$  относительно контроля)

Picture 1 – The content of TBARS in the liver tissue of mice in the control group and after irradiation at a dose of 3 Gy (\* $p < 0,05$  compared to control)

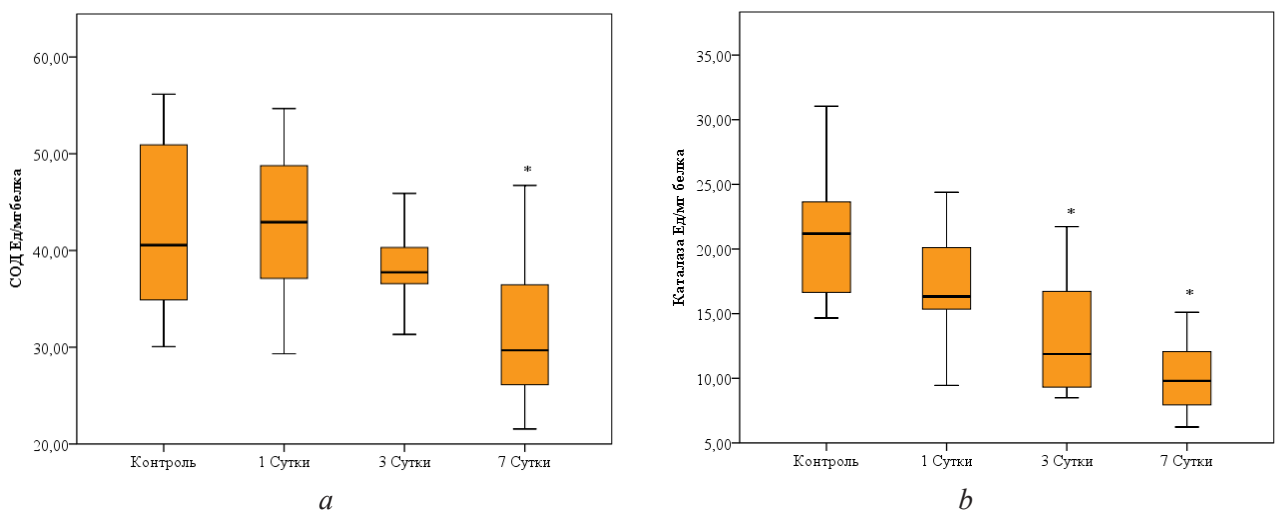


Рисунок 2 – Активность супероксиддисмутазы (a) и каталазы (b) в цитозольно-микросомальной фракции гомогенатов ткани печени мышей контрольной группы и после облучения в дозе 3Гр (\* $p < 0,05$  относительно контроля)

Picture 2 – The activity of superoxidedismutase (a) and catalase (b) in the liver tissue of mice in the control group and after irradiation at a dose of 3 Gy (\* $p < 0,05$  compared to control)

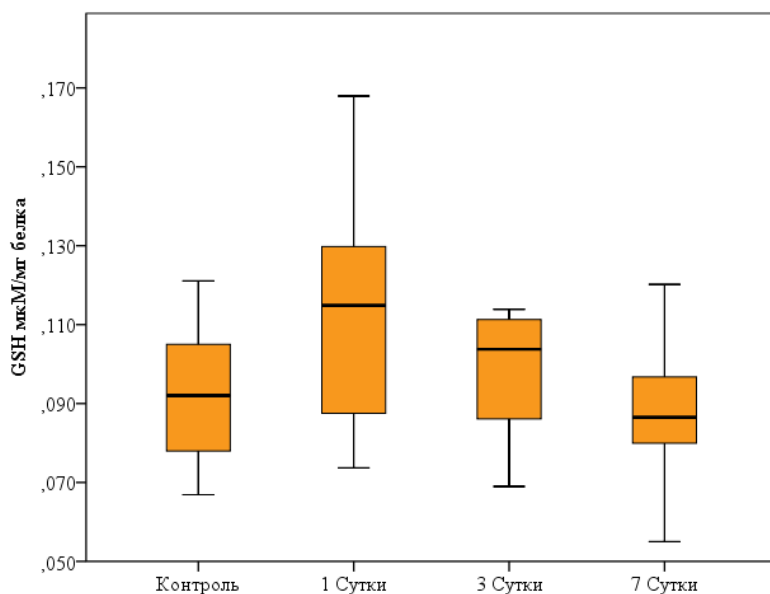


Рисунок 3 – Содержание восстановленного глутатиона (GSH) в ткани печени мышей контрольной группы и после облучения в дозе 3 Гр

Picture 3 – The content of reduced glutathione (GSH) in the liver tissue of mice in the control group and after irradiation at a dose of 3 Gy

#### Список цитированных источников

- Novel synthetic SOD/catalase mimetic can mitigate capillary endothelial cell apoptosis caused by ionizing radiation / E. Vorotnikova [et al.] // *Radiat Res.* – 2010. – Vol. 173, № 6. – P.748–759.
- Robbins, M. E. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review / M. E. Robbins, W. Zhao // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2004. – Vol. 80, № 4. – P. 251–259.
- Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: A review / V. Sanchez-Valle [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – № 19. – P. 4850–4860.
- Radiation-induced liver injury and hepatocyte senescence / W. Zhu [et al.] // *Cell Death Discov.* 2021. – Vol. 7, № 1. – P. 244–253.
- Zhao, W. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications / W. Zhao, M. E. Robbins // *Curr. Med. Chem.* 2009. – Vol. 16, № 2. – P. 130–143.
- The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases / S. Li [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16, № 11. – P. 26087–26124.
- The impact of ionizing irradiation on liver detoxifying enzymes. A re-investigation / A. Bocedi [et al.] // *Cell. Death. Discov.* – 2019. – № 5:66.
- Avti, P. K. Low dose gamma-irradiation differentially modulates antioxidant defense in liver and lungs of Balb/c mice / P. K. Avti // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2005. – Vol. 81, № 12. – P. 901–910.
- 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.* – 2010. – P. 276–233.
- 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, № 2. – P. 201–220.
- Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.]; под ред. проф. А. А. Чиркина. – Минск: Выш. школа, 2013. – 419 с.

через сутки после облучения в дозе 3 Гр (рисунок 3), в остальные сроки наблюдения данный показатель значимо не отличался от контроля.

#### Заключение

Общее однократное облучение мышей линии C57Bl/6 индуцирует развитие оксидативного стресса в печени животных, что проявляется повышением показателей ПОЛ и снижением активности ферментов первой линии АОС печени. Представленная экспериментальная модель радиационного поражения может быть использована при исследовании радиомодифицирующих препаратов и для оценки адаптационных возможностей животных разных видов и/или обитающих в условиях разной радиационной нагрузки.

#### References

- Sirota, T. V. Использование нитросинего тетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота // *Биомедицинская химия.* – 2013. – Т. 59. – № 4. – С. 399–410.
- Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model / A. Koch [et al.] // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11, № 8. – e0161079.
- Transcription and activity of antioxidant enzymes after ionizing irradiation in radiation-resistant and radiation-sensitive mice / R. Hardmeier [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94, № 14. – P. 7572–7576.
- Vorotnikova E, Rosenthal RA, Tries M, Doctrow SR, Brauhut SJ. Novel synthetic SOD/catalase mimetics can mitigate capillary endothelial cell apoptosis caused by ionizing radiation. *Radiat Res.* 2010 Jun;173(6):748-59. DOI: 10.1667/RR1948.1.
- Robbins ME, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 2004 Apr;80(4):251-9. doi: 10.1080/09553000410001692726.
- Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: A review. *Curr. Med. Chem.* 2012;19:4850–4860. DOI: 10.2174/092986712803341520.
- Zhu W, Zhang X, Yu M, Lin B, Yu C. Radiation-induced liver injury and hepatocyte senescence. *Cell. Death Discov.* 2021 Sep 16;7(1):244. doi: 10.1038/s41420-021-00634-6.
- Zhao W, Robbins ME. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* 2009;16(2):130-43. DOI: 10.2174/092986709787002790.
- Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015 Nov 2;16(11):26087-124. DOI: 10.3390/ijms161125942.
- Bocedi A, Ingrosso G, Cattani G, Miceli R, Ponti E, Lancia A, Baldelli S, Guidi A, Ciriolo MR, Mattei M, Ricci G. The

- impact of ionizing irradiation on liver detoxifying enzymes. A re-investigation. *Cell. Death. Discov.* 2019 Feb 8;5:66. DOI: 10.1038/s41420-019-0148-8.
- 8 Avti PK, Pathak CM, Kumar S, Kaushik G, Kaushik T, Farooque A, Khanduja KL, Sharma SC. Low dose gamma-irradiation differentially modulates antioxidant defense in liver and lungs of Balb/c mice. *Int. J. Radiat. Biol.* 2005 Dec;81(12):901-10. DOI: 10.1080/09553000600567996.
- 9 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*. – 2010. – P. 276–233.
- 10 Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 1979 Dec;100(2):201-20. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90222-7. PMID: 393128.
- 11 Modern problems of biochemistry. Research methods: study guide / E.V. Barkovsky [and others]; ed. prof. A.A. Chirkin. – Minsk: Higher School 2013. – 419 p.
- 12 Sirota, TV. Use of nitro blue tetrazolium in the reaction of adrenaline autooxidation for the determination of superoxide dismutase activity. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B* 6, 254–260 (2012). DOI:10.1134/S1990750812030134.
- 13 Koch A, Gulani J, King G, Hieber K, Chappell M, Ossetrova N Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model. *PLoS ONE*. 2016 11(8): e0161079. DOI:10.1371/journal.pone.0161079
- 14 Hardmeier R, Hoeger H, Fang-Kircher S, Khoschsorur A, Lubec G. Transcription and activity of antioxidant enzymes after ionizing irradiation in radiation-resistant and radiation-sensitive mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997 Jul 8;94(14):7572-6. DOI: 10.1073/pnas.94.14.7572.

## DYNAMICS OF INDICATORS OF THE LIVER ANTIOXIDANT SYSTEM IN MICE AFTER EXPOSURE TO HIGH POWER X-RAY EXPOSITION

---

*N. N. Veyalkina<sup>1,2</sup>, N. S. Pilotovich<sup>1</sup>, V. S. Aksionenka<sup>1</sup>, V. M. Schemelev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Gomel, Republic of Belarus;*

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

**Introduction.** The actuality of the study is due to the growing influence of different kind ionizing radiation on the human body. The change in indicators of the level of oxidative stress in the liver and in the whole body depends on many factors, including the dose and mode of irradiation, as well as the period after irradiation.

**Objective** – to evaluate the effect of a single total X-ray irradiation at a dose of 3 Gy on the dynamics of the indicators of antioxidant system in the liver in C57Bl/6 mice in the acute post-radiation period.

**Materials and methods.** Animals were irradiated using an X-Rad 320 biological X-ray unit, dose rate 98.8 cGy/min. Animals were taken out the experiment on the 1st, 3rd and 7th days after irradiation. The concentrations of total protein, TBARS, reduced glutathione, catalase and superoxide dismutase activity were determined in animal liver homogenates.

**Results.** The content of TBARS in the liver tissue increased on the 3rd and 7th days after irradiation ( $p < 0.05$ ). A decrease in the activity of SOD and catalase in the liver was noted, most expressive to 3d day for catalase and to 7 day for catalase and SOD ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** Whole body single irradiation of C57Bl/6 mice at a dose of 3 Gy induces the oxidative stress in the liver, which is characterized by an increase in lipid peroxidation and a decrease in the activity of enzymes of the antioxidant system in the liver.

**Keywords.** X-ray, mice, superoxidizedismutase, catalase, glutathione, TBARS.

**For citation:** Veyalkina NN, Pilotovich NS, Aksionenka VS, Schemelev VM. Dynamics of indicators of the liver antioxidant system in mice after exposure to high power X-ray exposition. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1 pp. 78– (in Russian).

*Поступила 29.08.2022*

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ НЕПРЯМОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК (SCD) В ЛАБОРАТОРНОМ СКРИНИНГЕ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

*Л. В. Батуревич, И. Д. Шилейко, А. О. Коломиец*

*Учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь*

**Введение.** Лабораторный скрининг, включающий исследование спермограммы и степени фрагментации ДНК сперматозоидов, может служить важным диагностическим критерием оценки фертильности мужчин.

**Цель исследования** – установить диагностическую значимость применения непрямого метода определения фрагментации ДНК (SCD) в лабораторном скрининге мужского бесплодия.

**Материалы и методы.** Методами световой микроскопии у 105 мужчин с бесплодием проведено исследование спермограммы и степени выраженности ДНК-фрагментации сперматозоидов.

**Результаты.** Установлена связь индекса фрагментации ДНК с подвижностью и жизнеспособностью сперматозоидов у инфертильных мужчин с олиго- и нормозооспермией.

**Заключение.** Полученные данные позволяют сделать вывод о необходимости исследования степени фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с бесплодием. Метод SCD может быть рекомендован в качестве скринингового лабораторного теста для оценки фертильности мужчины.

**Ключевые слова:** бесплодие, фрагментация ДНК, спермограмма, индекс фрагментации, индекс деградации.

**Для цитирования.** Батуревич, Л. В. Диагностическая значимость непрямого метода определения фрагментации ДНК (SCD) в лабораторном скрининге мужского бесплодия / Л. В. Батуревич, И. Д. Шилейко, А. О. Коломиец // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1. – С. 83–88.

### Введение

В современном мире одной из важных медицинских и социальных проблем является нарушение репродуктивной функции у мужчин. Нарушение фертильности связано с изменением образа жизни современного мужчины: негативным влиянием вредных привычек и факторов окружающей среды, вступлением в брак в более позднем возрасте, бесконтрольным применением лекарственных средств и т. д. Все перечисленное может приводить к развитию такой серьезной проблемы, как бесплодие.

Алгоритм клинко-диагностических мероприятий, основанный на применении современных лабораторных методов, позволяет не только выявлять мужское бесплодие, но и нередко устанавливать его причину. Комплексное и поэтапное обследование пациентов с нарушением репродуктивной функции дает возможность дифференцированно оценивать причины и факторы, способствующие развитию инфертильности, а также назначать своевременное лечение и оценивать его эффективность в динамике.

Среди лабораторных методов диагностики мужского бесплодия особое место занимают микроскопические, биохимические, гормональные и иммунологические исследования эякулята и крови.

В настоящее время наиболее доступным и широко используемым методом скрининга инфертильности эякулята при мужском бесплодии является исследование спермограммы, заключающееся в изучении физико-химических и микроскопических свойств спермы [0]. Это своего рода «стартовый» лабораторный метод оценки фертильности мужчины.

Наиболее значимыми среди показателей физических и физико-химических свойств спермы являются ее объем, pH, цвет, мутность и вязкость. При микроскопии особое внимание уделяется определению количества сперматозоидов, оценки их морфологической структуры, подвижности и жизнеспособности. Важным критерием, характеризующим полноценность, мужских гамет, является количество подвижных сперматозоидов.

Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов следует сопоставлять с показателями кинезисграммы – исследования их подвижности. Обычно количество нежизнеспособных сперматозоидов соответствует количеству неподвижных, что является косвенным контролем точности подсчета подвижности. В случае существенного превышения количества нежизнеспособных сперматозоидов над количеством неподвижных, можно

предполагать наличие синдрома Картагенера (первичной цилиарной дискинезии, синдрома «неподвижных ресничек») – генетически детерминированной патологии, приводящей к хроническому воспалительному поражению респираторного тракта, органов слуха и нарушению фертильной функции [0].

Морфологические особенности сперматозоидов в эякуляте практикуется оценивать в нативном препарате, но результативность лабораторного исследования оказывается гораздо более надежной при изучении мазков, окрашенных по Романовскому, Паппенгейму, Шопру, Diff-Quick или другими специальными красителями.

Однако спермиологическое исследование не всегда позволяет установить причину infertility, поэтому нередко требуется дальнейшее лабораторное исследование, включающее использование биохимических, иммунологических (MAR-тест и др.) и других специальных методов исследования эякулята.

Следует отметить также, что результаты исследования спермограммы не всегда могут дать полную оценку фертильного статуса мужчины. Это связано с тем, что на оплодотворяющую способность сперматозоидов могут влиять такие факторы, как наличие анеуплоидий, состояние хроматина, строение жгутика, вирусное и бактериальное инфицирование, а также фрагментация ДНК, которая представляет собой разрыв одной или двух нитей молекулы ДНК [1, 3].

Целостность цепочки ДНК сперматозоидов после оплодотворения является одним из основополагающих факторов нормального развития беременности. Высокий уровень фрагментации ДНК может приводить не только к снижению вероятности самостоятельного зачатия в паре, но и к нарушениям эмбрионального развития, а также к повышению вероятности невынашивания беременности. Не исключается возможность возникновения проблем при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) [1, 4–8].

В научной литературе имеются данные о возможной связи между отдельными показателями спермограммы (количеством, подвижностью, морфологией сперматозоидов) и выраженностью фрагментации их ядерной ДНК. Отмечается, что изменения ряда параметров спермограммы могут коррелировать со степенью фрагментации ДНК в мужских гаметах. Например, при тяжелой степени олигозооспермии или при большом количестве морфологически аномальных сперматозоидов высока вероятность того, что уровень

фрагментации ДНК в сперматозоидах будет повышен [3, 8].

Фрагментация ДНК, отражая нарушение целостности генома сперматозоида, может служить важным диагностическим и прогностическим критерием оценки фертильности мужчин. Точный анализ качества ДНК сперматозоидов, степень и динамика ее деградации дает важную информацию, дополняющую спермиологическое исследование.

В настоящее время разработаны современные высокотехнологичные методы оценки степени фрагментации ДНК, такие как Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL), основанный на прямой маркировке разрывов ДНК флюорохромом и измерении интенсивности люминесценции; Cleaver Scientific Comet Assay (SCGE) – метод гель-электрофореза отдельных клеток или метод ДНК-комет (COMET); Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) – анализ структуры хроматина сперматозоида [0]. Однако необходимо отметить, что все перечисленные методы требуют дорогостоящего оборудования и специальной подготовки персонала, что существенно ограничивает их широкое применение.

Более простым и доступным лабораторным тестом является непрямой метод определения фрагментации ДНК – Sperm chromatin dispersion test (SCD), основанный на регистрации дисперсии хроматина сперматозоидов методом световой микроскопии.

После специальной обработки красителем оценивается характерный ареол (гало), который наблюдается у сперматозоидов с нефрагментированной ДНК (сперматозоиды с фрагментированной ДНК гало не создают) (рисунок 1).

Преимуществом метода SCD является простота выполнения, что дает возможность использовать данный тест в любой клинико-диагностической лаборатории.

Цель исследования – установить диагностическую значимость применения непрямого метода определения фрагментации ДНК (SCD) в лабораторном скрининге мужского бесплодия.

### Материалы и методы

Исследован эякулят 105 мужчин, страдающих бесплодием, в возрасте от 23 до 55 лет. По результатам спермограммы обследуемые были разделены на 2 группы: первую группу составили 60 мужчин с нормозооспермией, вторую – 45 мужчин с олигозооспермией.

Исследование спермограммы проводилось методом световой микроскопии и включало опреде-

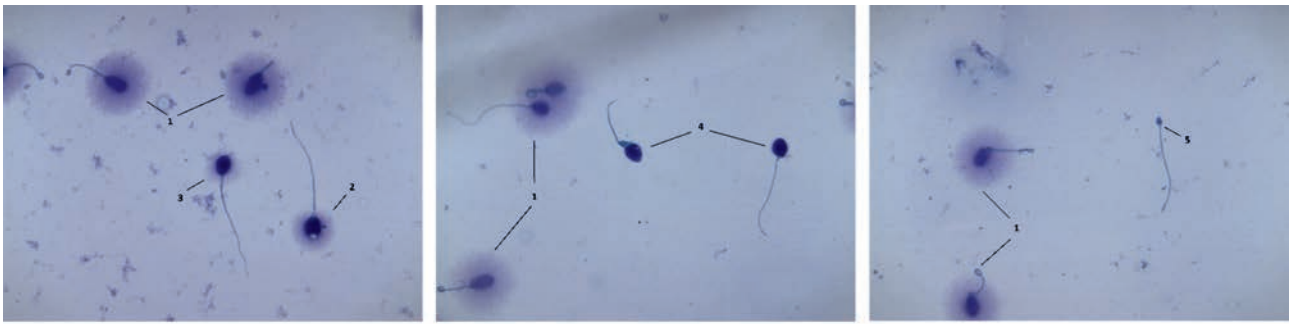


Рисунок 1 – Оценка результата Sperm chromatin dispersion test методом световой микроскопии (×400):  
 1 – сперматозоид с большим гало, 2 – сперматозоид со средним гало, 3 – сперматозоид с малым гало,  
 4 – сперматозоид без гало, 5 – деградированный сперматозоид

Figure 1 – Evaluation of the result of Sperm chromatin dispersion test by light microscopy (×400):  
 1 – spermatozoon with a large halo, 2 – spermatozoon with medium halo, 3 – spermatozoon with small halo,  
 4 – spermatozoon without halo, 5 – degraded spermatozoon

ление количества сперматозоидов, их подвижность, жизнеспособность и оценку морфологических особенностей. Количество и подвижность сперматозоидов оценивались в нативном препарате, жизнеспособность – по результатам исследования мазка, окрашенного по Блюму, морфология – мазка, окрашенного с использованием набора «Spermac Stain» (Испания).

Оценка степени фрагментации ДНК сперматозоидов производилась методом SCD в мазке, окрашенном с применением набора реагентов «Halosperm G2» (Испания), с последующей оценкой результатов методом световой микроскопии.

В ходе исследования производились расчеты индекса фрагментации и индекса деградации. Для этого после обработки эякулята набором «Halosperm G2» подсчитывалось не менее 300 сперматозоидов с разделением их на 3 группы по особенностям дисперсии ДНК (см. рисунок 1):

- 1) сперматозоиды без фрагментации ДНК: половые клетки с большим ареолом (ширина гало  $\geq$  диаметра ядра половой клетки) и половые клетки с гало среднего размера;
- 2) сперматозоиды с фрагментированной ДНК: сперматозоиды с малым гало (ширина гало  $\leq 1/3$  диаметра ядра) и сперматозоиды без гало;
- 3) Деградированные сперматозоиды.

Индекс фрагментации сперматозоидов SDFI (Sperm DNA Fragmentation Index) рассчитывался по формуле:

$$SDFI = \frac{FS + DS}{S} \times 100\%,$$

где FS – количество фрагментированных сперматозоидов; DS – количество деградированных сперматозоидов; S – общее число подсчитанных сперматозоидов.

Интерпретация результатов подсчета SDFI проводилась с учетом референтных значений индекса фрагментации ДНК сперматозоидов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) [0]:

- низкий SDFI < 15 %;
- средний SDFI 15–30 %;
- высокий SDFI > 30 %.

Индекс деградации сперматозоидов DDSI (Degraded DNA Sperm Index) рассчитывался по формуле:

$$DDSI = \frac{DS}{FS} \times 100\%.$$

Значение DDSI  $\geq 30$  % расценивалось как отклонение от нормы, указывающее на возможное наличие у пациента скрытого течения варикоцеле.

Статистическая обработка полученных данных и установление корреляционных зависимостей производились с помощью программы Statistica (StatSoft Statistica v.6.0).

### Результаты и их обсуждение

Сравнение показателей индексов фрагментации и деградации в исследуемых группах, а также расчет корреляционных связей SDFI и DDSI с показателями спермограммы позволили установить следующее.

У мужчин с олигозооспермией среднее значение индекса ДНК-фрагментации ( $\bar{X}$ : 28,0  $\pm$  53,5) оказалось на 8,3 % выше в сравнении с группой мужчин с нормозооспермией ( $\bar{X}$ : 14,6  $\pm$  29,7), а индекса деградации – на 1,7 % (у мужчин с олигозооспермией –  $\bar{X}$ : 17,39  $\pm$  25,81, с нормозооспермией –  $\bar{X}$ : 10,11  $\pm$  25,4), что позволяет судить о высокой степени вероятности нарушений в строении ДНК у пациентов с концентрацией сперматозоидов в эякуляте ниже нормы (рисунок 2).

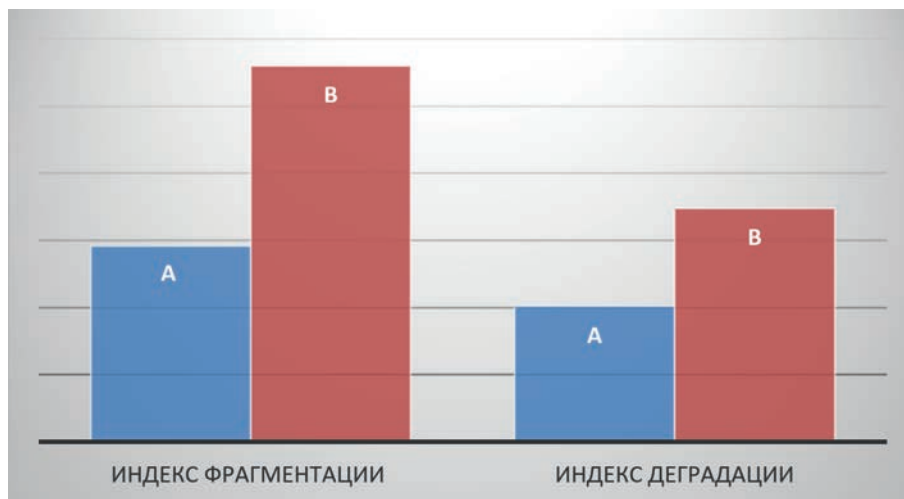


Рисунок 2 – Сравнительная оценка показателей фрагментации и деградации сперматозоидов у пациентов с нормозооспермией (А) и олигозооспермией (В)

Figure 2 – Comparative assessment of fragmentation and degradation of spermatozoa in patients with normozoospermia (A) and oligozoospermia (B)

Проведенный корреляционный анализ показал наличие средней отрицательной связи индекса фрагментации с показателями подвижности и жизнеспособности сперматозоидов в семенной жидкости у пациентов с олигозооспермией ( $r = -0,641$  и  $r = -0,516$  соответственно), а также с показателем подвижности сперматозоидов у пациентов с нормозооспермией ( $r = -0,504$ ). Другие показатели спермограммы с индексом фрагментации ДНК коррелируют слабо.

Тесных корреляционных связей между индексом деградации и показателями спермограммы (подвижность, морфология и жизнеспособность) в обеих группах не было выявлено.

При изучении морфологических свойств сперматозоидов установлено, что наличие в эякуляте половых клеток с аномальной морфологией не коррелирует с нарушением целостности цепочки ДНК ни в одной из исследуемых групп, следова-

тельно, предполагать наличие в эякуляте сперматозоидов с фрагментированной ДНК, основываясь только на особенностях их морфологии, не представляется возможным.

Таким образом, констатация в группе пациентов с олигозооспермией снижения показателей подвижности и жизнеспособности сперматозоидов позволяет предполагать наличие в эякуляте половых клеток с фрагментированной ДНК.

В группе пациентов с нормозооспермией при сравнении результатов спермограммы с результатами исследования эякулята методом SCD установлены корреляционные связи различной степени выраженности между размером гало и показателями жизнеспособности и прогрессивной подвижности сперматозоидов (таблица 1).

Исходя из данных таблицы 1, следует полагать, что чем выше подвижность и жизнеспособность сперматозоидов в эякуляте, тем чаще встречаются

Таблица 1 – Значения коэффициентов корреляции между показателями ДНК-фрагментации и спермограммы (жизнеспособности и прогрессивной подвижности) у пациентов с нормозооспермией

Table 1 – Correlation analysis of DNA fragmentation parameters and spermogram parameters (viability and motility) in patients with normozoospermia

Показатель ДНК-фрагментации	Показатели спермограммы	
	Жизнеспособность	Прогрессивная подвижность
	Значение r	
Сперматозоиды с большим гало	0,466*	0,532*
Сперматозоиды со средним гало	0,236*	0,283*
Сперматозоиды с малым гало	-0,361*	-0,421*
Сперматозоиды без гало	-0,312*	-0,312*
Деградированные сперматозоиды	-0,257*	-0,233*

Примечание: r – коэффициент корреляции; \* $p < 0,05$ .

Note: r – correlation coefficient; \* $p < 0,05$ .



при анализе ДНК-фрагментации сперматозоиды с большим и средним гало, а чем ниже подвижность и жизнеспособность сперматозоидов, тем чаще встречаются сперматозоиды с малым гало, без гало или деградированные.

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о наличии взаимосвязи между отдельными показателями спермограммы (подвижности и жизнеспособности сперматозоидов) и показателями фрагментации ДНК. Тем не менее делать заключение о наличии нарушений цепочки ДНК в сперматозоидах, основываясь только на результатах спермограммы, нельзя.

Исследование степени фрагментации ДНК сперматозоидов имеет особую диагностическую значимость при оценке фертильного статуса мужчин с олигозооспермией. В то же время наличие тесных корреляционных связей отдельных показателей спермограммы с показателями ДНК-фраг-

ментации у мужчин с нормозооспермией позволяет судить о целесообразности лабораторного исследования методом SCD пациентов с бесплодием и при нормальном количестве сперматозоидов в эякуляте.

Таким образом, тест оценки фрагментации ДНК должен рассматриваться как самостоятельное исследование – не только при олигозооспермии, но и в других случаях бесплодия мужчин: даже при нормальной спермограмме.

Полученные результаты служат достаточным основанием для рекомендации применения метода оценки дисперсии хроматина сперматозоидов (SCD) в качестве дополняющего спермограмму скринингового теста при нарушении фертильности мужчин, а также для оптимизации тактики диагностических исследований (в том числе молекулярно-генетических), направленных на установление причин инфертильности и оценку возможностей применения вспомогательных репродуктивных технологий.

### Список цитированных источников

1. Винник, Ю. Ю. Диагностика мужского бесплодия: современное состояние проблемы. Клиническая лекция / Ю. Ю. Винник, В. В. Борисов // *Consilium Medicum*. – 2017. – Т. 19, № 7. – С. 65–69.
2. Новак, А. А. Первичная цилиарная дискинезия: состояние проблемы и перспективы / А. А. Новак, Ю. Л. Мизерницкий // *Медицинский Совет*. – 2021. – № 1. – С. 276–285.
3. Фрагментация ДНК сперматозоидов у мужчин разного возраста / С. Ш. Хаят [и др.] // *Андрология и генитальная хирургия*. – 2019. – Т. 20, № 4. – С. 39–44.
4. Структурные нарушения хроматина сперматозоидов. Патологические аспекты. Клиническая значимость / М. Н. Коршунов [и др.] // *Вестник урологии*. – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 95–104.
5. Santi, D. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses / D. Santi, G. Spaggiari, M. Simoni // *Reprod Biomed Online*. – 2018. – Vol. 37, № 3. – P. 315–326.
6. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome / L. Simon [et al.] // *Asian J Androl*. – 2017. – Vol. 19, № 1. – P. 80–90.
7. Роль мужчины в привычном невынашивании беременности у супруги / С.И. Гамидов [и др.] // *Урология*. – 2016. – Т. 1. – С. 35–43.
8. Фрагментация ДНК в сперматозоидах и ее взаимосвязь с нарушением сперматогенеза / С. А. Руднева [и др.] // *Андрология и генитальная хирургия*. – 2014. – Т. 15, № 4. – С. 26–33.
9. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека : пятое издание / Всемирная орг. здравоохранения. – М. : КАПИТАЛ ПРИНТ, 2012. – 291 с.
10. Novak AA, Mizernickiy YuL. Pervichnaya ciliarnaya diskinezija: sostoyanie problemy i perspektivy [Primary ciliary dyskinesia: state of the problem and prospects]. *Meditsinskiy Sovet*. 2021;(1):276-285. DOI: 10.21518/2079-701X-2021-1-276-285
11. Khayat SS, Bragina EE, Arifulin EA, Lazareva EM, Sorokina TM, Kurilo LF, Chernykh VB. Fragmentaciya DNK spermatozoidov u muzhchin raznogo vozrasta [Sperm DNA fragmentation in men of different age]. *Andrologiya i genital'naya hirurgiya [Andrology and Genital Surgery]*. 2019;20(4):39-44. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-4-39-44.
12. Korshunov MN, Korshunova ES, Kyzlasov PS, Korshunov DM, Darenkov SP. Strukturnye narusheniya hromatina spermatozoidov. Patofiziologicheskie aspekty. Klinicheskaya znachimost' [Structural disorders of the sperm chromatin. Pathophysiological aspects. Clinical relevance]. *Vestnik urologii [Urology Herald]*. 2021;9(1):95-104. DOI: 10.21886/2308-6424-2021-9-1-95-104
13. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reprod. Biomed. Online*. 2018;37(3):315-326. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.06.023.
14. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian. J. Androl*. 2017;19(1):80-90. DOI: 10.4103/1008-682X.182822.
15. Gamidov SI, Ovchinnikov RI, Popova AY, Golubeva ON, Ushakova IV. Rol' muzhchiny v privychnom nevnashivanii beremennosti u suprugy. *Urologiya*. 2016;1:35-43.
16. Rudneva SA, Bragina EE, Arifulin EA, Sorokina TM, Shileyko LV, Ermolaeva SA, Kurilo LF, Chernykh VB. Fragmentaciya DNK v spermatozoidah i ee vzaimosvyaz' s narusheniem spermatogeneza [DNA fragmentation in spermatozoa and its relationship with impaired spermatogenesis]. *Andrologiya i genital'naya hirurgiya [Andrology and Genital Surgery]*. 2014;15(4):26-33. DOI: 10.17650/2070-9781-2014-4-26-33.
17. Rukovodstvo VOZ po issledovaniyu i obrabotke eyakulyata cheloveka : pyatoe izdanie [WHO laboratory manual for examination and processing of human semen]. Moscow: KAPITAL PRINT; 2012. – 291 p.

### References

1. Vinnik YuYu, Borisov VV. Diagnostika muzhskogo besplodiya: sovremennoe sostoyanie problemy. Klinicheskaya lekciya [Diagnostics of men's infertility: current state of the problem. Clinical lecture]. *Consilium Medicum*. 2017;19(7):65-69. DOI: 10.26442/2075-1753\_19.7.65-69

# DIAGNOSTIC VALUE OF THE INDIRECT METHOD FOR DETERMINING DNA FRAGMENTATION (SCD) IN LABORATORY SCREENING OF MALE INFERTILITY

---

*L. V. Baturevich, I. D. Shileiko, A. O. Kolomiets*

*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus*

**Introduction.** Laboratory screening, including the study of spermogram and the degree of DNA fragmentation of spermatozoa, can serve as an important diagnostic criterion for assessing male fertility.

**Objective** – to establish the diagnostic significance of using the indirect method for determining DNA fragmentation (SCD) in laboratory screening of male infertility.

**Materials and methods.** Using light microscopy methods, 105 men with infertility studied the semen analysis and the severity of DNA fragmentation of spermatozoa.

**Results.** The relationship between the DNA fragmentation index and the mobility and viability of spermatozoa in infertile men with oligo- and normozoospermia has been established.

**Conclusions.** The data obtained allow us to conclude that it is necessary to study the degree of DNA fragmentation of spermatozoa in men with infertility. The SCD method can be recommended as a screening laboratory test to assess male fertility.

**Keywords:** infertility, DNA fragmentation, spermogram, fragmentation index, degradation index.

**For citation:** Baturevich LV, Shileiko ID, Kolomiets AO. Diagnostic value of the indirect method for determining DNA fragmentation (SCD) in laboratory screening of male infertility. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 83–88 (in Russian).

*Поступила 15.09.2022*

## К ВОПРОСУ О РОЛИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ СОСУДОВ НЕРАБОЧЕЙ РУКИ В МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ ДОЛЖНОГО УРОВНЯ ГЛИКЕМИИ ПРИ ГОЛОДЕ И НАСЫЩЕНИИ

В. А. Переверзев<sup>1</sup>, А. В. Сикорский<sup>1</sup>, А. С. Блажко<sup>1</sup>, А. В. Евсеев<sup>2</sup>, В. А. Правдивцев<sup>2</sup>,  
М. О. Вэлком<sup>3</sup>, Ю. Е. Разводовский<sup>4</sup>, Д. А. Александров<sup>1</sup>, Е. В. Переверзева<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Учреждение образования «Смоленский государственный медицинский университет»,  
г. Смоленск, Российская Федерация;

<sup>3</sup> Нил Университет Нигерии, г. Абуджа, Нигерия;

<sup>4</sup> Государственное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

**Введение.** В настоящее время недостаточно освещен вопрос об участии эндотелиоцитов, особенно в сосудах рук или ног, в метаболизме глюкозы.

**Цель исследования** – изучение содержания глюкозы в цельной капиллярной ( $\Gamma_{\text{КАП}}$ ) и цельной венозной ( $\Gamma_{\text{ВЕН}}$ ) крови (включая капиллярно-венозную разницу  $\Gamma_{\text{КАП}} - \Gamma_{\text{ВЕН}}$ ), полученной из одной и той же руки у женщин для оценки состояния у них местных механизмов поддержания должного уровня гликемии при различных физиологических состояниях.

**Материалы и методы.** У 24 женщин определяли  $\Gamma_{\text{КАП}}$  и  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  при голоде (относительном функциональном покое /ОФП/ и умственной работе /УР/ натошак) и насыщении (после приема 75 г глюкозы при ОФП).  $\Gamma_{\text{КАП}}$  и  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  измеряли 11 раз: исходно (в условиях ОФП и голодания); 6 раз при УР натошак (через 1, 2, 3, 4, 5, 6 ч); 4 раза (30, 60, 90 и 120 мин) после приема глюкозы. Данные расчета  $\Gamma_{\text{КАП}} - \Gamma_{\text{ВЕН}}$  позволяли оценить состояние местных механизмов поддержания гликемии.

**Результаты.** Показано понижение  $\Gamma_{\text{КАП}}$  и  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  у большинства женщин при УР. Анализ 264 случаев сопоставления  $\Gamma_{\text{КАП}}$  и  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  показал, что вариант « $\Gamma_{\text{КАП}} < \Gamma_{\text{ВЕН}}$ » преобладал над другими. Это свидетельствует о том, что в 61,7 % ( $p < 0,05$ ) случаев в венозной крови, оттекающей от нерабочей руки, содержание глюкозы возрастает по сравнению с притекающей к ней кровью.

**Заключение.** Выявлено снижение гликемии у женщин при УР натошак. Установлен важный механизм поддержания должного уровня гликемии, заключающийся в участии в нем клеток (эндотелиоцитов и других) нерабочей руки как нового источника поступления глюкозы в кровь при голодании.

**Ключевые слова:** глюкоза, гликемия, регуляция, голод, насыщение.

**Для цитирования.** К вопросу о роли эндотелиоцитов сосудов нерабочей руки в механизмах регуляции должного уровня гликемии при голоде и насыщении / В. А. Переверзев [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 89–96.

### Введение

Уровень гликемии является одним из важнейших показателей обмена углеводов в организме и его энергетического гомеостаза [1, 2]. Глюкоза необходима прежде всего для питания и работы клеток нервной системы (нейронов, глиоцитов), почек (нефроцитов) и крови (эритроцитов). Они потребляют соответственно не менее 50 %, 10 % и 10 % ее суточного поступления и не менее 100, 30 и 30 г, в условиях голодания. Клетки других органов и тканей (мышечной, жировой и т. д.) потребляют оставшиеся 30 % от суточного поступления глюкозы. В качестве источников поступления глюкозы в кровь рассматриваются пищеварительная система после приема пищи за счет извлечения

данного моносахарида из химуса; печень и почки при голодании; почки как орган реабсорбции глюкозы из первичной мочи. Гепатоциты являются депо глюкозы, запасаемой в виде гликогена и мобилизуемой из нее при голодании за счет гликогенолиза. В печени также активно протекает процесс глюконеогенеза, в результате чего глюкоза, образующаяся из гликогенных аминокислот или других органических веществ, может поступать в кровь. Почки являются вторым по важности органом поступления эндогенной глюкозы в кровь за счет ее возврата (реабсорбции) из первичной мочи и ее синтеза при глюконеогенезе. Вклад эпителиоцитов кишечника в поддержание должного уровня гликемии при голодании минимален или отсутствует.

Это говорит о хорошей изученности обмена глюкозы в клетках указанных органов (печени, кишечника, почек) или систем (нервной, крови) при все еще недостаточной освещенности вопроса об участии эндотелиоцитов в этом обмене, особенно в сосудах иной локализации, например, рук или ног.

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение содержания глюкозы в цельной крови ( $\Gamma_{\text{КАП}}$ ,  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  и  $\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$ ) у женщин для оценки состояния у них местных механизмов поддержания должного уровня гликемии при различных физиологических состояниях.

### Материалы и методы

Исследование выполнено с участием 24 женщин 18–29 лет. Все они дали информированное письменное согласие на свое добровольное участие в исследовании. Оно заключалось в изучении у них  $\Gamma_{\text{КАП}}$  и  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  при различных физиологических состояниях: голода (при ОФП и УР натощак) и насыщения (после перорального приема 75 г глюкозы в условиях ОФП). В каждом исследовании участвовало от 1 до 3 испытуемых, а также врач (А. С. Блажко) и медицинская сестра. Перед началом исследования всем женщинам ставился катетер в срединную локтевую вену нерабочей руки. Исследование проводилось натощак после 10–12 ч ночного голодания.

Исследование начиналось в 8:00–9:00 и заканчивалось в 16:00–17:00 соответственно. Ход исследования: первый этап – забор у испытуемых в состоянии ОФП цельной капиллярной крови (из безымянного пальца нерабочей руки в стерильных условиях после прокола кожи одноразовым стерильным ланцетом с использованием прибора «СД500», входящего в систему контроля уровня гликемии «Rightest GM100») и определение в ней  $\Gamma_{\text{КАП}}$ , затем первый забор цельной венозной крови и определения  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$ . Второй этап – длительная УР натощак, при этом у испытуемых ежечасно (через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 ч) определяли  $\Gamma_{\text{КАП}}$  и  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$ . Третий этап – начинался с приема 75 г глюкозы, растворенной в 200–250 мл воды, сразу после 7-го определения  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  (точка отсчета /нулевая/ времени при проведении перорального теста на толерантность к глюкозе /ПТТГ/ в условиях ОФП). Затем через 30, 60, 90 и 120 мин определяли  $\Gamma_{\text{КАП}}$  и  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$ . Измерение уровня гликемии проводилось глюкозооксидазным методом с амперометрической детекцией при помощи системы контроля уровня глюкозы в 1–3 мкл крови «Rightest GM100» (Bionime, Швейцария) с точностью до 0,1 мМ. Кроме определения абсолютных показателей  $\Gamma_{\text{КАП}}$  и  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  дополнительно рассчитывали разницу

$\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$  для суждения о состоянии местной регуляции гликемии. Положительные значения  $\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$  рассматривались как свидетельство использования (потребления из крови) глюкозы клетками тканей нерабочей руки (ее поступление сначала в эндотелиоциты сосудов, а затем – и другие клетки). Отрицательные значения  $\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$  указывали на поступление глюкозы из клеток (эндотелиоцитов) сосудов нерабочей руки в кровь.

УР у всех испытуемых была однотипной. Она заключалась в выполнении тестов на внимание, мышление и память и заполнении анкет, отражающих психоэмоциональное состояние респондентов, ежечасно (6 раз по 25 мин) сразу после забора крови из вены. Вторые 30 мин (также 6 раз) каждая испытуемая изучала медицинские научные тексты и отвечала на вопросы по их содержанию.

Результаты исследования (после их занесения в электронные таблицы Microsoft Office Excel 2016) были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа [3] с использованием программы «STATISTICA 10». Сравнение абсолютных значений номинальных данных проводилось с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона и точного критерия Фишера (при общем числе наблюдений 5 и более в каждой выборке) при помощи электронного калькулятора в программе «Медстатистика.ру». Оценка различий между двумя долями (20–80 %) проводилась с помощью  $t$ -критерия, который сравнивался с его критическими значениями для выбранного числа наблюдений, или же путем сравнения  $S_{\text{КВ}}$  (долей менее 20 %) распределения признака и их ошибок в двух независимых выборках или к нулевой гипотезе на основании алгебраического выражения неравенства коэффициентов вариации [3, с. 349]. Полученные результаты принимались как значимые при  $p \leq 0,05$  или выполнении неравенства [3, с. 349].

### Результаты и их обсуждение

Во время УР содержание глюкозы в крови большинства респондентов понижалось и составило в среднем по всей группе 0,05 мМ ( $p > 0,05$ ) – 0,37 мМ ( $p < 0,05$ ) для  $\Gamma_{\text{КАП}}$  (таблица 1) и на 0,14 мМ ( $p > 0,05$ ) – 0,30 мМ ( $p < 0,05$ ) для  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  (таблица 1). Это подтверждает известные факты [1, 2, 5, 10] о роли глюкозы как энергетического субстрата для работы мозга, потребность в котором нарастает (на 40–100 %) при УР, а возможности ее восполнения ограничены. Это и приводит к достоверному снижению уровня гликемии при УР натощак.

Таблица 1 – Капиллярно-венозная разница содержания глюкозы цельной крови ( $\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$ ) нерабочей руки у женщин при разных функциональных состояниях и рассчитанный вклад в поддержание должного уровня гликемии (РВвПДУГ)

Table 1 – Capillary-venous difference in the whole blood glucose content of the non-working arm in women with different functional states and the calculated contribution (CC) to maintaining the proper level of glycemia (CCtoMPLG)

Функциональное состояние	Содержание глюкозы в цельной крови (мм)				РВвПДУГ	
	$\Gamma_{\text{КАП}}$ М	$\Gamma_{\text{ВЕН}}$ М	$\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$ М $\pm$ м	Вклад в $\uparrow\downarrow$ ( $\Delta$ от КАП)	в абсолютных значениях	в процентах
1. ОФП натощак (10–12 ч голодания)	4,72	5,10	-0,38 $\pm$ 0,17*	$\uparrow$ 8,05 %*	31 мг/мин*	20,1 % *
2.1. через 1 ч УР (11–13 ч голодания)	4,61	4,96	-0,35 $\pm$ 0,11*	$\uparrow$ 7,59 %*	28 мг/мин*	12,1 % *
2.2. через 2 ч УР (12–14 ч голодания)	4,55	4,81	-0,26 $\pm$ 0,12*	$\uparrow$ 5,71 %*	21 мг/мин*	9,1 % *
2.3. через 3 ч УР (13–15 ч голодания)	4,67	4,91	-0,24 $\pm$ 0,11*	$\uparrow$ 5,14 %*	19 мг/мин*	8,2 % *
2.4. через 4 ч УР (14–16 ч голодания)	4,48	4,80	-0,32 $\pm$ 0,14*	$\uparrow$ 7,14 %*	26 мг/мин*	11,3 % *
2.5. через 5 ч УР (15–17 ч голодания)	4,35	4,82	-0,47 $\pm$ 0,15*	$\uparrow$ 10,8 %*	38 мг/мин*	16,5 % *
2.6. через 6 ч УР (16–18 ч голодания)	4,51	4,80	-0,29 $\pm$ 0,09*	$\uparrow$ 6,45 %*	24 мг/мин*	10,4 % *
3.1. ОФП, 30 мин после приема глюкозы	7,89	7,86	+0,03 $\pm$ 0,28	$\downarrow$ 0,38 %	2,4 мг/мин	1,6 %
3.2. ОФП, 60 мин после приема глюкозы	8,57	8,83	-0,26 $\pm$ 0,17	$\uparrow$ 3,03 %	21 мг/мин	13,6 %
3.3. ОФП, 90 мин после приема глюкозы	7,54	7,60	-0,06 $\pm$ 0,16	$\uparrow$ 0,80 %	4,9 мг/мин	3,2 %
3.4. ОФП, 120 мин после приема глюкозы	6,64	7,13	-0,49 $\pm$ 0,20*	$\uparrow$ 7,38 %*	40 мг/мин*	26,0 % *

*Примечание:* \* — различия достоверны / $p < 0,05$ / между связанными показателями внутри каждой подгруппы (от 1. до 3.4.); ОФП — относительный функциональный покой; УР — умственная работа; формула для расчета РВ:  $\text{РВ} = (\text{КАП} - \text{ВЕН}(\text{ммоль/л})) \cdot \text{молекулярная масса глюкозы} \cdot \text{О}$  ( $\text{РВ}_{\text{ОФП}} = 0,38 \frac{\text{ммоль/л}}{\text{ммоль/л}} \cdot 180 \frac{\text{мг/ммоль}}{\text{мг/ммоль}} \cdot 0,45 \frac{\text{л/мин}}{\text{л/мин}} = 31 \frac{\text{мг/мин}}{\text{мг/мин}}$ ; РВвПДУГ (% от потребления) в состоянии ОФП рассчитывался согласно рекомендациям [4, 9, 10] от средних значений в 154 мг/мин потребления глюкозы, а при умственной работе — 231 мг/мин.

*Note:* \* — differences are significant / $p < 0.05$ / between related indicators within each subgroup (from 1. to 3.4.). ОФП — relative functional rest. УР — mental work. Fas (Gol-I) — fasting. Formula for calculating PB:  $\text{PB} = (\text{КАП} - \text{ВЕН}(\text{mmol/l})) \cdot \text{Molecular weight of glucose} \cdot \text{O}$  ( $\text{PB}_{\text{OФП}} = 0.38 \frac{\text{mmol/L}}{\text{mmol/L}} \cdot 180 \frac{\text{mg/mmol}}{\text{mg/mmol}} \cdot 0.45 \frac{\text{L/min}}{\text{L/min}} = 31 \frac{\text{mg/min}}{\text{mg/min}}$ ; РВвПДУГ (% of consumption) in the state of ОФП was calculated according to the recommendations [4, 9, 10] from the average values of 154 mg/min of glucose consumption, and with mental work — 231 mg/min.

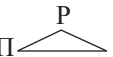
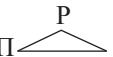
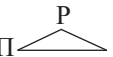
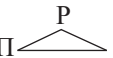
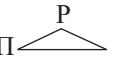

Сравнительный индивидуальный анализ разницы  $\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$  позволил рассчитать вклад клеток нерабочей руки в поддержание уровня глюкозы в венозной крови по сравнению с капиллярной и в ее потребление организмом при разных состояниях. Если допустить, что верхние конечности получают 9 % минутного объема кровотока [9], или 450 мл цельной крови ( $5000 \text{ мл/мин} \cdot 0,09 = 450 \text{ мл/мин}$ ), то выход глюкозы в кровь у женщин в среднем по всей группе в состоянии ОФП составил 31 мг/мин, а ее вклад в повышение  $\Gamma_{\text{ВЕН}}$  по сравнению с  $\Gamma_{\text{КАП}}$  был равен 8,1 % (см. таблицу 1). Известно [4, 10], что в условиях ОФП натощак (через 10–16 ч после приема пищи) скорость синтеза эндогенной глюкозы и ее использования тканями примерно одинакова и составляет в среднем около 2,2( $\pm$ 0,4) мг/кг в минуту ( $154(\pm 28) \text{ мг/мин}$  для человека массой 70 кг). Учитывая приведенные выше факты о поступлении эндогенной глюкозы в кровь из клеток нерабочей руки (31 мг/мин) и данные научных источников [4, 10], можно утверждать, что их вклад в поддержание уровня гликемии натощак в состоянии ОФП составил у женщин в среднем 20,1 %. Подобная картина отмечена на всем протяжении голодания женщин как при ОФП, так и при УР (см.

таблицу 1). Полученные результаты позволяют предполагать, что одним из источников поступления глюкозы в кровь у женщин во время голодания являются клетки тканей верхних конечностей: эндотелиоциты сосудов (как основной и/или промежуточный источник); и, возможно, другие клетки.

После перорального приема 75 г глюкозы в течение первых 1,5 ч достоверных различий  $\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$  нерабочей руки не было выявлено (см. таблицу 1), так как основным источником ее поступления в кровь и развития постпрандиальной гипергликемии становился ЖКТ. Суммарные результаты 264 сопоставлений  $\Gamma_{\text{КАП}}-\Gamma_{\text{ВЕН}}$  в условиях голодания при ОФП, УР натощак и проведения ПТТГ показывают (таблица 2), что в 163 случаях (61,7 %;  $t = 20,567$ ;  $p < 0,001$  от 264 сопоставлений) источником глюкозы для поступления в кровь являются у человека клетки тканей верхних конечностей (эндотелиоциты сосудов и, возможно, другие), что предполагает участие в этом процессе гораздо большего числа клеток, а не только гепатоцитов, энтероцитов или нефроцитов. Рассчитанный вклад этих клеток (эндотелиоцитов и других) рук в под-

Таблица 2 — Распределение различных соотношений между содержаниями глюкозы в цельной капиллярной и цельной венозной крови, забранной из нерабочей руки у женщин, при различных функциональных состояниях

Table 2 — Distribution of various ratios between the glucose contents in whole capillary and whole venous blood taken from a non-working arm in women under various functional conditions

Функциональное состояние (ФС)	Распределение ССГ у молодых женщин				— различия достоверны по <i>t</i> -критерию или по $\chi^2$
	АЗС	Удельный вес случаев, % от N			
	N; П+P+B	П, % C±m <sub>C</sub>	Р, % C±m <sub>C</sub>	В, % C±m <sub>C</sub>	
1) относительный функциональный покой (ОФП) натошак (10–12 ч голодания)	24 8+1+15	33,3±9,8	4,2±4,2	62,5±11,1	$\chi^2 = 24,000; p < 0,001$ 
2) длительная (6-часовая) умственная работа (УР) натошак	144 38+9+97	26,4±3,7	6,2±2,0	67,4±3,9	$\chi^2 = 167,736; p < 0,001$ 
3) прием 75 г кристаллической глюкозы, растворенной в 250 мл воды	96 34+11+51	35,4±4,9	11,5±3,3	53,1±5,1	$\chi^2 = 91,569; p < 0,001$ 
4) ОФП + шести часовая УР натошак (16–18 ч голодания)	168 46+10+112	27,4±3,4	5,9±1,8	66,7±3,6	$\chi^2 = 194,551; p < 0,001$ 
5) ОФП + 6-часовая УР натошак + прием 75 г глюкозы	264 80+21+163	30,3±2,8	8,0±1,7	61,7±3,0	$\chi^2 = 282,419; p < 0,001$ 
(—) — различия достоверны между показателями удельного веса обмена глюкозы при разных ФС по <i>t</i> -критерию Стьюдента ( $p \leq 0,05$ ) для случаев КАП<ВЕН (Выделения глюкозы в кровь); а также по коэффициенту вариации для случаев КАП=ВЕН (Равновесия)		1 2 3 4 5		1 2 3 4 5	

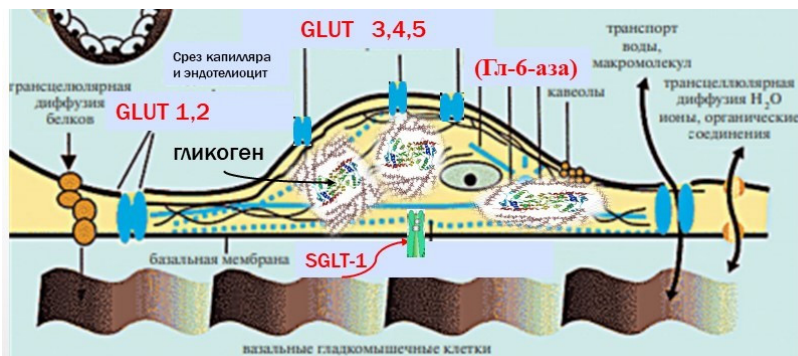
*Примечание:* ССГ – сопоставления содержания глюкозы; АЗС – абсолютные значения случаев; N – число случаев ССГ в цельной капиллярной крови (КАП) и цельной венозной крови (ВЕН) при каждом ФС; П (Потребление) – число случаев, когда содержание глюкозы выше в цельной капиллярной крови (КАП>ВЕН), т.е. имеет место Потребление глюкозы клетками из крови; В (Выделение) – число случаев, когда содержание глюкозы выше в цельной венозной крови (КАП<ВЕН), т.е. имеет место Выделение глюкозы в кровь; Р (Равновесие) – число случаев, когда содержание глюкозы в оттекающей цельной венозной крови и в цельной капиллярной крови одинаково (КАП = ВЕН), т.е. между потреблением и выделением глюкозы клетками нерабочей руки и кровью имеется Равновесие.

*Note:* CGC/ССГ/ – comparison of glucose content. AVC/АЗС/ station – absolute values of cases. N – the number of cases of CGC/ССГ/ in whole capillary blood (CAP) and whole venous blood (VEN) for each functional state (FS). C<sub>П/</sub> (Consumption) – the number of cases when the glucose content is higher in whole capillary blood (CAP>VEN), i.e. there is glucose Consumption by cells from the blood. Ex<sub>В/</sub> (Excretion) – the number of cases when the glucose content is higher in whole venous blood (CAP<VEN), i.e. there is a release (Excretion) of glucose into the blood. Eq<sub>Р/</sub> (Equilibrium) – the number of cases when the glucose content in flowing whole venous blood and in whole capillary blood is the same (CAP=VEN), i.e. there is an Equilibrium between the consumption and release of glucose by the cells of the non-working arm and the blood.

держании должного уровня гликемии составля-ет 8,2–26,0 % (см. таблицу 1).

Учитывая представленные доказательства достаточного весомого (от 8,2 % до 26,0 %) вклада клеток тканей верхних конечностей в поддержание должного уровня гликемии при ОФП и УР в качестве источника глюкозы (см. таблицу 1), сопоставимого с вкладом печени и почек, закономерно встает вопрос об участии в этом конкретных видов клеток. Хорошо известные факты [2, 4–6, 8, 10, 11] о путях и механизмах обмена глюкозы в организме и крови позволяют утверждать об участии в них эпителиоцитов кишечника, печени, почек и эндотелиальных клеток (ЭК) сосудов (рисунок), которые являются как источниками поступления глюкозы в кровь, так и удаления ее из крови. Это обусловлено следующими фактами. Во-первых, для однослойных эпителиев (например, призматиче-

ского эпителиа слизистой оболочки тонкого кишечника, призматического и кубического эпителиев почечных канальцев, ЭК), а также гепатоцитов характерна высокая проницаемость их мембран (как апикальной, так и базальной) для глюкозы за счет наличия в их мембранах соответствующих белков-транспортеров семейства SGLT<sub>1-6</sub> и GLUT<sub>1-14</sub> [4, 6, 8, 10, 15, 19]. Во-вторых, движение глюкозы в ЭК может происходить в противоположных направлениях по отношению к крови: поступать в кровь (например, через ЭК в сосудах кишечника и почек) или удаляться из крови (через ЭК в сосудах головного мозга, скелетных мышц или других органов). В-третьих, поступление глюкозы и ее выход из ЭК в кровь или в межклеточное пространство происходит в основном унипортом с участием белков семейства GLUT<sub>1-5</sub> (ГЛЮТ<sub>1-5</sub>) [8, 11]. Эти белки-транспортеры являются для глюкозы двусто-



Метаболизм **эндотелиальных клеток** имеет решающее значение для прорастания сосудов и служит движущей силой ангиогенеза [Katerina Rohlenova, et al. 2018]. Помимо гликолиза, окислительного фосфорилирования, метаболизма глутамина и окисления жирных кислот [Susan, et al. 2022], эндотелиальные клетки **запасают и катаболизируют гликоген**, необходимый для быстрого поддержания функций эндотелия при физиологических и патологических стимулах (диабет, рак). Интересно, что переключение метаболических процессов предшествует функциональным изменениям и патологическим состояниям в эндотелиальных клетках [Knott RM, et al. 1996; Gaudreault N, et al. 2004; Amemiya T 1983; Yokota C, Okuda Y 2002; Artwohl M, et al. 2007]. Хотя основным источником АТФ в эндотелиальных клетках является аэробный гликолиз [Susan, et al. 2022], данные убедительно указывают на то, что хранение и расщепление гликогена могут играть решающую роль при функциональных или патологических состояниях [Susan, et al. 2022].

Переносчики глюкозы - GLUT1, GLUT4 [Susan, et al. 2022], GLUT3 [Knott RM, et al. 1996] высоко экспрессируются в эндотелиальных клетках. Gaudreault N и соавт. (2004) сообщили об экспрессии GLUT-1, -2, -3, -4 и -5 на апикальной стороне эндотелиальных клеток, тогда как SGLT-1 преимущественно располагался на аблюминальной (базолатеральной) стороне.

**1,8 кг**

Кроме того, глюкозо-6-фосфатаза, фермент, обнаруженный в основном в печени и почках, играет важную роль в обеспечении глюкозы в периоды голодания. **Глюкозо-6-фосфатаза (Гл-6-аза) также экспрессируется в эндотелиальных клетках** [Broadwell RD, et al. 1983; Kazimierzczak J 1965].

Рисунок – Эндотелиальные клетки (ЭК) и их участие в обмене глюкозы

Figure – Endotheliocytes and their role in glucose metabolism

ронне проходимыми каналами и направление ее движения определяется прежде всего концентрацией этого моносахарида в плазме крови, в клетках (ЭК) и вне их. В-четвертых, ЭК способны запасать глюкозу в виде гликогена, а их общая масса от 1 до 1,8 кг сопоставима с массой печени [11].

Следует отметить, что метаболизм глюкозы имеет основополагающее значение для функции ЭК (см. рисунок), выступая в качестве основного источника для выработки энергии, синтеза основных биомолекул и окислительно-восстановительного гомеостаза. Метаболизм ЭК имеет решающее значение для прорастания сосудов и служит движущей силой ангиогенеза [17]. Помимо гликолиза, окислительного фосфорилирования, метаболизма глутамина и окисления жирных кислот [23] ЭК запасают и катаболизируют гликоген, необходимый для быстрого поддержания функций эндотелия при физиологических и патологических стимулах (диабет, рак). Интересно, что переключение метаболических процессов предшествует функциональным изменениям и патологическим состояниям в ЭК [12, 13, 15, 19, 25]. Хотя основным источником АТФ в ЭК является аэробный гликолиз [23], данные убедительно указывают на то, что хранение и расщепление гликогена может играть решающую роль при функциональных или патологических состояниях.

Действительно, переносчики глюкозы – GLUT<sub>1</sub>, GLUT<sub>4</sub> [26], GLUT<sub>3</sub> [20] – высоко экспрессируют

ся в ЭК. N. Gaudreault и соавт. (2004) сообщили об экспрессии GLUT<sub>1-5</sub> на апикальной стороне ЭК, тогда как SGLT<sub>1</sub> преимущественно располагался на аблюминальной (базолатеральной) стороне. Однако следует отметить, что GLUT<sub>3</sub> преимущественно экспрессируется на базолатеральной стороне. Экспрессия этих переносчиков глюкозы в значительной степени зависит от физиологического состояния и развития заболевания. Например, N. Gaudreault, et al. (2004) показали, что длительная гипергликемия, вызванная введением стрептозотоцина у животных, значительно подавляет экспрессию GLUT<sub>1,3,4и5</sub> в ЭК, в то же время повышая регуляцию GLUT<sub>2</sub>, оставляя SGLT<sub>1</sub> неизменным [15]. Напротив, R. M. Knott и соавт. (1996) продемонстрировали, что одно часовое воздействие на ЭК глюкозы (5 мМ) приводит к повышению уровня GLUT<sub>3</sub>. Синтез и хранение гликогена в ЭК, вероятно, впервые были продемонстрированы F. Numano, et al. (1974) and T. Takeuchi, H. Miyayama (1973). Активность гликогенсинтетазы и фосфорилазы в цитоплазматическом матриксе эндотелия была продемонстрирована T. Amemiya (1983) в гребешковом капилляре цыпленка, что указывает на роль ЭК в гликогенезе и гликогенолизе [12]. Аналогичные данные о метаболизме глюкозы в ЭК представлены C. Yokota, Y. Okuda (2002). Кроме того, глюкозо-6-фосфатаза – фермент, обнаруженный в основном в печени и почках, играет важную роль в обеспечении глюкозы

в периоды голодания. Однако информация скудна, предполагается, что глюкозо-6-фосфатаза экспрессируется в ЭК [14, 18]. Несмотря на то что механизмы контроля эндотелиального метаболизма глюкозы точно не известны, данные свидетельствуют о том, что гликогенин, аутогликозилирующий белок, участвует в инициации биосинтеза гликогена [20, 22]. Интересно, что гликогенин коэкспрессируется с GLUT<sub>3</sub>, что позволяет клеткам, запасаящим гликоген, достаточно эффективно обменивать глюкозу в соответствии с преобладающими метаболическими потребностями синтеза или деградации гликогена [16]. Таким образом, функция гликогенина зависит от эффективного поглощения глюкозы [16]. Таким образом, глюкоза крови может выступать в качестве регулятора синтеза или деградации гликогена в ЭК, а они в свою очередь – в качестве такового (регулятора) для уровня гликемии. Полученные нами результаты о повышенном уровне Г<sub>ВЕН</sub> по сравнению с Г<sub>КАП</sub>

в 61,7 % случаев сопоставления этих показателей крови, забранной из нерабочей руки и исключающей влияние гепатоцитов, энтероцитов, нефроцитов, подтверждают факт участия ЭК (как основного или промежуточного звена) сосудов нерабочей руки в регуляции должного уровня гликемии в зависимости от физиологического состояния организма человека (см. таблицы 1, 2).

### Заключение

В результате проведенных исследований были получены следующие выводы.

1. Выявлено достоверное снижение содержания глюкозы в цельной крови женщин при УР натощак.
2. Полученные факты позволяют предположить наличие нового независимого источника поступления эндогенной глюкозы в кровь при голодании – клеток (ЭК) нерабочей руки. Рассчитанный вклад этих клеток в поддержании должного уровня гликемии может составлять до 26,0 % ( $p < 0,05$ ).

### Список цитированных источников

1. Алкоголь, когнитивные функции и гомеостаз глюкозы / под ред. В. А. Переверзева. – LAP: Saarbrücken/Deutschland, 2015. – С. 100.
2. Биологическая химия / под ред. А. Д. Тагановича. – М.; Минск, 2008. – 688 с.
3. Зайцев, В. М. Прикладная медицинская статистика / В. М. Зайцев, В. Г. Лифляндский, В. И. Маринкин. – СПб.: Фолиант, 2006. – 432 с.
4. Сахарный диабет и нарушения углеводного обмена / Г. М. Кроненберг [и др.] // Руководство. Эндокринология по Вильямсу. – М.: Медицина, 2010. – 448 с.
5. Лелевич, В. В. Алкоголь и мозг (метаболические аспекты) / В. В. Лелевич, С. В. Лелевич, А. Г. Виницкая. – Гродно: ГрГМУ, 2019. – 244 с.
6. Мак, Д. Секреты эндокринологии : пер. с англ. / Д. Мак, Т. Майкл. – 4-е изд., испр. и доп. – М.: БИНОМ, 2010. – 548 с.
7. К вопросу о новых источниках поступления эндогенной глюкозы в кровь при голодании / В. А. Переверзев [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2019. – Т. 18, №4. – С. 44–51.
8. Перенос глюкозы через мембрану унипортным транспортом [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://meduniver.com/Medical/genetika/perenos\\_glukozi\\_cherez\\_membranu.html](https://meduniver.com/Medical/genetika/perenos_glukozi_cherez_membranu.html). – Дата доступа: 12.07.2019.
9. Петров, С. В. Общая хирургия / С. В. Петров. – СПб., 1999. – 672 с.
10. Физиология эндокринной системы / под ред. Дж. Гриффина и С. Охеды; пер. с англ. – М., 2008. – С. 454–489.
11. Эндотелий. Медицинская Энциклопедия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.medical-enc.ru26endothelium.shtml>. – Дата доступа: 12.07.2019.
12. Amemiya, T. Glycogen metabolism in the capillary endothelium. Electron histochemical study of glycogen synthetase and phosphorylase in the pecten capillary of the chick / T. Amemiya. // Acta Histochemica. – 1983. – Vol. 73, №1. – P. 93–96. DOI: 10.1016/s0065-1281(83)80080-4.
13. Insulin does not regulate glucose transport and metabolism in human endothelium / M. Artwohl [et al.] // The European Journal of Clinical Investigation. – 2007. – Vol. 37. – P. 643–650. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2007.01838.x
14. Cytochemical localization of glucose-6-phosphatase activity in cerebral endothelial cells / R. D. Broadwell [et al.] // The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. – 1983. – Vol. 31, №6. – P. 818–822. DOI: 10.1177/31.6.6302165.
15. Gaudreault, N. Characterisation of glucose transporters in the intact coronary artery endothelium in rats: GLUT-2 upregulated by long-term hyperglycaemia / N. Gaudreault, D. R. Scriven, E. D. Moore // Diabetologia. – 2004. – Vol. 47, №12. – P. 2081–2092. DOI: 10.1007/s00125-004-1583-4.
16. From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta / D. Hahn [et al.] // Molecular Human Reproduction. – 2001. – Vol. 7, Iss. 12. – P. 1173–1178. DOI: 10.1093/molehr/7.12.1173
17. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease / K. Rohlenova [et al.] // Trends Cell Biol. – 2018. – Vol. 28, №3. – P. 224–236. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.10.010.
18. Kazimierzczak, J. Selective demonstration of vascular endothelium by a modified method for glucose-6-phosphatase / J. Kazimierzczak. // Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. – 1965. – Vol. 63. – P. 319–320.
19. Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells / R. M. Knott [et al.] // The Biochemical Journal. – 1996. – Vol. 318 (Pt. 1). – P. 313–317. DOI: 10.1042/bj3180313.
20. Mu, J. Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis / J. Mu, A. V. Skurat, P. J. Roach // The Journal of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272 (44). – P. 27589–27597.
21. Glycogen in endothelial cells. Electronmicroscopic studies of polyglucose synthesized by phosphorylase in endothelial cells of aorta and heart muscle of rabbits / F. Numano [et al.] // Experimental and Molecular Pathology. – 1974. – Vol. 20(2). – P. 168–174. DOI:10.1016/0014-4800(74)90051-3.
22. GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis / A. V. Skurat [et al.] // The Journal of Biological Chemistry – 2002. – Vol. 277(22). – P. 19331–19338.
23. Leung, S. W. S. The glycolytic process in endothelial cells and its implications / S. W. S. Leung, Y. Shi // Acta Pharmacol.



Sin. – 2022. – Vol. 43. – P. 251–259. DOI:10.1038/s41401-021-00647-y.

24. Takeuchi, T. Macromolecular particles of polyglucose synthesized under histochemical conditions in the endothelial cells of rabbit blood vessels / T. Takeuchi, H. Miyayama // *Histochem J.* – 1973. – Vol. 5(5). – P. 451–461. DOI:10.1007/BF01012002
25. Yokota, C. Glucose metabolism in vascular endothelial cells / C. Yokota, Y. Okuda // *Nihon Rinsho.* – 2002. – Vol. 60, №7. – P. 324–330.

## References

- 1 *Alcohol, cognitive functions and glucose homeostasis* / edited by V. A. Pereverzev. LAP: Saarbrücken/Deutschland, 2015. 100 p. (in Russian).
- 2 *Biological Chemistry*/ ed. A. D. Taganovich. Moscow; Minsk; 2008. 688 p. (in Russian).
- 3 Zaytsev VM, Lifyandskiy VG, Marinkin V.L *Applied Medical Statistics*. St. Petersburg; 2006. 432 p. (in Russian).
- 4 *Diabetes Mellitus and Carbohydrate Metabolism Disorders* / G. M. Kronenberg [et al.] // Guide. Endocrinology by Williams. Moscow: Meditsina, 2010. 448 p.
- 5 Lelevich VV, Lelevich SV, Vinnitskaya AG. *Alcohol and the brain (metabolic aspects)*. Grodno: GrSMU. 2019. 244 p. (in Russian).
- 6 Mac D, Michael T. *Endocrinology Secretions*: trans. Engl. 4th ed. M. : BINOM, 2010. 548 p. (in Russian).
- 7 Pereverzev V.A. [et al.] On the issue of new sources of endogenous glucose intake into the blood during fasting. *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*. 2019, vol. 18, no. 4, pp. 44–51. (in Russian).
- 8 Glucose transfer through the membrane by uniport transport [Electronic resource]. – Mode of access: [https://meduniver.com/Medical/genetika/perenos\\_glukozi\\_cherez\\_membranu.html](https://meduniver.com/Medical/genetika/perenos_glukozi_cherez_membranu.html). – Date of access: 12.07.2019.
- 9 Petrov SV. General surgery. S.-Petersburg, 1999. 672 p.
- 10 Physiology of the endocrine system; ed. Griffin and S. Ojeda. Moscow, 2008. pp. 454–489.
- 11 Endothelium. Medical Encyclopedia [Electronic resource]. Mode of access: <http://www.medical-enc.ru/26endothelium.shtml>. – Date of access: 12.07.2019.
- 12 Amemiya T. Glycogen metabolism in the capillary endothelium. Electron histochemical study of glycogen synthetase and phosphorylase in the pecten capillary of the chick. *Acta Histochemica*, 1983, vol. 73, no. 1, pp. 93–96. DOI: 10.1016/s0065-1281(83)80080-4.
- 13 Artwohl M, Brunmair B, Fürsinn C, Hölzenbein T, Rainer G, Freudenthaler A, Porod EM, Huttary N, Baumgartner-Parzer SM. Insulin does not regulate glucose transport and metabolism in human endothelium. *The European Journal of Clinical Investigation*, 2007, vol.37, pp. 643–650. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2007.01838.x.

- 14 Broadwell RD, Cataldo AM, Salzman M. Cytochemical localization of glucose-6-phosphatase activity in cerebral endothelial cells // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1983, vol. 31, no. 6, pp. 818–822. DOI: 10.1177/31.6.6302165.
- 15 Gaudreault N, Scriven DR, Moore ED. Characterisation of glucose transporters in the intact coronary artery endothelium in rats: GLUT-2 upregulated by long-term hyperglycaemia. *Diabetologia*, 2004, vol. 47, no. 12. pp. 2081–2092. DOI: 10.1007/s00125-004-1583-4.
- 16 Hahn D, Blaschitz A, Korgun ET, Lang I, Desoye G, Skofitsch G, Dohr G. From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta. *Molecular Human Reproduction*, 2001, vol. 7, no 12, pp. 1173–1178. DOI: 10.1093/molehr/7.12.1173.
- 17 Rohlenova K, Veys K, Miranda-Santos I, De Bock K, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Trends in Cell Biology*, 2018, vol. 28, no 3, pp. 224–236. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.10.010.
- 18 Kazimierczak J. Selective demonstration of vascular endothelium by a modified method for glucose-6-phosphatase. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 1965, vol. 63, pp. 319–320.
- 19 Knott RM, Robertson M, Muckersie E, Forrester JV. Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells. *The Biochemical Journal*, 1996, vol. 318 (Pt. 1), pp. 313–317. DOI: 10.1042/bj3180313.
- 20 Mu J, Skurat AV, Roach PJ. Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272 (44), pp. 27589–27597.
- 21 Numano F, Takahashi T, Kuroiwa T, Shimamoto T. Glycogen in endothelial cells. Electronmicroscopic studies of polyglucose synthesized by phosphorylase in endothelial cells of aorta and heart muscle of rabbits. *Experimental and Molecular Pathology*, 1974, vol. 20(2), pp.168–174. DOI: 10.1016/0014-4800(74)90051-3.
- 22 Skurat AV, Dietrich AD, Zhai L, Roach PJ. GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277(22), pp.19331–19338.
- 23 Leung SWS, Shi Y. The glycolytic process in endothelial cells and its implications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, vol. 43, pp. 251–259; DOI:10.1038/s41401-021-00647-y.
- 24 Takeuchi T, Miyayama H. Macromolecular particles of polyglucose synthesized under histochemical conditions in the endothelial cells of rabbit blood vessels. *The Histochemical Journal*, 1973, vol. 5(5), pp. 451–461. DOI: 10.1007/BF01012002.
- 25 Yokota C, Okuda Y. Glucose metabolism in vascular endothelial cells. *Nihon Rinsho*, 2002, vol. 60, no. 7. pp. 324–330.

# TO THE QUESTION OF THE ROLE OF ENDOTHELIOCYTES OF THE NON-WORKING HAND VESSELS IN THE MECHANISMS OF REGULATION OF THE PROPER LEVEL OF GLYCEMIA DURING HUNGER AND SATIETY

V. A. Pereverzev<sup>1</sup>, A. V. Sikorsky<sup>1</sup>, A. S. Blazhko<sup>1</sup>, A. V. Evseev<sup>2</sup>, V. A. Pravdivtsev<sup>2</sup>, M. O. Welcome<sup>3</sup>, Yu.E. Razvodovsky<sup>4</sup>, D. A. Aleksandrov<sup>1</sup>, E. V. Pereverzeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

<sup>2</sup>Smolensk State Medical University, Smolensk, Russian Federation;

<sup>3</sup>Neil University of Nigeria, Abuja, Nigeria;

<sup>4</sup>Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus;

**Introduction.** At present, the question of the participation of endotheliocytes, especially in the vessels of the arms or legs, in glucose metabolism is not sufficiently covered.

**Objective** – the study of the glucose content in whole capillary and whole venous blood (including the capillary-venous difference) obtained from the same arm in women to assess the state of their local mechanisms for maintaining the proper level of glycemia under various physiological conditions.

**Materials and methods.** In 24 women, capillary and venous glucose were determined during hunger (relative functional rest and mental work on an empty stomach) and saturation (after taking 75 g of glucose with relative functional rest). Capillary glucose and venous glucose were measured 11 times: initially (under conditions of relative functional rest and starvation); 6 times with mental stress on an empty stomach (after 1, 2, 3, 4, 5, 6 hours); 4 times (30, 60, 90 and 120 minutes) after taking glucose. The calculation data of the difference between capillary and venous glucose made it possible to assess the state of local mechanisms for maintaining glycemia.

**Results.** A decrease in capillary glucose and venous glucose was shown in most women during mental work. An analysis of 264 cases of comparison of venous glucose and capillary glucose showed that the variant “Capillary glucose < Venous glucose” prevailed over the others. This indicates that in 61.7 % ( $p < 0.05$ ) of cases in the venous blood flowing from the non-working arm, the glucose content increases compared to the blood flowing to it.

**Conclusions.** A decrease in glycemia in women during mental work on an empty stomach was revealed. An important mechanism for maintaining the proper level of glycemia has been established, which consists in the participation of cells (endotheliocytes and others) of the non-working hand in it, as a new source of glucose entering the blood during fasting.

**Keywords:** glucose, glycemia, regulation, hunger, satiety.

**For citation:** Pereverzev VA, Sikorsky AV, Blazhko AS, Evseev AV, Pravdivtsev VA, Welcome MO, Razvodovsky YuE, Aleksandrov DA, Pereverzeva EV. To the question of the role of endotheliocytes of the non-working hand vessels in the mechanisms of regulation of the proper level of glycemia during hunger and satiety. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 89–96 (in Russian).

Поступила 30.11.2022

## BIOELEMENTAL, BIOCHEMICAL AND HORMONAL STATUS IN NORM AND WITH OVERWEIGHT

*Ali Adeeb Hussein Ali*

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

**Introduction.** The balance of bioelements is due to their important role in life processes and is determined by participation in almost all types of body metabolism.

**Objective** – assessment of bioelemental, biochemical and hormonal status in normal and overweight (in individuals and experimentally in animals).

**Materials and methods.** Assessment of mineral, biochemical, hormonal metabolism and body mass index (BMI) in individuals (women:  $24.3 \pm 0.24$  years; men:  $25.5 \pm 0.52$  years) and experimental animals (Wistar rats – intact, obese, obesity with intake of premixes from algae *Spirulina plat.* and *Chlorella*). Material: blood serum, tissue samples (experimental animals). Research: biochemical, hormonal, X-ray fluorescent. Statistical processing – SPSS Statistica 26.0.

**Results.** The concentration of trace elements in the blood differed in women and men, with different BMI values. Men tend to have low levels of potassium. Vitamin D deficiency among individuals with high BMI was detected in all groups. The concentration of glucose, cholesterol and triglycerides in persons with BMI = 25–29.9 is higher ( $p = 0.01$ ). Cortisol depended on glucose concentration (BMI = 25–29.9). The concentration of TSH,  $T3_{sv}$ ,  $T4_{sv}$ , and cortisol in individuals with BMI = 25–29.9 higher. Premixes *Spirulina plat.* and *Chlorella* contributed to the normalization of trace elements, the concentration of glucose and cholesterol.

**Conclusions.** In persons with BMI = 25–29.9, the concentration of glucose, cholesterol, LDL and triglycerides is higher, vitamin D deficiency is 50%. Reception of premixes *Spirulina plat.* and *Chlorella* in obese animals did not cause changes in the content of trace elements, contributed to a decrease in glucose, cholesterol, triglycerides.

**Keywords:** bioelements, obesity, body mass index, premix, algae.

**For citation:** Ali Adeeb Hussein Ali. Bioelemental, biochemical and hormonal status in norm and with overweight. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 97–104.

### Introduction

The balance of bioelements is due to their important role in life processes and is determined by participation in almost all types of body metabolism. The macro- and microelements can be toxic if consumed in large quantities for an extended period of time. Bioelements are part of the biological structure of the human body, play an important role in metabolic processes, and participate in almost all processes that occur in the body [1, 2]. Macro- and microelements are essential for the immune system, proper growth and development, and insulin production. Toxic elements do not have any physiological role in the human body, and exposure in large quantities leads to a violation of cellular metabolism and to fatal diseases such as cancer.

The content of studies conducted on bio-elements, which included biological and environmental samples, has received wide attention around the world, and many scientific papers have been published in this field [3]. Many attempts have been made in recent years to understand the role of trace elements in the biological system, especially human metabolism.

Deficiency of trace elements in the body leads to a pathology accompanied by significant metabolic

disorders and can cause changes: metabolic disorders, on the one hand, and distinct immune disorders, accompanied by a decrease in overall immune resistance, on the other. Both processes lead to endocrinopathies, inflammations and neoplastic diseases. The study of changes in the content of bioelements is important from the point of view of practical health care in order to identify diagnostic markers and predict the risk of developing pathological conditions [4].

To date, there is little information about the biochemical mechanisms of interaction between two or more elements, which can be very complex and ambiguous. Trace elements in the composition of enzymes accelerate or slow down various biochemical processes, that is, they act as catalysts or inhibitors. This leads to an increase or decrease in the concentration of individual proteins, fats, carbohydrates and other substances necessary for life [5].

Analysis of the concentrations of chemical elements in the body reflects synergistic and antagonistic interactions between elements and provides valuable information for further study of their role in the regulation of metabolism. However, the mechanisms of interaction between the studied

elements and their relationship with biochemical parameters remain not fully understood. It is important to pay attention to the occurrence of overweight and the role of biological factors in this complex metabolic process. Prevention of excess weight should be comprehensive and begin at a young age. The formation of excess weight depending on nutrition requires a detailed study [6–8].

Hair is a biological material that represents biological processes for years in the human body. Hair samples can diagnose subclinical chronic diseases and are considered a basic indicator of mineral metabolism in the human body. When comparing the concentration of chemical elements in hair, blood, and urine, their concentration is several times higher. In addition, chemical elements can be identified specifically in blood (6–8), but in hair, they reach 30 elements. The determination of bioelements in hair is a non-invasive method, and the samples taken do not cause any risks to the patient and are not considered dangerous to the examiner [9–11].

Optimization of the level of bioelements depending on gender and age among the population is of particular importance today and requires close study.

The goal of the study: assessment of bioelemental status, biochemical and hormonal metabolism in normal and overweight conditions (in man and experimentally in animals).

### Materials and methods

Assessment of changes in the characteristics of the mineral, biochemical and hormonal metabolism was carried out in 100 practically healthy individuals of both sexes living in Grodno. The age of the examined persons was  $24.3 \pm 0.24$  for women and  $25.5 \pm 0.52$  for men. All individuals were evaluated for body mass index (BMI). Body Mass Index was calculated by the formula:  $\text{BMI (kg/m}^2\text{)} = \text{weight (kg)} / \text{height (m}^2\text{)}$ . In accordance with WHO recommendations, the study used the interpretation of BMI indicators: 18–24.9 (normal), 25–29.9 (overweight, preobesity). Characteristics of the surveyed groups: women, group 1:  $n = 25$  (BMI = 18–24.9; weight:  $52.6 \pm 4.58$  kg); women, group 2:  $n = 25$  (BMI = 25–29.9; weight:  $64.4 \pm 1.77$  kg); men, group 1:  $n = 25$  (BMI = 18–24.9; weight:  $71.6 \pm 3.94$  kg); men, group 2:  $n = 25$  (BMI = 25–29.9; weight:  $86.5 \pm 1.10$  kg). Standards adopted in the study: a group of men and women over the age of 18; the group is overweight; use a scale and tape measure to diagnose overweight by Body Mass Index (BMI); patients' informed consent to participate in research; not taking nutritional supplements containing micronutrients (vitamins, macro- and microelements); not taking hormonal drugs and other medications; absence of any disease symptoms among the

participants; absence of gastrointestinal diseases and any other diseases.

To assess the intake of macronutrients (protein, fat, and carbohydrates) and micronutrients (vitamins), a questionnaire was designed according to the instructions for use of the “Actual Nutrition Study based on the method of analyzing the frequency of food consumption” (registration number 017-1211), approved by the Belarusian Ministry of Health on December 15, 2011. The X-ray fluorescence analysis (XRF) on a CEP-01 or ElvaX device with Elvatech MCA Software and MK-RE-Ob software was used to determine the macro- and micro-element composition of hair, microalgae and tissue of Wistar rats.

The spectrum determination of biochemical parameters in the blood (bioelements, urea, creatinine, cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides, alanine aminotransferase – ALT, and aspartate aminotransferase – AST) was carried out using the BS-330 analyzer (Mindray, China) and reagents manufactured by Diasense (Belarus). The study of hormones in the blood (thyroxine, triiodothyronine, and pituitary thyroid stimulating hormone/TSH) was carried out by immunochemical analysis on the MiniVidas analyzer (BioMerieux, France) using reagents from BioMerieux, France.

The samples of biological material were obtained in a standard way (using Vacutainer vacuum systems manufactured by Beckton Dickinson, USA). The preparation of blood samples for research was carried out in a standardized way: centrifugation in a Fenox-24M centrifuge (China) at 3000 g for 10 minutes. The serum samples were taken into separate systems in which the study was conducted.

Experimental work was carried out on adult male Wistar rats with an average first weight of  $225 \pm 12$  g, according to the XI Declaration of Helsinki of the World Medical Association (1964) and the rules of laboratory practice. The duration of the experiment was 84 days. The animals were divided into three groups. The first control group ( $n = 10$ ) consisted of intact animals. Obesity was modeled in animals from the second ( $n = 10$ ) and third ( $n = 10$ ) groups by consuming a high-fat diet (HFA), in which the fat component was 32 % of the total calorie content of the diet and included animal (beef) fat (45 %) and sunflower oil (55 %). During the entire experiment, the animals of the third group were additionally given premixes of *Spirulina platensis* and *Chlorella* (at a rate of 2 % by weight of the feed). An increase in body weight of 10–25 % was considered moderate obesity, and an increase of 40 % or more was considered severe obesity.

Statistical processing of the research material was performed using the SPSS Statistica 26.0 statistical software package. The differences in the compared groups were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

In our study, we assessed the daily dietary intake of macronutrients (protein, fat, and carbohydrates) and micronutrients (vitamins), the composition of bioelements in hair and blood plasma (macro and microelements), and chemical and hormonal indicators in overweight (BMI = 25–29.9) and normal-weight people in Grodno, Belarus. Multiple correlations have been established between the content of microelements in hair and blood plasma and the diet of overweight subjects.

When evaluating the dietary intake of macro- and micronutrients for overweight males and females, violations of normal physiological parameters were found (an increase in macronutrients and a decrease in micronutrients). In the group of overweight females, the protein increase was 78.2 %, the fat increased by 49.6 %, and the carbohydrates increased by 49.6 % compared to the physiological standards. The number of cases of violation of macronutrients (at least one macronutrient) was 89.4 %. In the group of overweight males, the protein increase was 73.9 %, the fat increased by 48 %, and the carbohydrates increased by 24 % compared to the physiological standards. The number of cases of violation of macronutrients (at least one macronutrient) was 84.2 %.

In the group of females with a BMI of 25–29, a violation in the consumption of micronutrients was found, as the consumption of (Folacin, Beta-carotene, Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin PP, Vitamin

B1, Vitamin B2, Vitamin B6, Vitamin B12) decreased (51.8 %, 18.2 %, 71.7 %, 82.3 %, 85.1 %, 57.9 %, 34.1 %, 65.6 %, 57 %, and 31.3 %) compared with the physiological norms for consumption, respectively. Micronutrient deficiency (at least one micronutrient) was found in 94.7% of females with a BMI of 25–29 when compared to physiological intake. In the group of males with a BMI of 25–29.9, a violation in the consumption of micronutrients was found, as the intake of (Folacin, Betacarotene, Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin PP, Vitamin B1, Vitamin B2, Vitamin B6, Vitamin B12) decreased (51.7 %, 7.69 %, 5.1 %, 68.6 %, 27.07 %, 47.2 %, 10.7 %, 51.2 %, 39.7 %, 19.1 %) compared with the physiological norms for consumption, respectively. Micronutrient deficiency (at least one micronutrient) was discovered in 86.6 % of males with a BMI of 25–29.9 when compared to physiological intake (figure 1).

When comparing the main and control groups, taking into account gender, statistically significant differences were observed for macro- and micronutrients for both sexes. The statistical differences were levels of significance (a trend towards an increase) when comparing macronutrients in the group of overweight females with the control group, and levels of significance (a trend towards a decrease) when comparing small feeders in the group of overweight females with the control group ( $p = 0.01$ ). This also applies to the group of overweight males compared to the control group, with slight differences in the level of statistical significance.

The results of previous studies are consistent with the findings of our study to assess the daily dietary intake of macro- and micronutrients and indicated that “an unbalanced diet leads to a positive energy imbalance”. Thus, the energy imbalance leads to a deficiency in the

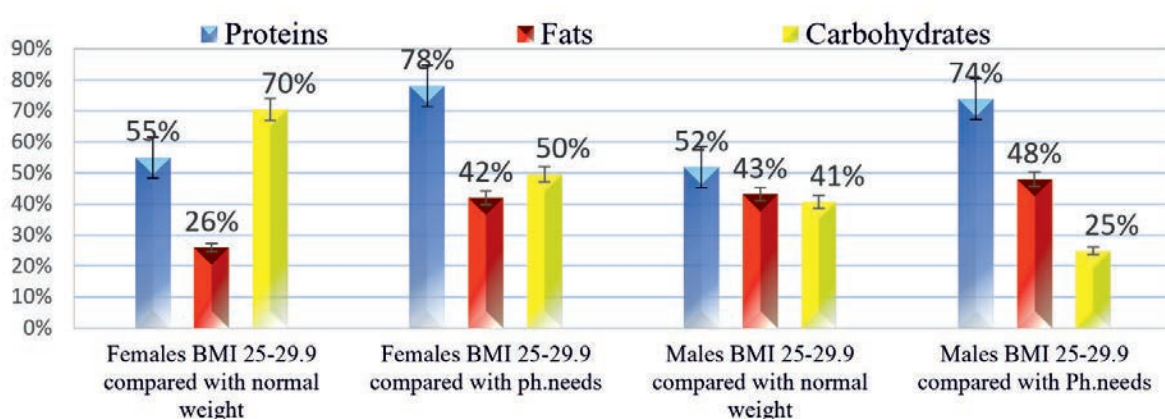


Figure 1 – Percentages of increased consumption of macronutrients compared to normal weight and daily physiological needs for overweight individuals (male, female)

Рисунок 1 – Потребление макронутриентов (лица с избыточной массой тела, лица с нормальной массой тела, суточная физиологическая потребность, мужчины, женщины)

body of the biologically active nutritional components, especially the deficiency of micronutrients, which have a major role in the synthesis of enzymes that catalyze chemical reactions as well as their role in balancing some hormones, and this ultimately leads to an imbalance in the metabolism process, which causes an increase in weight and obesity.

In the analysis of the bioelements in the hair, it was found that females and males with overweight suffer from the accumulation of heavy toxic metals (harmful elements) such as cadmium, mercury, and lead (pb) and a decrease in good elements (micro and macro elements) such as calcium, zinc, copper, iron, and potassium. It was found that the correlations of bioelements with each other in overweight females and males began to fade and disappear, and new correlations appeared that did not originally exist when compared with the control group for each of them. The increase in toxic heavy metal accumulations leads to major problems in the digestive system, which leads to malabsorption of good minerals (figure 2).

The bioelements should not be considered separately because their interaction together produces an important biological effect. Therefore, the calcium/potassium correlation coefficient was calculated as a correlation coefficient representing the macro elements and the zinc/copper correlation coefficient as a correlation coefficient representing the micro elements. The ratio of calcium to potassium exceeded the recommended limit (2–5) significantly in the group of overweight males and females. The percentage of overweight females was more than 96 %, and the percentage of overweight males was more than 70 %. The calcium/potassium ratio can be considered an indicator of overweight, and this was not previously mentioned in the literature. The detected imbalance of macro- and microelements in young patients living in Grodno, Belarus, in terms of calcium, zinc, iron, copper, and potassium will allow for early nutritional correction.

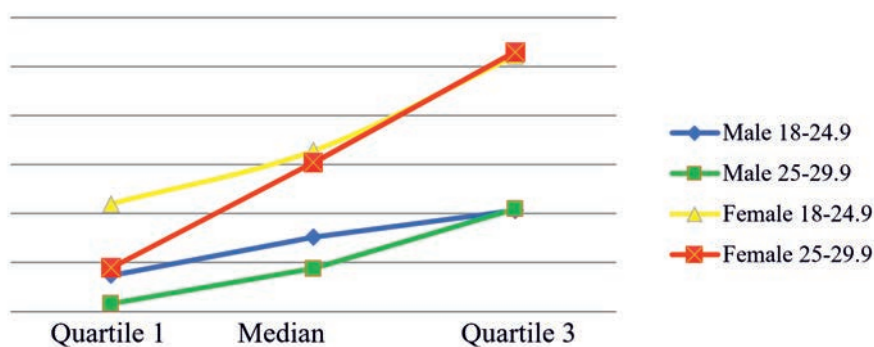


Figure 2 – Hair calcium / potassium ratio for males and females with a BMI =18–24.9 and BMI = 25–29.9

Рисунок 2 – Соотношение концентрации кальций/калий в волосах мужчин и женщин (ИМТ = 18–24,9; ИМТ = 25–29,9)

Blood has a stable composition of macro- and microelements; therefore, deviations in their content may indicate the presence of various pathological conditions in a person. Analysis of the results showed that the concentration of trace elements in the blood serum significantly differed in both females and males with different BMI values. We discovered a higher calcium content but a lower copper content in both females and males with overweight compared to people with normal BMI values ( $p = 0.01$ ). In addition, only overweight men have lower potassium values than men with lower BMI values. A conditional deficiency (a downward trend) of vitamin D among men and women was found in both groups of overweight subjects ( $p = 0.01$ ). An analysis of the level of vitamin D supply among males and females revealed a deficiency in 50 % of cases in groups of people with a BMI of 25–29.9.

The imbalance established in the blood samples of healthy donors in terms of bioelementary and biochemical status suggests that the differences we found may be associated with changes in metabolic processes in the body, which are expressed in an increase in body weight. In persons with a BMI of 25–29.9, the concentration of glucose, cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides is higher than in persons with a normal BMI, both in men and women ( $p = 0.003$ ). Against the background of a general trend towards an increase in metabolic parameters, the fact of a change in enzymatic activity was noted: the activity of alanine aminotransferase, but not aspartate aminotransferase, increases with increasing body weight, both among females and among men ( $p = 0.01$ ). This fact, against the background of an imbalance of mineral metabolism, is assessed not only as the development of dysmicroelementoses but also as a violation of metabolic processes.

The presence of a borderline and high TSH value, which we found, is possibly associated with the risk

of weight gain and obesity: an increased concentration of TSH correlates with an increased glucose level (OR = 1.93,  $p = 0.026$ ) and, along with other risk factors, may be an additional sign of the risk of developing obesity.

An analysis of the hormone concentration in individuals with a BMI = 25–29.9 in combination with an imbalance of microelements and vitamins established significant correlations in both sexes:

women: TSH/vitamin D ( $r = 0.60, p = 0.02$ ), triiodothyronine (free)/calcium ( $r = 0.66, p = 0.02$ ), thyroxine (free)/calcium ( $r = 0.60, p = 0.04$ ), and TSH/copper ( $r = 0.54, p = 0.03$ );

men: TSH/zinc ( $r = 0.53, p = 0.04$ ), thyroxine (free)/iron ( $r = 0.69, p = 0.02$ ), TSH/vitamin D ( $r = 0.61, p = 0.03$ ), triiodothyronine (free)/calcium ( $r = 0.65, p = 0.03$ ), thyroxine (free)/calcium ( $r = 0.67, p = 0.02$ ).

After studying the content of bioelements in hair and blood and measuring hormones and chemical indicators in overweight and normal-weight individuals (females and males), we discovered that the ratio of calcium to potassium in hair content regulates hormones that regulate calcium as an expression of minerals in the body.

From a medical point of view, the thyroid gland and the adrenal glands work together, regardless of the direction in which they go. Their common task is to regulate energy and metabolic processes, as well as emotions and stress controls. In fact, blood test results often indicate that the thyroid gland and adrenal glands are functioning properly, while the calcium-to-potassium ratio clearly indicates that these glands are underactive or overactive, as the adrenal gland overproduces cortisol, which leads to a decrease in the level of insulin in the blood.

In our study, the level of cortisol in the individuals was within the physiological norm for these age groups, taking into account gender, but at the same time, its concentration in persons with a higher body weight (persons of both sexes) was higher ( $p = 0.006$ ). The analysis of correlations of cortisol with indicators of biochemical analysis established the dependence of changes in this hormone on glucose levels in men and women with BMI = 25–29.9 ( $r = 0.57, p = 0.038$ ;  $r = 0.61, p = 0.031$ ).

Thus, the calcium/potassium ratio regulates the balance of the subclinical adrenal-thyroid glands, and this has not been mentioned previously in the literature.

The correlations between diet and the status of bioelements in hair and blood require an integrated approach to prove the prevention of subclinical obesity and weight gain caused by aberrations in the bioelements in overweight adults in Grodno, Belarus, especially since the role of bioelements is important in the process of metabolism of proteins, fats, and carbohydrates and also performs many important physiological functions in the body that cannot be dispensed with in any way.

Spirulina is known to be a very interesting food for this type of diet because of its complete protein properties and its high mineral content, such as iron, calcium, and copper, for example. Spirulina improves

the immune system, strengthening our natural defenses due to its high phycocyanin content as well as having strong antioxidant activity, making it an essential food to prevent premature aging.

Emerging data on the biological action of algae Spirulina and Chlorella (antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, etc.) makes it promising for studying the mechanisms of its effect in various disease states, and, in particular, in obesity and diabetes. A number of specific effects of plant components on various organs and tissues have been identified: skin, gastrointestinal tract, liver, respiratory tract and hypoglycemic effect has been demonstrated.

Based on the identified violations of micronutrient imbalance among the population with excess body weight (BMI = 25–29.9) and taking into account the results obtained on the content of bioelements in premixes obtained by X-ray fluorescence analysis, separate recipes for bakery products are proposed (table 1).

Since the consumption of premixes with feed could affect the total concentration of bioelements in the bodies, an analysis of the quantitative assessment of algae premixes was carried out.

Table 1 – Quantitative characteristics of bioelements in premixes

Таблица 1 – Количественные характеристики биоэлементов в премиксах

Elements	Concentration of elements in premixes	
	Microalgae spirulina	Chlorella seaweed
Zn	109,69	61,23
Se	0,41	1,39
S	4495,82	3291,94
Ca	861,27	2870,19
K	4784,13	1312,11
Cu	14,82	17,54
Fe	271,03	264,42

As can be seen from the table, the content of bioelements in algae premixes ranged from tens to thousands of  $\mu\text{g/g}$ .

At the end of the experiment, at the first stage, the body weight of animals in all groups and the weight of tissue samples (liver) were evaluated. The results of the body weight of animals and tissues are presented in table 2.

A significant increase in body weight of animals in groups modeled obesity by consuming HFD was established by the end of the experiment, both with and without Spirulina platensis and Chlorella algae premixes ( $p < 0.05$ ). It should be noted that the increase in body weight of experimental animals and liver weight were less pronounced in the group with HFD using Spirulina platensis algae premixes and Chlorella ( $p = 0.005$ ).

Table 2 – Animal body weight and tissue sample weight in study groups (g, M±m)

Таблица 2 – Масса тела животных и масса образцов тканей в исследуемых группах (г, M±m)

Indicator	Control group	Obesity Model (HFD Consumption)	Model of obesity by consumption of HFD with the use of premixes of the algae <i>Spirulina platensis</i> and <i>Chlorella</i>
First weight, g	225±12	226±11	224±13
Final weight, g	236±10,1	320±16,2*	296±11,8**
Weight gain, %	4,8	42,2	31,6
Weight of the liver, g	4,3±0,06	5,9±0,04***	5,2±0,03****
Time on the diet, days	84	84	84

Note: HFD – high-fat diet, \*  $p = 0.002$  (relative to the first and final weight of the control group), \*\*  $p = 0.005$  (relative to the first and final weight of the control group), \*\*\*  $p = 0.0001$  (relative to the control group), \*\*\*\*  $p = 0.001$  (relative to the control group).

Примечание: HFD – высокожировая диета, \*  $p = 0,002$  (относительно начальной и конечной массы контрольной группы), \*\*  $p = 0,005$  (относительно начальной и конечной массы контрольной группы), \*\*\*  $p = 0,0001$  (относительно контрольной группы), \*\*\*\*  $p = 0,001$  (относительно контрольной группы).

The study of the content of macro- and microelements in the organs and tissues of animals is important for understanding the mechanisms of their regulation. Analysis of the mineral composition of the organs and tissues of intact experimental animals showed that the distribution of bioelements was uneven. The results obtained for the first time represent a wide range of studied elements in more organs using a single technique.

The results of the concentration of a number of elements in the organs of rats with obesity correspond to those presented in the literature. The accumulation of Cu and Zn in the liver and other tissues of obese rats is probably associated with the expression of Zn-Cu-containing superoxide dismutases and metallothioneins and can be regarded as protection against oxidative stress. The study did not reveal an increase in the concentration of these trace elements in the pancreas of rats with obesity. After the animals consumed the premixes of algae *Spirulina platensis* and *Chlorella*, an increase in bioelements was observed: an increase in iron and chromium in the liver ( $p < 0.05$ ), normalization of the concentration of trace elements in the blood serum (relative to the obesity model), preservation of elements within physiological values (iron, zinc, copper, manganese, and selenium), and an increase in the enzymatic activity of ALT and AST in the blood, against the background of taking premixes in the group with experimental obesity ( $p = 0.005$ ). When taking premixes, the concentration of glucose and cholesterol tends to decrease. In obesity, a significant increase in creatinine, urea, glucose, and cholesterol was found in comparison with the control group of animals and the obesity model with HFD using *Spirulina platensis* algae premixes and *Chlorella* ( $p = 0.005$ ).

For the possible correction of the nutrition of people with increased body weight and the elimination of imbalances in trace elements, four recipes for

bakery products based on STB 639-95 with various types of algae are proposed:

bread infused with microalgae powder *Spirulina platensis*. Characteristics: an enriched product made from wheat flour of the highest grade, M54-28 or M54-25 (100.0 %), with the addition of pressed baking yeast (3.0 %), iodized table salt (1.5 %), butter (4.0 %), sugar (4.0 %), and microalgae powder (“*Spirulina platensis* microalgae powder”) (3.0%). Losses on bioelements are no more than 10 %;

bread with *Chlorella vulgaris* algae powder. Characteristics: an enriched product made from wheat flour of the highest grade, M54-28 or M54-25 (100.0 %), with the addition of pressed baking yeast (3.0 %), iodized table salt (1.5 %), butter (4.0 %), granulated sugar (4.0 %), and *Chlorella* microalgae powder (2.0 %). Losses on bioelements are no more than 10 %;

bread with *Fucus vesiculosus* algae powder. Brief description: an enriched product made from wheat flour of the highest grade, M54-28 or M54-25 (100.0 %), with the addition of pressed baker’s yeast (3.0 %), iodized table salt (1.5 %), butter (4.0 %), granulated sugar (4.0 %), and *Fucus* microalgae powder (*Fucus vesiculosus* microalgae powder) (2.0 %). Losses on bioelements are no more than 10 %;

bread with *Crataegus oxyacantha* fruit powder. Brief description: an enriched product made from wheat flour of the highest grade, M54-28 or M54-25 (100.0 %), with the addition of pressed baker’s yeast (3.0 %), iodized table salt (1.5 %), butter (4.0 %), granulated sugar (4.0 %), and hawthorn fruit powder (*Crataegus oxyacantha* powder) (4.0 %). Losses on bioelements are no more than 10 %. Losses on bioelements are no more than 10 %.

Evaluation of the effect of the proposed and developed new products with biologically active



additives (algae premixes) on the trace element composition requires additional research.

### Conclusion

Thus, it is shown that the concentration of trace elements in the blood differed in women and men, with different values of BMI. Overweight men are characterized by low potassium levels. Vitamin D deficiency among men and women with BMI = 25–29.9 was detected in all groups. The concentration of glucose, cholesterol and triglycerides in persons with BMI = 25–29.9 is higher ( $p = 0.01$ ).

### References

- 1 Sirot V, Traore T, Guérin T, Noël L, Bachelot M, Cravedi J.-P, Mazur A, Glorennec P, Vasseur P, Jean J. French infant total diet study: exposure to selected trace elements and associated health risks. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, vol. 120, pp. 625–633. DOI:org/10.1016/j.fct.2018.07.062.
- 2 Jomova K, Makova M, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Rhodes CJ, Valko M. Essential metals in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*, 2022, vol. 367, pp. 110173. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110173.
- 3 Ghane ET, Poormohammadi A, Khazaei S, Mehri F. Concentration of potentially toxic elements in vegetable oils and health risk assessment: a systematic review and meta-analysis. *Biological Trace Element Research*, 2022, vol.200, iss.1, pp. 437–446. DOI: 10.1007/s12011-021-02645-x.
- 4 Maret W. The quintessence of metallomics: a harbinger of a different life science based on the periodic table of the bioelements. *Metallomics*, 2022, vol. 14, iss.8, pp. mfac051. DOI: 10.1093/mtomcs/mfac051.
- 5 Baj J, Fliieger W, Teresiński G, Buszewicz G, Sitarz R, Forma A, Karakuła K, Maciejewski R. Magnesium, calcium, potassium, sodium, phosphorus, selenium, zinc, and chromium levels in alcohol use disorder: a review. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, vol. 9, iss.6, pp. 1901. DOI: 10.3390/jcm9061901.
- 6 Ali Adeeb Hussein Ali, Loseva L, Krupskaya T, Kuznetsov O. Bioelemental status of the body in overweight individuals. *Science and Innovations*. 2021, vol. 225, iss.11, pp.75–79 (in Russian).
- 7 Ali Adeeb Hussein Ali, Kuzniatsou A. The relationship between changes in bioelements, hormones, and biochemical metabolism indicators, including the identification of mechanisms for bioelemental status formation, considering BMI, gender, and nutritional characteristics. *Teikyo Medical Journal*, 2022, vol. 45, iss. 02, pp. 6261–6270.
- 8 Ali Adeeb Hussain Ali, Kuznetsov O. E. Bioelemental and biochemical status of persons with an increased body mass index. *Bulletin of Yanka Kupala Grodno State University*, 2022, vol. 12, iss. 2, pp. 148–153 (in Russian).
- 9 Ali Adeeb. Hussein Ali. Evaluation of Macro-micronutrient Intake in Overweight People in Grodno, Belarus. *Journal of Biomedicine and Biochemistry*, 2022, vol.1, iss.3, pp.70–79. DOI: 10.57238/jbb.2022.5771.1021.
- 10 Ali Adeeb Hussein Ali, Ali Hussein Demin Al-Khafaji, Mohammed Ali Al Bayati, Kuznetsov OE, Walid Theib Mohammad, Marwan Mahmood Saleh. Role of calcium/potassium coefficient in calcium-regulating hormone activity in pre-obese patients. *Eurasian Chemical Communications*. 2023, vol.5, iss.2, pp. 144–153. DOI: 10.22034/ecc.2023.363535.1532.
- 11 Ali Adeeb Hussein Ali, Kuznetsov OE, Muna Mohammed Yaseen. Correlation of Calcium/Potassium and Zinc/Copper

Cortisol showed dependence of changes on glucose concentration in individuals with BMI = 25–29.9. The concentration of TSH,  $T3_{free}$ ,  $T4_{free}$  and cortisol in men and women with BMI = 25–29.9 is higher than in individuals with BMI = 18–24.9. In the experiment with animals, it was noted that the premixes of algae *Spirulina plat.* and *Chlorella* contributed to the normalization of trace elements. The concentration of glucose and cholesterol levels, while taking premixes, decreases. Evaluation of the effect of the new products with biologically active additives (algae premixes) on the trace element composition requires additional research.

Coefficients with Bio Elements in Pre-obese Patients. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*. 2023, vol. 6, iss. 6, pp. 1394–1409. DOI: 10.26655/JMCSMCI.2023.6.19.

### Список цитированных источников

1. French infant total diet study: exposure to selected trace elements and associated health risks / V. Sirot [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2018. – Vol. 120. – P. 625–633.
2. Essential metals in health and disease / K Jomova [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2022. – Vol. 367. – P. 110173.
3. Concentration of potentially toxic elements in vegetable oils and health risk assessment: a systematic review and meta-analysis / E.T. Ghane [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2022. – Vol. 200, № 1. – P. 437–446.
4. Maret, W. The quintessence of metallomics: a harbinger of a different life science based on the periodic table of the bioelements / W. Maret // *Metallomics*. – 2022. – Vol. 14, № 8. – P. mfac051.
5. Magnesium, calcium, potassium, sodium, phosphorus, selenium, zinc, and chromium levels in alcohol use disorder: a review / J. Baj [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2020. – Vol. 9, № 6. – P. 1901.
6. Биоэлементный статус организма у лиц с избыточной массой тела / Али Адиб Хуссейн Али [и др.] // *Наука и инновации*. – 2021. – № 11. – С. 75–79.
7. Ali Adeeb Hussein Ali. The relationship between changes in bioelements, hormones, and biochemical metabolism indicators, including the identification of mechanisms for bioelemental status formation, considering BMI, gender, and nutritional characteristics / Ali Adeeb Hussein Ali, Aleh Kuzniatsou // *Teikyo Medical Journal*. – 2022. – Vol. 45, № 2. – P. 6261–6270.
8. Али Адиб Хуссейн Али. Биоэлементный и биохимический статус лиц с повышенным индексом массы тела / Али Адиб Хуссейн Али, О. Е. Кузнецов // *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы*. – 2022. – Vol. 12, № 2. – P. 148–153.
9. Ali Adeeb Hussein Ali. Evaluation of macro-micronutrient intake in overweight people in Grodno, Belarus / Ali Adeeb Hussein Ali // *Journal of Biomedicine and Biochemistry*. – 2022. – Vol. 1, № 3. – P. 70–79.
10. Role of calcium/potassium coefficient in calcium-regulating hormone activity in pre-obese patients // Ali Adeeb Hussein Ali [et al.] / *Eurasian chemical communications*. – 2023. – Vol. 5, № 2. – P. 144–153.
11. Ali Adeeb Hussein Ali. Correlation of Calcium, Potassium and Zinc. Copper Coefficients with Bio Elements in Pre-obese Patients / Ali Adeeb Hussein Ali, O. E. Kuznetsov, Muna Mohammed Yaseen // *J. Med. Chem. Sci.* – 2023. – Vol. 6, № 6. – P. 1394–1409.

# БИОЭЛЕМЕНТНЫЙ, БИОХИМИЧЕСКИЙ И ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС В НОРМЕ И ПРИ ИЗБЫТОЧНОЙ МАССЕ ТЕЛА

Али Адиб Хуссейн Али

Учреждение образования «Гродненский государственный университета им. Янки Купалы»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

**Введение.** Баланс биоэлементов обусловлен их важной ролью в процессах жизнедеятельности и определяется участием почти во всех видах обмена веществ организма.

**Цель исследования** – оценка биоэлементного, биохимического и гормонального статуса в норме и при избыточной массе тела (у лиц и в эксперименте у животных).

**Материалы и методы.** Оценка минерального, биохимического, гормонального обмена и индекса массы тела (ИМТ) у лиц (женщины: 24,3(±0,24) года; мужчины: 25,5(±0,52) года) и экспериментальных животных (крыс линии Wistar – интактные, ожирение, ожирения с приемом премиксов из водорослей *Spirulina plat.* и *Chlorella*). Материал: сыворотка крови, образцы тканей (экспериментальных животных). Исследование: биохимическое, гормональное, рентгенофлуоресцентное. Статистическая обработка – SPSS Statistica 26.0.

**Результаты.** Концентрация микроэлементов в крови различалась у женщин и мужчин, с разными значениями ИМТ. Для мужчин характерны низкие значения калия. Дефицит витамина D среди лиц с высоким ИМТ выявлен во всех группах. Концентрация глюкозы, холестерина и триглицеридов у лиц с ИМТ = 25–29,9 выше ( $p = 0,01$ ). Кортизол зависел от концентрации глюкозы (ИМТ = 25–29,9). Концентрация ТТГ, Т<sub>3</sub><sub>св.</sub>, Т<sub>4</sub><sub>св.</sub> и кортизола у лиц с ИМТ = 25–29,9 выше. Премиксы *Spirulina plat.* и *Chlorella* способствовали нормализации микроэлементов, концентрации глюкозы и холестерина.

**Заключение.** У лиц с ИМТ = 25–29,9 концентрация глюкозы, холестерина, ЛПНП и триглицеридов выше, недостаточность витамина D – 50%. Прием премиксов *Spirulina plat.* и *Chlorella* животными с ожирением не вызывал изменений содержания микроэлементов, способствовал снижению глюкозы, холестерина, триглицеридов.

**Ключевые слова:** биоэлементы, ожирение, индекс массы тела, премикс, водоросли.

**Для цитирования.** Али Адиб Хуссейн Али. Биоэлементный, биохимический и гормональный статус в норме и при избыточной массе тела / Али Адиб Хуссейн Али // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 97–104.

Поступила 29.12.2022

## ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ДВУХ ВИДОВ ПОЛЫНИ НА ПРОЦЕСС ВОСПАЛЕНИЯ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

А. Г. Шутова<sup>1</sup>, А. В. Башилов<sup>1</sup>, И. П. Жаворонок<sup>2</sup>, А. А. Басалай<sup>2</sup>,  
П. С. Шабуня<sup>3</sup>, С. А. Фатыхова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup>Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

**Введение.** Полынь однолетняя (*Artemisia annua*) и полынь обыкновенная (*Artemisia vulgaris*) известны своими лекарственными свойствами, которые связывают с их составом. Один из перспективных способов получения фармсырья - биотехнология «бородатых» корней, однако выделенные из трансформированных растений субстанции должны быть исследованы на состав и активность.

**Цель исследования** – оценка состава фенольных соединений в экстрактах трансформированных корней, полученных с помощью ультразвуковой обработки, и выявление противовоспалительного действия экстрактов в эксперименте у животных.

**Материалы и методы.** Содержание фенольных соединений и экстрактивных веществ проводилось по общепринятым методикам. Исследование противовоспалительной активности выполнено на крысах самцах Wistar.

**Результаты.** С помощью ультразвуковой обработки получены экстракты трансформированных корней. Определены состав и содержание фенольных соединений. Проведены испытания на лабораторных животных с экспериментальным системным воспалительным процессом.

**Заключение.** Ультразвуковая экстракция трансформированных корней была эффективной для извлечения фенольных соединений. Проведенное исследование действия экстрактов на глубокую температуру тела у крыс в норме и при системном воспалении позволило заключить, что биологически активные вещества полыни оказывают модулирующее действие на терморегуляторные реакции.

**Ключевые слова:** *Artemisia annua*, *Artemisia vulgaris*, ультразвуковая экстракция, противовоспалительная активность.

**Для цитирования.** Влияние экстрактов двух видов полыни на процесс воспаления у экспериментальных животных / А. Г. Шутова [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 105–110.

### Введение

Полынь однолетняя (*Artemisia annua* L.) и полынь обыкновенная (*Artemisia vulgaris* L.) известны своими лекарственными свойствами [1, 2, 3].

Метод «бородатых» корней считается в настоящее время одним из наиболее эффективных в биотехнологии растений для синтеза, накопления и регуляции производства вторичных метаболитов благодаря их способности к быстрому росту без использования фитогормонов и необходимости длительного культивирования [4]. По этой причине актуальным является создание активных фармацевтических ингредиентов на основе биотехнологии «бородатых» корней полыни, получаемых путем трансформации растений с помощью фитопатогенных бактерий *Agrobacterium rhizogenes*. Однако полученные из трансформированных корней субстанции должны быть исследованы на состав и активность метаболитов.

Для повышения эффективности извлечения биологически активных соединений из растительного сырья используются различные методы, описанные в литературе [5–7]. В статье [5] на основе систематического исследования эффективности извлечения девяти биологически активных соединений полыни было обнаружено, что метод ультразвуковой обработки может значительно повысить эффективность экстракции флавоноидов и гидроксикоричных кислот *Artemisiae argyi* при нагреве до +60 °С. Следовательно, для извлечения биологически активных вещества из трансформированных корней полыни нами была применена ультразвуковая экстракция при повышенной температуре.

Целью работы были оценка состава фенольных соединений в экстрактах трансформированных корней *Artemisia annua* и *A. vulgaris*, полученных с помощью ультразвуковой обработки, и выявление

ние противовоспалительного действия экстрактов в эксперименте у животных.

### Материалы и методы

В работе использовались трансформированные корни *A. annua* и *A. vulgaris*, выращенные в лаборатории адаптационной биотехнологии Института клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, предоставленные для исследования в рамках совместного международного проекта № Б21УКРГ-005.

Ультразвуковая обработка проводилась с помощью лабораторной установки Vandelin SONOPULS HD 2070 на максимальной мощности, при нагревании до +60 °С в течение 45 мин. Общее содержание фенольных соединений определяли по методу Фолин-Чокальтеу [8], содержание экстрактивных веществ – по Государственной Фармакопее Республики Беларусь [9]. Для ВЭЖХ анализа был использован хроматограф Agilent 1200 с диодно-матричным детектором и масс-селективным детектором Agilent QQQ 6410. Разделение компонентов проб проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1×150 мм; 1,8 мкм) при температуре +40 °С. Температура в автосамплере составляла +12 °С, объем инъекции – 2 мкл. Детекция – при длине волны 330 нм.

Для исследования противовоспалительной активности экстракты на роторном испарителе избавляли от этилового спирта и проводили испытания на лабораторных животных с экспериментальным системным воспалительным процессом. Исследование выполнено на крысах-самцах стока Wistar, одного возраста, массой 250–270 г.

Все работы с экспериментальными животными выполнены с соблюдением законодательства, принципов биоэтики и в соответствии с международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных («Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей»; Страсбург, 1986–1998) [10].

В ходе эксперимента боксы с животными помещали в термокамеру, температуру которой постоянно поддерживали на уровне +29,5...+30,0 °С, что соответствовало диапазону термонейтральности для крыс [11]. Соответствие температуры в термокамере условию термонейтральности контролировали с помощью медь-константановых термопар расположенных в полости камеры и на коже основания хвоста крыс [11, 12]. Регистрацию глубокой и кожной температуры тела проводили с помощью аппаратно-программного комплекса Pico (Pico, UK). Указанные параметры регистрировали каждые 5 мин в течение 20 мин до инъекции

веществ и в течение 260 мин после проведенных манипуляций [11].

Для моделирования лихорадочного ответа в эксперименте использовали липополисахарид *Escherichia coli*. Лихорадка, вызванная внутрибрюшинным или внутривенным введением липополисахарида *E.coli* в дозе 10–100 мкг/кг (в зависимости от способа введения – внутривенно или внутрибрюшинно), характеризуется полифазностью [13]. Первые три фазы лихорадочного ответа идентифицированы, их температурные пики в среднем приходятся на 60-ю, 120-ю и 300-ю минуты после инъекции липополисахарида *E.coli* [13]. Для исследования были использованы образцы экстрактов трансформированных корней полыни однолетней и полыни обыкновенной в форме суспензий для введения субстанций *per os*. Исследование проводили слепым методом.

Анализ данных выполняли с использованием программ Origin 7.0 и STATISTICA 10 с определением среднего арифметического значения и его стандартной ошибки  $M \pm m$ . Проверку на нормальность распределения количественных показателей осуществляли с помощью программы STATISTICA 10 по критерию Шапиро-Уилка. Сравнительный анализ количественных данных проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса. Вывод о статистической значимости делали при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Экстракты трансформированных корней полыни были проанализированы методом жидкостной хроматографии с масс-селективным и диодно-матричным детекторами. В экстракте полыни однолетней удалось идентифицировать 8 соединений. Оказалось, что основными компонентами экстракта полыни однолетней являются кофеилхиновые кислоты и производные кофеиновой кислоты (таблица 1).

В экстракте полыни однолетней преобладала хлорогеновая кислота, количество которой составило около 6 % от содержания экстрактивных веществ. Общее количество идентифицированных соединений составило 35,4 % от количества экстрактивных веществ, тогда как определенное методом Фолина-Чокальтеу общее количество фенольных соединений было выше и составило около 96 %. В экстракте трансформированных корней полыни обыкновенной так же было идентифицировано 8 соединений. Сумма идентифицированных методом ВЭЖХ соединений составила около 56 % от содержания экстрактивных веществ. В экстракте полыни обыкновенной так же, как в экстракте полыни однолетней, присутствовала хлорогеновая кислота, однако в большем количестве присутствовали дикофеоилхиновые кислоты.

Таблица 1 – Содержание индивидуальных фенольных соединений в экстрактах

Table 1 – Content of individual phenolic compounds in extracts

Соединение	Содержание фенольных соединений, г/100 массы корней	
	<i>Artemisia annua</i>	<i>Artemisia vulgaris</i>
Кофеилхинная кислота 1*	0,07	0,04
Хлорогеновая кислота*	0,11	0,14
Кофеилхинная кислота 2*	0,07	0,05
Эфир двух хинных кислот и кофейной кислоты или ацетилированный эфир трех кофейных кислот	0,07	–
Дикофеилхинная кислота 1	0,08	–
Дикофеилхинная кислота 2	0,08	0,50
Дикофеилхинная кислота 3	0,09	0,22
Дикофеилхинная кислота 4	0,08	
Трикофеилхинная кислота 2	–	0,04
Производное кофейной кислоты и артаноевой кислоты	–	0,09
Сумма идентифицированных соединений	0,66	1,25
Содержание фенольных соединений по Фолину-Чокальтеу	1,79	2,20
Содержание экстрактивных веществ	1,87	2,23

Примечание: \* помеченные вещества обсчитывались по калибровке для хлорогеновой кислоты, все остальные – для кофейной кислоты.

Note: \* the marked substances were calculated by calibration for chlorogenic acid, all others – for caffeic acid.

Далее были проведены испытания на лабораторных животных с экспериментальным системным воспалительным процессом. Согласно полученным данным, в группе контрольных животных, которым внутривенно вводили апирогенный изотонический раствор хлорида натрия (0,9 %) не было установлено достоверных изменений глубокой температуры тела ( $T_{гт}$ ) и разницы температур ( $\delta$ , °C) на протяжении всего времени регистрации (рисунок 1).

$T_{гт}$  экспериментальных животных контрольной группы варьировала в диапазоне  $+37,88(\pm 0,14)$  °C, что не выходило за пределы значений нормы для крыс (см. рисунок 1).

При регистрации температуры тела у животных, которым интрагастрально вводили экстракт полыни однолетней, достоверных изменений температурного паттерна отмечено не было. Показатели температуры тела крыс в течение эксперимента фиксировали в пределах  $\delta \pm 0,32$  °C, что соответствовало нормальным показателям температуры у животных

и не имело достоверных отличий от фоновых значений и значений температуры у животных контрольной группы (см. рисунок 1).

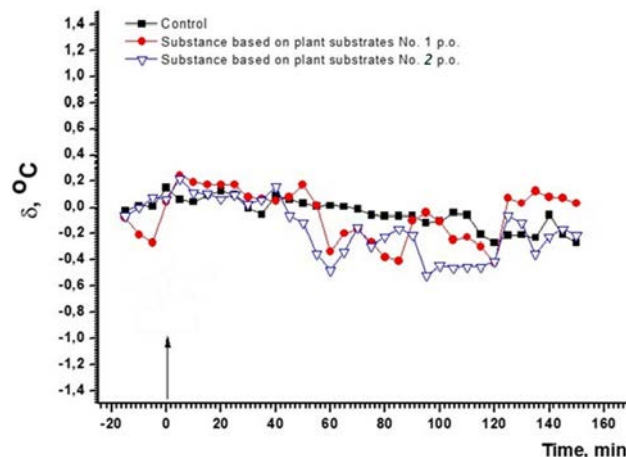


Рисунок 1 – Изменение разницы температур ( $\delta$ , °C) у здоровых животных до и после интрагастрального введения субстанций на основе растительных экстрактов *Artemisia annua* (№1) и *A. vulgaris* (№2) (сплошной стрелкой указано время введения исследуемых веществ); \* $p < 0,05$

Figure 1 – Change in temperature difference ( $\delta$ , °C) in healthy animals before and after intragastric administration of substances based on plant extracts *Artemisia annua* (№1) and *A. vulgaris* (№2) (solid arrow indicates the time of administration of the test substances); \* $p < 0,05$

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что интрагастральное введение субстанций на основе растительных экстрактов у здоровых экспериментальных животных не вызывает изменений температурного паттерна.

Внутривенное введение липосахаридов *E. coli* в дозе 50 мкг/кг экспериментальным животным вызывало развитие полифазного фебрильного ответа (рисунок 2).

Пик I фазы наблюдали через 10 мин после инъекции липополисахарида *E. coli*, отмечали достоверный ( $p < 0,05$ ) подъем (в среднем на  $0,85$  °C по сравнению с фоновыми значениями) глубокой температуры тела ( $T_{гт(I)}$ ) до  $+38,55(\pm 0,08)$  °C.

Пик II фазы регистрировали на 160-й минуте мониторинга: увеличение  $T_{гт(II)}$  до  $+38,57(\pm 0,23)$  °C (в среднем на  $0,88$  °C по сравнению с фоновыми значениями) ( $p < 0,05$ ) (см. рисунок 2).

Мониторинг глубокой температуры тела крыс, получавших внутривенно экстракт трансформированных корней полыни однолетней и через 40 мин – внутривенно липополисахарид *E. coli* в дозе 50 мкг/кг показал, что исследуемое вещество не оказывало выраженного действия на первую

фазу фебрильного ответа (регистрировали подъем температуры в среднем на 0,58 °С по сравнению с фоновыми значениями). Период второй фазы лихорадочного ответа по временным и температурным изменениям был ослаблен, после чего температура тела экспериментальных животных возвращалась к нормальным значениям (см. рисунок 2).

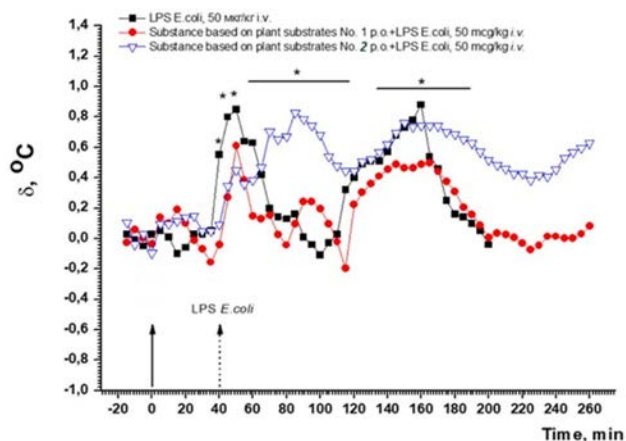


Рисунок 2 – Изменение разницы температур ( $\delta$ , °C) у крыс, вызванные интрагастральным введением субстанций на основе растительных экстрактов *Artemisia annua* (№ 1) и *A. vulgaris* (№ 2) с последующим внутривенным введением LPS *E. coli* (сплошной стрелкой указано время введения исследуемых веществ; пунктирной стрелкой – время введения ЛПС *E. coli*); \* $p < 0,05$

Figure 2 – Change in temperature difference ( $\delta$ , °C) in rats caused by intragastric administration of substances based on plant extracts *Artemisia annua* (№ 1) и *A. vulgaris* (№ 2) followed by intravenous administration of LPS *E. coli* (solid arrow indicates the time of administration of the test substances; dashed arrow indicates the time of administration of LPS *E. coli*); \* $p < 0,05$

Внутрижелудочное введение экстракта трансформированных корней полыни обыкновенной

и через 40 мин – внутривенное введение липополисахарида *E. coli* в дозе 50 мкг/кг не оказывало модулирующего эффекта температурного паттерна. Периоды первой и второй фаз лихорадочного ответа по временным и температурным изменениям были схожи с таковыми у животных, которым вводили только липосахарид (см. рисунок 2).

## Заключение

Ультразвуковая экстракция трансформированных корней полыни однолетней и полыни обыкновенной была эффективной для извлечения фенольных соединений. В полученных экстрактах определено 8 соединений, в основном идентифицированы кофейлихиновые кислоты и производные кофейной кислоты.

Проведенное исследование действия экстрактов полыни на глубокую температуру тела у крыс в норме и при системном воспалении позволяет заключить, что экстракты трансформированных корней оказывают модулирующее действие на терморегуляторные реакции.

Полученные в ходе экспериментов данные указывают на отсутствие выраженных изменений температурных паттернов у здоровых животных, интрагастрально получавших исследуемые субстанции.

Внутрижелудочное введение экстракта трансформированных корней полыни однолетней за 40 мин до системного введения липополисахарида *E. coli* вызывает изменения паттерна фебрильного ответа, а именно – ослабляет выраженность II фазы лихорадки.

Внутрижелудочное введение экстракта трансформированных корней полыни обыкновенной за 40 мин до системного введения липополисахарида *E. coli* не вызывает изменений в развитии фебрильной реакции.

## Благодарности

Работа выполнена в рамках международного проекта № Б21УКРГ-005.

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук Надежде Анатольевне Матвеевой за предоставленные для исследований культуры трансформированных корней полыни.

## Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the international project N B21UKRG-005.

The authors are grateful to N. A. Matveeva, Doctor of Biological Sciences, for providing the culture of transformed roots for research.

## Список цитированных источников

1. Significance of *Artemisia vulgaris* L. (Common Mugwort) in the History of Medicine and Its Possible Contemporary Applications Substantiated by Phytochemical and Pharmacological Studies / Н. Ekiert [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 19. – P. 4415.
2. Towards a better understanding of *Artemisia vulgaris*: Botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential / R. Abiri [et al.] // *Food research international*. – 2018. – Vol. 109. – P. 403–415.
3. Therapeutic potential of *Artemisia vulgaris*: An insight into underlying immunological mechanisms / L. Soon [et al.] // *Journal of environmental pathology, toxicology and*

oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer. – 2019. – Vol. 38, №3. – P. 205–216.

4. Носов, А. М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения / А. М. Носов // Биотехнология. – 2010. – №5. – С. 8–28.
5. Study of the Variation of Phenolic Acid and Flavonoid Content from Fresh *Artemisia argyi* Folium to Moxa Wool / M. Li [et al.] // *Molecules*. – 2019. – №24. – P. 4603.
6. Федосеева, Л. М. Установление оптимальных условий экстракции листьев лопуха большого с использованием методов математического планирования / Л. М. Федосеева, О. А. Ковалев, М. А. Биндюк // *Химия растительного сырья*. – 2011. – №4. – С. 273–276.
7. Митрофанова, И. Ю. Влияние технологических факторов на эффективность экстрагирования флавоноидов из травы девясила британского (*Inula britannica* L.) / И. Ю. Митрофанова, А. В. Яницкая, В. В. Гукасова // *Актуальные проблемы медицины*. – 2014. – №4 (175).
8. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds / M. Ikawa, T. D. Schaper, C. A. Dollard, J. J. Sasner // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – Vol. 51. – P. 1811–1815.
9. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 2 т. – Минск, 2012. – Т. 1. – С. 201.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
11. Romanovsky, A. A. Selected Contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality / A. A. Romanovsky, A. I. Ivanov, Y. P. Shimansky // *J. App. Physiol.* – 2002. – Vol. 92. – P. 2667–2679.
12. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry / J. Mei [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 3526.
13. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature / A. Y. Rudaya [et al.] // *American J. of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2005. – Vol. 289. – P. R1244–R1252.

## References

1. Ekiert H, Pajor J, Klin P, Rzepiela A, Ślesak H, Szopa A. Significance of *Artemisia Vulgaris* L. (Common Mugwort) in the History of Medicine and Its Possible Contemporary Applications Substantiated by Phytochemical and Pharmacological Studies. *Molecules*. 2020 Sep 25;25(19):4415. DOI: 10.3390/molecules25194415.
2. Abiri R, Silva ALM, de Mesquita LSS, de Mesquita JWC, Atabaki N, de Almeida EB Jr, Shaharuddin NA, Malik S.

Towards a better understanding of *Artemisia vulgaris*: Botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential. *Food Res Int*. 2018 Jul;109:403-415. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.03.072.

3. Soon L, Ng PQ, Chellian J, Madheswaran T, Panneerselvam J, Gupta G, Nammi S, Hansbro NG, Hsu A, Dureja H, Mehta M, Satija S, Hansbro PM, Dua K, Collet T, Chellappan DK. Therapeutic potential of *Artemisia vulgaris*: An insight into underlying immunological mechanisms. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*. 2019;38(3):205–216. DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2019029397.
4. Nosov AM. Ispolzovanie kletochnykh tekhnologii dlya promyshlennogo polucheniya biologicheskii aktivnykh veshchestv rastitelnogo proiskhozhdeniya. *Biotekhnologiya*, 2010, no. 5, pp. 8–28.
5. Li M, Chai X, Wang L, Yang J, Wang Y. Study of the Variation of Phenolic Acid and Flavonoid Content from Fresh *Artemisia argyi* Folium to Moxa Wool. *Molecules*. 2019 Dec 16;24(24):4603. DOI: 10.3390/molecules24244603.
6. Fedoseeva LM. Ustanovlenie optimalnykh uslovii ekstraktsii listev lopukha bolshogo s ispolzovaniem metodov matematicheskogo planirovaniya. *Khimiya rastitelnogo syr'ya*, 2011, no. 4, pp. 273–276.
7. Mitrofanova IYu, Yanitskaya AV, Gukasova VV. Vliyanie tekhnologicheskikh faktorov na effektivnost ekstragirovaniya flavonoidov iz travy devyasila britanskogo (*Inula britannica* L.). *Aktualnye problemy meditsiny*, 2014, no. 4 (175).
8. Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food. Chem*, 2003 Mar 26;51(7):1811-5. DOI: 10.1021/jf021099r. PMID: 12643635.
9. Gosudarstvennaya farmakopeya Respubliki Belarus: v 2 tomakh, Minsk, 2012. T.1, pp. 201.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986, Strasbourg, 1986, 52 p.
11. Romanovsky AA, Ivanov AI, Shimansky YP. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2002 Jun;92(6):2667-79. DOI: 10.1152/jappphysiol.01173.2001.
12. Mei J, Riedel N, Grittner U, Endres M, Banneke S, Emmrich JV. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. *Sci. Rep.* 2018 Feb 23;8(1):3526. DOI: 10.1038/s41598-018-22020-6.
13. Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005 Nov; 289(5): R1244-52. DOI: 10.1152/ajpregu.00370.2005.

# INFLUENCE OF EXTRACTS OF TWO SPECIES OF WORMWOOD ON THE PROCESS OF INFLAMMATION IN EXPERIMENTAL ANIMALS

---

H. Shutava<sup>1</sup>, A. Bashilov<sup>1</sup>, I. Zhavoronok<sup>2</sup>, A. Basalai<sup>2</sup>, P. Shabunya<sup>3</sup>, S. Fatykhova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus;

<sup>2</sup>Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus;

<sup>3</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus

**Introduction.** *Artemisia annua* and *Artemisia vulgaris* are known for their medicinal properties, which are associated with their composition. One of the promising ways to obtain pharmaceutical raw materials is the biotechnology of “hairy” roots, however, the substances obtained from transformed plants should be examined for the composition and activity.

**Objective** – to evaluate the composition of phenolic compounds in the extracts of the transformed roots, obtained using ultrasonic treatment, and to identify the anti-inflammatory effect of the extracts in the experiment in animals.

**Materials and methods.** The content of phenolic compounds and extractives was carried out according to generally accepted methods. The study of anti-inflammatory activity was performed on male Wistar rats.

**Results.** Using ultrasonic treatment, extracts of transformed roots were obtained. The composition and content of phenolic compounds were determined. Tests were carried out on laboratory animals with an experimental systemic inflammatory process.

**Conclusions.** Ultrasonic extraction of transformed roots was effective in extracting phenolic compounds. The study of the effect of extracts on deep body temperature in rats in normal conditions and with systemic inflammation led to the conclusion that the biologically active substances of wormwood have a modulating effect on thermoregulatory reactions.

**Keywords:** *Artemisia annua*, *Artemisia vulgaris*, ultrasonic extraction, anti-inflammatory activity.

**For citation:** Shutava H, Bashilov A, Zhavoronok I, Basalai A, Shabunya P, Fatykhova S. Influence of extracts of two species of wormwood on the process of inflammation in experimental animals. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 105–110 (in Russian).

Поступила 29.08.2022



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКДИЗОНА В КАЧЕСТВЕ АНАБОЛИЧЕСКОГО СРЕДСТВА В СПОРТЕ: АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРЫ И РАСЧЕТЫ *IN SILICO*

В. С. Карпушенкова<sup>1</sup>, А. П. Столярчук<sup>1</sup>, Я. В. Фалетров<sup>1,2</sup>, И. И. Бойко<sup>1</sup>, В. М. Шкуматов<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Учреждение Белорусского государственного университета  
«Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Введение.** Экдизон и другие экдистероиды являются гормонами насекомых, однако могут ли они оказывать действие на клетки человека, взаимодействуя с рецепторами стероидных гормонов, является предметом дискуссий.

**Цель исследования** – провести *in silico* расчеты связывания экдизона с рецепторами стероидных гормонов с помощью докинга.

**Материалы и методы.** В работе использовали программное обеспечение Autodock Vina и FYTdock для моделирования, а также OriginPro для статистической обработки.

**Результаты.** При помощи расчетов *in silico* выявлено, что лучше всего экдизон связывается с глюкокортикоидными рецепторами; статистический анализ показал меньшую аффинность его связывания с андрогеновыми и эстрогеновыми рецепторами в сравнении с тестостероном и эстрадиолом.

**Заключение.** Анализ полученных результатов не позволяет сделать выводы об эффективности связывания экдизона с рецепторами стероидных гормонов, отвечающих за анаболический эффект, но показана высокая аффинность по отношению к глюкокортикоидным рецепторам. Постулируется необходимость дальнейших расчетно-теоретических и экспериментальных исследований для выявления молекулярных основ действия экдизона на организм человека и принципиальной возможности его использования как анаболического средства.

**Ключевые слова:** экдистероиды, анаболические средства, докинг.

**Для цитирования.** Использование экдизона в качестве анаболического средства в спорте: анализ литературы и расчеты *in silico* / В. С. Карпушенкова [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 111–115.

### Введение

Среди специализированных биологически активных добавок к пище (БАД) встречается продукция, содержащая экдистероиды, в описании которых отмечаются анаболические эффекты. Некоторые фирмы позиционируют экдизон на рынке как средство для набора мышечной массы. Производители таких БАД описывают следующие эффекты экдистероидов: анаболический – синтез сократительных белков мышечных клеток, антикатаболический – предотвращение распада белка, метаболический – ускорение сжигания жиров, влияние на углеводный обмен – снижение сахара в крови, ускорение компенсации гликогена после тренировки. Помимо того, по их словам, экдизон мягко стимулирует синтез гормона роста в гипофизе и повышает уровень свободного тестостеро-

на за счет его высвобождения из связи с SHBG (глобулин, связывающий половые гормоны), прием препарата ведет к росту выносливости и силовых показателей, укреплению связок, суставов и сухожилий, а также экдизон способствует перераспределению нутриентов в организме. Обещается, что добавка повышает адаптационные способности организма: нормализуются показатели липидного обмена, снижается уровень холестерина и сахара в крови, улучшается работа печени, сердца, сосудов (см., например, [https://eviro-sport.by/catalog/povyshenie-testosterona/westpharm\\_test/861/](https://eviro-sport.by/catalog/povyshenie-testosterona/westpharm_test/861/)).

В научной литературе есть данные, что анаболический эффект экдистероидов может быть опосредован его связыванием с эстрогеновым рецептором (ER) [1, 2]. Показано, что экдистерон может оказывать сильный гипертрофиче-

ский эффект на волокна камбаловидной мышцы крысы, превышающий таковой для метандиена, эстрадиена и селективного модулятора андрогеновых рецепторов (SARM) S-1; эксперименты по молекулярному докингу подтвердили опосредованное ER $\beta$  действие экистерона [1]. Важно отметить, что за анаболические фармакологические эффекты таких БАД также могут быть ответственны не только экистероиды, но и полигидроксилированные стероиды типа брасиностероидов и витаферин А растений [3]. В научной работе [4] показано, что экизон проявляет аффинность к минералокортикоидным рецепторам, отрицательно действуя на работу почек, а в работе [5] проводили исследование влияния экизона на различные клетки млекопитающих. По данным всемирного антидопингового агентства WADA, в качестве допингового анаболического средства в соревновательный и внесоревновательный период аналог экизона – экистерон – был запрещен к применению только в 2022 [6].

Таким образом, согласно нашим данным, существует достаточно небольшое число научных публикаций, которые в деталях и достоверно описывают перечень и механизмы реализации анаболического и других фармакологических эффектов экизона на организм человека, эффективность его действия в качестве анаболика и безопасность применения. С другой стороны, структуры большинства рецепторов стероидных гормонов и других белков, доказанно способных опосредовать анаболический эффект, определены и присутствуют в свободном доступе (база данных PDB: <https://www.rcsb.org/>).

Следовательно, современный метод расчетов *in silico*, известный как молекулярный докинг (моделирование взаимодействия низкомолекулярных веществ с белками), может быть применен для расчетно-теоретического глобального анализа возможности взаимодействия экистероидов со стероидными рецепторами; программа FYTdock для организации и анализа результатов докинга [8], осуществляемого при помощи программы Autodock Vina [9], является эффективным инструментом для проведения такого анализа.

Цель исследования – провести *in silico* молекулярный докинг экизона с множеством структур андрогеновых, эстрогеновых и глюкокортикоидных рецепторов и статистическую обработку результатов.

## Материалы и методы

Докинг проводили с использованием программы Autodock Vina [9]; процесс докинга в режиме обратного виртуального скрининга и анализ результатов проводили при помощи программы-помощника FYTdock [8]. Файлы трехмерных структур белков были взяты из базы данных PDB. Оценивали параметр аффинности – автоматически рассчитываемую Autodock Vina энергию связывания ( $E_{св}$ , ккал/моль). При помощи оригинальной программы FYTdock организовывали расчеты и генерировали информацию об аминокислотном окружении (в таблицах указываются только 16 остатков или меньше). Статистический анализ проведен по значениям рассчитываемых величин энергий связывания с использованием программы Origin 2018.

## Результаты и их обсуждение

Для *in silico* исследования биологической активности экизона был проведен докинг для выборки из 580 структур белков, отобранных из базы данных PDB. В качестве лигандов были взяты экизон, а также стероидные гормоны человека тестостерон и эстрадиол для контроля (рисунок 1).

Полученные в результате докинга значения  $E_{св}$  для каждого типа рецептора и лиганда были проанализированы с применением методов математической статистики, что представлено в таблице 1 и на рисунке 2.

Представленные результаты свидетельствуют в пользу того, что экизон хуже связывается с андрогеновыми и эстрогеновыми рецепторами в сравнении с эстрадиолом и тестостероном (величины  $E_{св}$  для взаимодействий экизона больше таковых для стероидных гормонов). Эстрадиол и тестостерон взяты как контрольные лиганды, связывающиеся со своими природными мишенями: эстрадиол – с эстрогеновыми рецепторами, тестостерон – с андрогеновыми. Согласно WADA, тестостерон официально признан допинговым средством с анаболическим эффектом [6]. Для некоторых структур эстрогеновых рецепторов

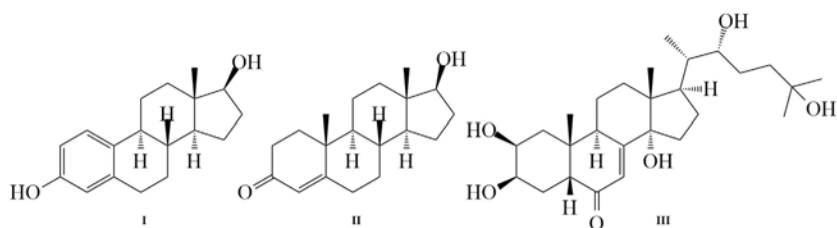


Рисунок 1 – Структуры эстрадиола (I), тестостерона (II), экизона (III) и гидрокортизона (IV)

Figure 1 – Structures for estradiol (I), testosterone (II), ecdysone (III) and hydrocortisone (IV)

Таблица 1 – Данные, полученные в ходе статистической обработки значений энергий связывания (ккал/моль) лигандов с рецепторами

Table 1 – Data obtained during statistical processing of values of binding energies (kcal/mol) of ligands with receptors

Рецептор (число структур)	Лиганд	Среднее	Максимум	Минимум	Медианное
Андрогеновый (80)	эkdизон	-7,5	-6,8	-8,8	-7,5
	эстрон	-9,1	-6,9	-11,2	-9,05
	тестостерон	-9,1	-6,8	<b>-11,2</b>	-8,9
	гидро-кортизон	-7,1	-6,3	-10,8	-6,9
Эстрогеновый (356)	эkdизон	-7,2	-4,6	-10,1	-7,1
	эстрон	-9,6	-4,3	<b>-11,9</b>	-9,9
	тестостерон	-9,6	-4,3	-11,9	-9,9
	гидро-кортизон	-7,5	-4,7	-10,0	-7,2
Глюкокортикоидный (47)	эkdизон	-7,3	-6,0	-10,2	-7,5
	эстрон	-8,2	-6,2	-11,0	-7,4
	тестостерон	-8,1	-6,2	-10,9	-7,6
	гидро-кортизон	-7,7	-6,2	<b>-11,5</b>	-7,0

Примечание: жирным выделено значение для соответствующей пары гормон-рецептор.

Note: the value for the corresponding hormone-receptor pair is highlighted in bold.

наблюдаются случаи сравнимо хороших значений  $E_{св}$  для эkdизона – они достигают значений таковых для эстрадиола, однако статистический анализ показывает, что такие значения составляют малую часть выборки. Важно отметить, что для структур андрогеновых рецепторов получено широкое распределение значений  $E_{св}$  в случае тестостерона, что делает затруднительным корректное сравнение эф-

фективности связывания его и эkdизона. Исходя из минимальных значений  $E_{св}$ , эkdизон лучше взаимодействует с глюкокортикоидными рецепторами, чем с андрогеновыми. Это указывает на риск развития состояний, опосредуемых активацией глюкокортикоидных рецепторов (отечность, усиление катаболизма белков) [9], что может привести к нивелированию преимуществ анаболического эффек-

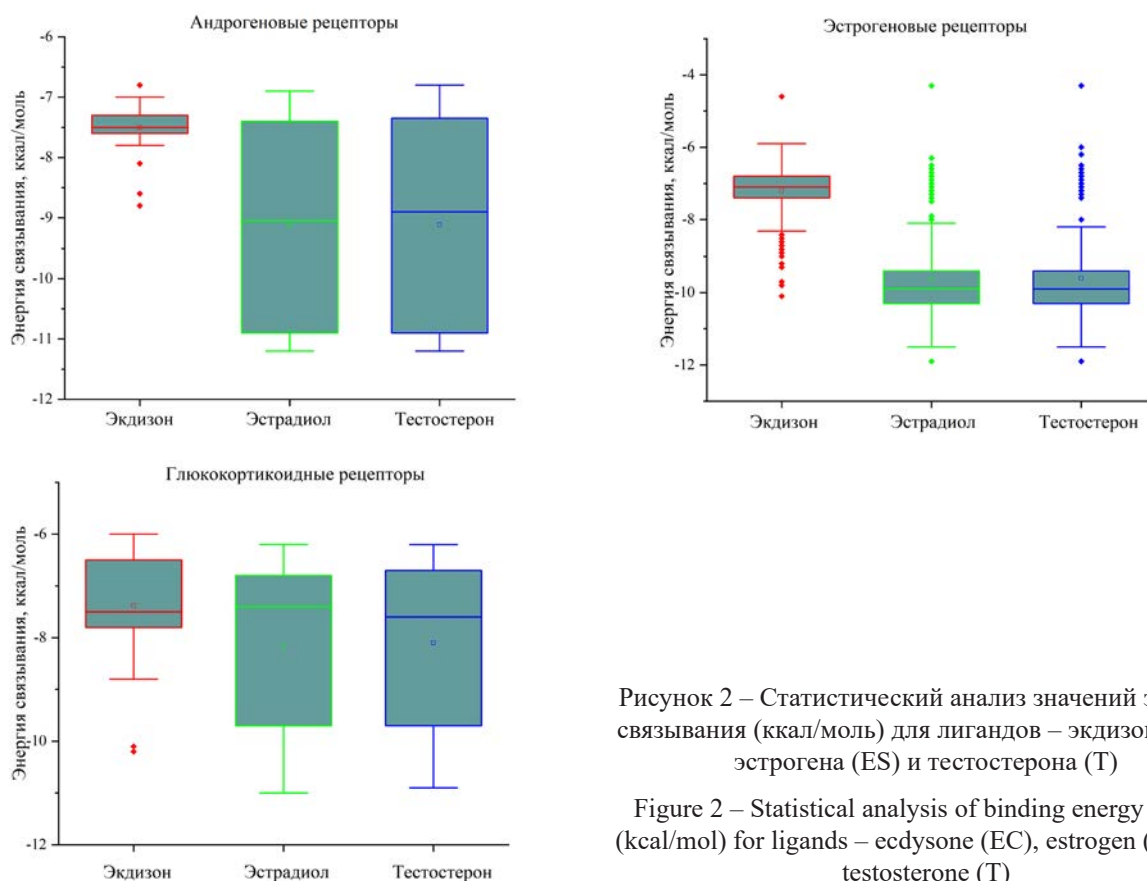


Рисунок 2 – Статистический анализ значений энергий связывания (ккал/моль) для лигандов – эkdизона (EC), эстрогена (ES) и тестостерона (T)

Figure 2 – Statistical analysis of binding energy values (kcal/mol) for ligands – ecdysone (EC), estrogen (ES) and testosterone (T)

та вследствие активации эстрогеновых рецепторов. Согласно нашим данным, впервые на уровне *in silico* показана возможность экидизона связываться с глюкокортикоидными рецепторами, хотя для 20-Hydroxyecdysone было экспериментально показано нивелирование резорбции костной ткани, вызываемой глюкокортикоидами [10].

### Заключение

Данные научной литературы показывают возможность эффективного взаимодействия экидистероидов с эстрогеновыми и минералокортикоидными рецепторами. На данный момент не найдено информации о включении экидизона в список допинговых анаболических средств WADA, хотя его производное – экидистерон – включен в него в 2022 г. Возможность реализации анаболического эффекта экидизона связывают с его взаимодействием с эстрогеновыми рецепторами. Проведенное нами расчетно-теоретическое исследование взаимодействия экидизона с андрогеновыми, эстрогеновыми и глюкокортикоидными рецепторами с привлечением методов статистики показало, что:

1) экидизон способен связываться с андрогеновыми и эстрогеновыми рецепторами, однако аф-

финность его связывания согласно средним величинам  $E_{cb}$  значительно хуже таковой для их природных лигандов – тестостерона и эстрадиола соответственно;

2) среди указанных белков экидизон проявил большую аффинность к глюкокортикоидным рецепторам согласно минимальным значениям  $E_{cb}$  для отдельных структур. Развитие состояний, опосредуемых активацией глюкокортикоидных рецепторов (отечность, усиление катаболизма белков), приведет к нивелированию преимуществ усиления активации эстрогенового рецептора, способного опосредовать анаболические эффекты. Принимая во внимание возможность реализации анаболического и других эффектов экидизона на организм человека через реализацию взаимодействий с другими белками-мишенями, например, ферментами биосинтеза стероидов, постулируется необходимость дальнейших расчетно-теоретических и экспериментальных исследований взаимодействия экидизона с белками человека. На данный момент наши расчетно-теоретические данные не подтверждают возможность его использования как эффективного и безопасного анаболического средства.

### Благодарности

Работа проведена при поддержке грантов ГПНИ № г.р. 20210560 (Я. В. Фалетров, В. М. Шкуматов).

### Acknowledgements

The study has been funded by the State Scientific Research Program №20210560 (Y. V. Faletrov, V. M. Shkumatov).

### Список цитированных источников

1. Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents? / M. Parr [et al.] // *Biology of Sport*. – 2014. – Vol. 32. – P.169–173. DOI:10.5604/20831862.1144420.
2. Anabolic Effect of Ecdysterone Results in Hypertrophy of C2C12 Myotubes by an Estrogen Receptor Mediated Pathway / O. Haupt [et al.] // *Recent advances in doping analysis*. – 2012. – Vol. 20. – P. 221–225.
3. Ecdysteroids / R. Lafont [et al.] // *Encyclopedia*. – 2021. – Vol. 1. – P. 1267–1302. DOI:10.3390/encyclopedia1040096.
4. Activation of Mineralocorticoid Receptor by Ecdysone, an Adaptogenic and Anabolic Ecdysteroid, Promotes Glomerular Injury and Proteinuria Involving Overactive GSK3 $\beta$  Pathway Signaling / L. Minglei [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 12225. DOI:10.1038/s41598-018-29483-7.
5. Richards, R. C. Alteration of the Growth of Mammalian Cells in vitro by Ecdysone Extract // *Nature*. – 1961. – Vol. 189. – P. 666–668.
6. Prohibited List 2023: RUSADA for clean and fair sport! [Electronic resource]. Moscow: World Anti-Doping Agency. – Mode of access: <https://rusada.ru/en/substances/prohibited-list/>. – Date of access: 08.11.2022.
7. Application of docking-based inverse high throughput virtual screening to found phytochemical covalent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease, NSP12 and NSP16 / Y. V. Faletrov [et al.] // *Research Square*. – 2022. (Mar 31). DOI:10.21203/rs.3.rs-1456627/v1.

8. Trott, O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / O. Trott, A. J. Olson // *J. Comp. Chem.* – 2010. – Vol. 31. – P. 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
9. Braun, Th. P. The Regulation of Muscle Mass by Endogenous Glucocorticoids / Th. P. Braun, D. L. Marks // *Frontiers in Physiology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1–12. DOI:10.3389/fphys.2015.00012.
10. Prevention of glucocorticoid induced bone changes with beta-ecdysone / W. Dai [et al.] // *Bone*. – 2015. – Vol. 74. – P. 48–57. DOI:10.1016/j.bone.2015.01.001.

### References

1. Parr M, Botrè F, Naß A, Hengevoß J, Diel P, Wolber G. Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents? *Biology of Sport*, 2014, vol. 32, pp.169–173. DOI:10.5604/20831862.1144420.
2. Haupt O, Ngueu S, Diel P, Parr MK. Anabolic Effect of Ecdysterone Results in Hypertrophy of C2C12 Myotubes by an Estrogen Receptor Mediated Pathway. *Recent Advances in Doping Analysis*, 2012, vol. 20, pp. 221–225.
3. Lafont R, Balducci C, Dinan L. Ecdysteroids. *Encyclopedia*, 2021, vol. 1, pp. 1267–1302. DOI: 10.3390/encyclopedia1040096.
4. Minglei L, Wang P, Ge Y, Dworkin L, Brem A, Liu Zh, Gong R. Activation of Mineralocorticoid Receptor by Ecdysone, an Adaptogenic and Anabolic Ecdysteroid, Promotes Glomerular Injury and Proteinuria Involving

- Overactive GSK3 $\beta$  Pathway Signaling. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, pp. 12225. DOI:10.1038/s41598-018-29483-7.
- 5 Burdette WJ, Richards RC. Alteration of the Growth of Mammalian Cells in vitro by Ecdysone Extract. *Nature*, 1961, vol. 189, pp. 666–668.
- 6 Prohibited List 2023: RUSADA for clean and fair sport! [Internet]. Moscow: World Anti-Doping Agency; [cited 2022 Nov 08]. Available at <https://rusada.ru/en/substances/prohibited-list/>.
- 7 Faletrov YV, Staravoitava VA, Dudko AR, Shkumatov VM. Application of docking-based inverse high throughput virtual screening to found phytochemical covalent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease, NSP12 and NSP16. *Research Square*, 2022 (Mar 31). DOI:10.21203/rs.3.rs-1456627/v1.
- 8 Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, vol. 31, pp. 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
- 9 Braun ThP, Marks DL. The Regulation of Muscle Mass by Endogenous Glucocorticoids. *Frontiers in Physiology*, 2015, vol. 6, pp. 1–12. DOI:10.3389/fphys.2015.00012.
- 10 Dai W, Jiang Li, Lay Yu-An Evan, Chen H, Jin G, Zhang H, Kot A, Ritchie RO, Lane NE, Yao W. Prevention of glucocorticoid induced bone changes with beta-ecdysone. *Bone*, 2015, vol. 74, pp. 48–57. DOI:10.1016/j.bone.2015.01.001.

## USAGE OF ECDYSONE AS ANABOLIC AGENT IN SPORTS: LITERATURE ANALYSIS & *IN SILICO* CALCULATIONS

---

V. S. Karpushenkova<sup>1</sup>, A. P. Stolyarchuk<sup>1</sup>, Y. V. Faletrov<sup>1,2</sup>, I. I. Boiko<sup>1</sup>, V. M. Shkumatov<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University,  
Minsk, Republic of Belarus

**Introduction.** Ecdysone and other ecdysteroids are insect hormones, but whether they can act on human cells by interacting with steroid hormone receptors is a matter of debate.

**Objective** – perform *in silico* calculations of ecdysone binding to steroid hormone receptors using docking.

**Materials and methods.** We used Autodock Vina and FYTdock software for modeling, as well as OriginPro for statistics.

**Results.** Using *in silico* calculations, it was found that ecdysone binds best to glucocorticoid receptors; statistical analysis showed a lower affinity for its binding to androgen and estrogen receptors in comparison with testosterone and estradiol.

**Conclusions.** Analysis of the obtained results does not allow us to draw conclusions about the effectiveness of ecdysone binding to steroid hormone receptors responsible for the anabolic effect, but a high affinity for glucocorticoid receptors is shown. The need for further computational, theoretical and experimental studies is postulated to reveal the molecular basis of the action of ecdysone on the human body and the fundamental possibility of its use as an anabolic agent.

**Keywords:** ecdysteroids, anabolic agents, docking.

**For citation:** Karpushenkova VS, Stolyarchuk AP, Faletrov YV, Boiko II, Shkumatov VM. Usage of ecdysone as anabolic agent in sports: literature analysis & *in silico* calculations. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 111–115 (in Russian).

Поступила 18.12.2022

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ МОРФИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

*А. Г. Виноцкая, В. В. Лелевич*

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

**Введение.** Использование животных в научных целях является давней практикой в области медицины и биологических исследований. В экспериментальной наркологии наиболее часто используется морфин и некоторые другие опиоиды.

**Цель исследования** – анализ основных животных моделей морфиновой интоксикации, применяемых в лабораториях при изучении патогенеза опийной наркомании.

**Материалы и методы.** Использовались научные публикации, депонированные в библиотечных базах данных Medline, Elibrary.ru и National Library of Medicine, посвященные экспериментальному изучению морфиновой интоксикации.

**Результаты.** Разработаны эффективные модели морфиновой интоксикации, позволяющие изучить метаболические сдвиги в тканях на разных стадиях развития опийной наркомании.

**Заключение.** Достигнут значительный прогресс в разработке моделей морфиновой интоксикации, условно позволяющих экстраполировать на человеческую популяцию.

**Ключевые слова:** морфин, животные модели, морфиновая зависимость.

**Для цитирования.** Виноцкая, А. Г. Экспериментальные модели морфиновой интоксикации / А. Г. Виноцкая, В. В. Лелевич // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 116–119.

### Введение

Использование животных в научных целях является как давней практикой в области биологических исследований и медицины, так и предметом частых споров в научном сообществе. Поразительное анатомическое и физиологическое сходство между человеком и животными, особенно млекопитающими, побуждает исследователей исследовать широкий спектр механизмов и оценивать новые методы лечения животных, прежде чем применить их открытия к людям [1].

В настоящее время накоплен большой фактический материал о применении лабораторных животных для изучения биологических эффектов алкоголя и опиоидных наркотиков (морфина, героина) [2, 3]. Несмотря на то что лабораторные животные со смешанным фенотипом не идеальны для отражения истинной человеческой ситуации, грызунов часто используют для моделирования отдельных проявлений наркотической интоксикации, включая острую интоксикацию, контролируемое и неконтролируемое потребление, синдром зависимости или состояние абстиненции [3].

Морфин является естественным алкалоидом опийного мака и особо опасным наркотическим средством, разрешенным к контролируемому обороту в Республике Беларусь. В клинической практике морфин используется для купирования выраженного болевого синдрома [4, 5]. Однако статус

легального наркотического средства и специфические фармакологические свойства сделали морфин доступным инструментом для проведения метаболических исследований у подопытных животных [6].

Цель исследования – обзор основных животных моделей морфиновой интоксикации, применяемых в лабораториях при изучении патогенеза опийной наркомании.

### Материалы и методы

Объектом исследования явились научные публикации, депонированные в библиотечных базах данных Medline, Elibrary.ru и National Library of Medicine и посвященные экспериментальному изучению опийной (морфиновой) интоксикации. Поиск работ проводился по ключевым словам «морфин», «животные модели», «метаболические эффекты» и некоторым другим. Было проанализировано более 200 статей, опубликованных за последние 30 лет.

### Результаты и их обсуждение

Экспериментальное изучение опийной (морфиновой) интоксикации известно с 1970-х годов. В дальнейшем были разработаны различные модели морфиновой интоксикации на крысах в зависимости от целей, поставленных исследователями. Так, механизмы формирования толерантности и отдельные поведенческие эффекты опиоидов изуча-

ют на моделях самовведения наркотиков. Для моделирования ситуаций с формированием зависимости от опийных наркотиков и абстинентного синдрома разработаны схемы полупринудительного или принудительного введения морфина беспородным крысам и мышам [6–12].

**Модели самовведения наркотиков** (*self-administration models*) основаны на подкрепляющих свойствах наркотических веществ, способствующих добровольному желанию повторить употребление препарата. В моделях такого рода животным предоставляется выбор между исследуемым веществом и нейтральным или положительным стимулом (физиологический раствор, раствор сахарозы или корм) [2, 3].

**Модели полупринудительного введения морфина.** В экспериментах такого рода морфин предоставляется животным с кормом или в водных растворах с сахарозой в качестве единственного источника питья или пищи. Существенным недостатком полупринудительного метода является присутствие специфического привкуса у раствора морфина, что приводит к разделению животных на группы с разным предпочтением к потребляемому препарату [3].

**Принудительное введение морфина** в организм животного происходит посредством подкожных, внутривенных или внутривентриальных инъекций [2, 3]. Считается, что степень поглощения лекарственного препарата, поступающего в организм, изменяется следующим образом: внутривенное > внутривентриальное > внутримышечное > подкожное > оральное. В связи с этим у мелких лабораторных животных, таких как крысы или мыши, наиболее предпочтительно внутривентриальное введение препарата [2]. В настоящее время активно используются схемы внутривентриального введения морфина крысам для моделирования острой, хронической морфиновой интоксикации и морфинового абстинентного синдрома.

**Острая морфиновая интоксикация.** Однократное введение опиоидов крысам приводит к дозозависимым эффектам на скорость потребления кислорода и глюкозы в прилежащем ядре и вентральной области покрышки – структурах ЦНС, ответственных на эйфорические и подкрепляющие эффекты наркотиков [7]. В нашем исследовании мы использовали однократные внутривентриальные инъекции 1%-го морфина гидрохлорида крысам в дозах 10, 20 и 40 мг/кг массы животного. Введение таких доз морфина приводило к разнонаправленным сдвигам в активности ферментов метаболизма ГАМК – от активации при введении низкой дозы до угнетения активности при применении высокой дозы препарата [6].

**Хроническая морфиновая интоксикация.** Долговременные эффекты морфиновой интоксикации и процесс формирования физической зависимости изучаются на животных моделях, предусматривающих продолжительное введение наркотика. В литературе описаны два экспериментальных режима морфиновой интоксикации, которые относятся к хроническому и прерывистому введению наркотика [8–10]. Мы использовали схему хронического введения морфина путем внутривентриального введения 1%-го раствора морфина гидрохлорида на протяжении 7, 14 и 21 дней. Препарат вводился 2 раза в сутки (с интервалом 12 ч) в суммарной дозе, возрастающей от 20 до 40 мг/кг массы в сутки [8].

**Прерывистая морфиновая интоксикация** представляет собой разновидность субхронической интоксикации, при которой периоды введения наркотика прерывались периодами времени, в течение которых морфин полностью или частично элиминировался из организма. В работе *T. Le Marek et al.* (2011) «прерывистый» режим введения морфина был основан на ежедневном, однократном введении наркотика в одно и то же время в дозе 20 мг/кг на протяжении 7 суток [10]. Мы использовали вариант прерывистой морфиновой интоксикации, основанный на циклическом, внутривентриальном введении крысам 1%-го раствора морфина гидрохлорида в увеличивающихся дозах от 30 до 40 мг/кг. При этом морфин вводили по схеме «4 суток морфин + 3 суток отмена» с повторением нескольких таких циклов [9].

**Модели морфинового абстинентного синдрома (МАС).** Целью таких экспериментов является изучение поведенческих, биохимических отклонений при отмене потребления. Другим применением такого рода экспериментов является преclinical тестирование соединений, используемых или планируемых к использованию в наркологической практике [11].

Продолжительность и интенсивность абстинентных проявлений у крыс после продолжительной морфиновой интоксикации напрямую зависят от наличия дополнительных стимулов после лишения наркотика [11]. В зависимости от методологии и целей эксперимента, МАС может быть *спонтанный*, возникающий в отсутствие любых стимулов, *условный* или *обусловленный*. Так, признаки условной абстиненции могут возникнуть у морфин-зависимых животных, подвергаемых стрессовой реакции в виде громкого звукового сигнала или световых бликов. Было показано, что морфин-зависимые крысы демонстрируют симптом «отряхивания мокрой собаки», когда их помещают в среду, где они ранее испытывали стресс [12].

В моделях обусловленной абстиненции поведенческие признаки МАС возникали у крыс после внутрибрюшинного введения антагонистов опиоидов, в основном, налоксона или налтрексона. Такой способ моделирования абстинентного синдрома не требовал длительного лишения животных наркотика, поскольку вызывал интенсивные поведенческие и физиологические реакции непосредственно после введения антагониста за счет блокирования мю-опиоидных рецепторов [11, 12].

#### Список цитированных источников

1. Barré-Sinoussi, F. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives / F. Barré-Sinoussi, X. Montagutelli // *Future Sci OA*. – 2015. – Vol. 1, № 4. – FSO63. – DOI: 10.4155/fso.15.63.
2. Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation / P. V. Turner [et al.] // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* – 2011. – Vol. 50, № 5. – P. 614–627.
3. Kuhn, B. N. Understanding Addiction Using Animal Models / B. N. Kuhn, P. W. Kalivas, A. C. Bobadilla // *Front Behav Neurosci.* – 2019. – Vol. 13. – P. 262. – DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00262.
4. Востриков, В. В. Биохимические маркеры алкогольной и опиатной зависимости / В. В. Востриков, В. П. Павленко, П. Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2004. – Т. 3. – С. 18–55.
5. Арбух, Д. М. Опиоидные анальгетики в терапии болевых синдромов (часть 1) / Д. М. Арбух, Г. Р. Абузарова, Г. С. Алексеева // *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. – 2017. – Т. 14, № 3. – С. 58–67. – DOI: 10.21292/2078-5658-2017-14-3-58-67
6. Лелевич, С. В. Методология экспериментального изучения токсического действия алкоголя и морфина / С. В. Лелевич, В. В. Лелевич // *Вопросы наркологии*. – 2018. – Т. 163, № 3. – С. 188–206.
7. Solis, E. Jr. Changes in brain oxygen and glucose induced by oxycodone: Relationships with brain temperature and peripheral vascular tone / E. Jr. Solis, A. Afzal, E. A. Kiyatkin // *Neuropharmacology*. – 2018. – Vol. 133. – P. 481–490. – DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.02.017.
8. Лелевич, В. В. Биохимические аспекты морфиновой абстиненции: экспериментальное исследование / В. В. Лелевич, А. Г. Виницкая, С. В. Лелевич // *Наркология*. – 2020. – Т. 19, № 8. – С. 64–76. – DOI: 10.25557/1682-8313.2020.08.64-76.
9. Влияние прерывистой морфиновой интоксикации на состояние пула нейроактивных аминокислот и биогенных аминов в отделах головного мозга // В. В. Лелевич [и др.] // *Нейрохимия*. – 2015. – Т. 32, № 3. – С. 252–258.
10. Chronic and intermittent morphine treatment differently regulates opioid and dopamine systems: a role in locomotor sensitization / T. Le Marec [et al.] // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2011. – Vol. 216, № 2. – P. 297–303. – DOI:10.1007/s00213-011-2223-6.
11. Mitragnine attenuates morphine withdrawal effects in rats – A comparison with methadone and buprenorphine / R. Hassan [et al.] // *Front. Psychiatry*. – 2020. – Vol. 11. – P. 411. – DOI: 10.3389/fpsy.2020.00411.
12. Precipitated and conditioned withdrawal in morphine-treated rats / G. L. Becker [et al.] // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2010. – Vol. 209, № 1. – P. 85–94. – DOI:10.1007/s00213-009-1773-3

#### Заключение

Анализ библиографических баз данных свидетельствует о значительном прогрессе в разработке животных моделей опиоидной интоксикации. Большинство исследователей использует грызунов и введение им морфина как легального и доступного наркотического средства и естественного алкалоида снотворного мака. Накоплено множество данных о метаболических нарушениях, возникающих в тканях на разных стадиях развития опиоидной зависимости, которые можно экстраполировать на человеческую популяцию.

#### References

1. Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future science OA*, 2015, vol. 1, no 4, pp. FSO63. DOI: 10.4155/fso.15.63.
2. Turner PV, Pekow C, Vasbinder MA, Brabb T. Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2011, vol. 50, no 5, pp. 614–627.
3. Kuhn BN, Kalivas PW, Bobadilla AC. Understanding Addiction Using Animal Models. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 2019, vol. 13, pp. 262. DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00262.
4. Vostrikov VV, Pavlenko VP, Shabanov PD. Biokhimicheskie markery alkohol'noy i opiatnoy zavisimosti [Biochemical markers of alcohol and opiate addiction] *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii [Reviews on clinical pharmacology and drug therapy]*, 2004, no 3, pp. 18–55. (In Russian).
5. Arbukh DM, Abuzarova GR, Alekseeva GS. Opioidnye anal'getiki v terapii bolevykh sindromov (chast' 1). [Opioids in pain syndrome management (part I)] *Vestnik anesteziologii i reanimatologii [Messenger of Anesthesiology and Resuscitation]*, 2017, vol. 14, no 3, pp. 58–67. DOI: 10.21292/2078-5658-2017-14-3-58-67 (in Russian)
6. Lelevich SV, Lelevich VV. Metodologiya eksperimental'nogo izucheniya toksicheskogo deystviya alkogolya i morfina. [Methodology of experimental studies of toxic effects of alcohol and morphine]. *Voprosy narkologii [Issues in Narcology]*, 2018, vol. 163, no 3, pp. 188–206. (In Russian).
7. Solis E Jr, Afzal A, Kiyatkin EA. Changes in brain oxygen and glucose induced by oxycodone: Relationships with brain temperature and peripheral vascular tone. *Neuropharmacology*, 2018, vol. 133, pp. 481–490. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.02.017.
8. Lelevich VV, Vinitskaya AG, Lelevich SV. Biokhimicheskie aspekty morfinovoy abstinentsii: eksperimental'noe issledovanie. [Biochemical aspects of morphine withdrawal: experimental studies]. *Narkologiya [Narcology]*, 2020, vol. 19, no 8, pp.64–76. DOI: 10.25557/1682-8313.2020.08.64-76. (In Russian).
9. Lelevich VV, Vinitskaya AG, Lelevich SV, Sarana YuV, Doroshenko EM. The effect of discontinuous morphine intoxication on the pools of neuroactive amino acids and biogenic amines in brain regions. *Neurochemical Journal*, 2015, vol. 9, no 3, pp. 221–226.
10. Le Marec T, Marie-Claire C, Noble F, Marie N. Chronic and intermittent morphine treatment differently regulates opioid and dopamine systems: a role in locomotor sensitization. *Psychopharmacology (Berl)*, 2011, vol. 216, no 2, pp. 297–303. DOI:10.1007/s00213-011-2223-6.



- 11 Hassan R, Pike See C, Sreenivasan S, Mansor SM, Müller CP, Hassan Z. Mitragynine attenuates morphine withdrawal effects in rats – A comparison with methadone and buprenorphine. *Frontiers in Psychiatry*, 2020, vol. 11, pp. 411. DOI: 10.3389/fpsy.2020.00411.
- 12 Becker GL, Gerak LR, Li JX, Koek W, France CP. Precipitated and conditioned withdrawal in morphine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 2010, vol. 209, no 1, pp. 85–94. DOI:10.1007/s00213-009-1773-3

---

## EXPERIMENTAL MODELS OF MORPHINE INTOXICATION

---

*A. G. Vinitskaya, V. V. Lelevich*

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

**Intriduction.** The use of animals for scientific purposes is both a longstanding practice in medicine and biological research. Morphine and other legal opioids are widely used in experimental studies of addiction.

**Objective** – analysis of the main animal models being used in laboratories in the study of the pathogenesis of opiate addiction.

**Materials and methods.** We used the library databases Medline, Elibrary.ru and National Library of Medicine for searching up publications, devoted to the experimental study of morphine intoxication.

**Results.** Effective models of morphine intoxication were developed and applied, that allow to study metabolic disturbances in tissues at different stages of development of opiate addiction.

**Conclusions.** Considerable progress has been achieved in the working out of animal models of morphine intoxication, which conditionally provide extrapolation to the human population.

**Keywords:** morphine, animal models, morphine addiction.

**For citation:** Vinitskaya AG, Lelevich VV. Experimental models of morphine intoxication. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 116–119 (in Russian).

*Поступила 29.08.2022*

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS, PROMISING FOR USE IN MEDICAL PRACTICE

*Jabbar Mustafa Saleh Jabbar*

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

**Introduction.** Today, antibiotics are widely used as antimicrobial agents. However, the development of resistance of pathogenic and opportunistic microorganisms to antibiotics determines the search for new antimicrobial drugs among herbal remedies.

**Objective** – to evaluate the composition and antimicrobial activity of plant extracts, as well as their therapeutic possibilities in the treatment of conditions associated with a violation of the anatomical integrity of the skin.

**Conclusion.** These days it has become known how many plants have an important role in the medicinal and therapeutic fields, as plant parts were used in many civilizations during ancient and modern times. Already in ancient times, boxwood was used as a medicinal plant as a remedy for coughs, gastrointestinal diseases, as well as chronic fevers, such as malaria. As a remedy against malaria, it is supposedly comparable in action to quinine. Due to their toxicity, boxwood preparations are rarely used these days, since they are very difficult to accurately dose. Overdose can lead to vomiting, seizures, and even death. Homeopaths still use boxwood as, ostensibly, a remedy for rheumatism. The presented review, including antibacterial and wound-healing properties, indicates the ambiguity and inconsistency of the research results. The more interesting will be the perceived results of further research in this direction.

**Keywords:** antimicrobial activity, plants extract, medicinal plants, properties.

**For citation:** Jabbar Mustafa Saleh Jabbar. Antimicrobial activity of plant extracts, promising for use in medical practice. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2023, vol. 2, no. 1(2). pp. 120–127.

### Introduction

Today, antibiotics are widely used as antimicrobial agents. However, the development of resistance of pathogenic and opportunistic microorganisms to antibiotics determines the search for new antimicrobial drugs among herbal remedies [1].

Raw materials of plant origin can serve as an almost inexhaustible source of biologically active substances (BAS), which in turn are used in various fields of modern industry [2]. In addition, phytopreparations, possessing a mild action and rare indication of allergic reactions, cause significantly fewer side effects [3]. This is especially true for the bacterial nature of the disease [4]

These plants have different pharmacological actions [5], which is especially important in the fight against microorganisms.

Even ancient Greek doctors noticed that evergreen boxwood has many unusual beneficial properties. Aphrodite's flute was made from evergreen boxwood. From boxwood they prepared special amulets against evil forces, attributed to it the ability to ward off nightmares. The branches of the boxwood served as a symbol of longevity. In ancient times, boxwood was used as a medicinal plant for coughs, gastrointestinal diseases, and chronic fevers such as malaria. Currently, Boxwood is used only in folk medicine, although it

has a hypotensive, diuretic, diaphoretic, antiseptic, antibacterial, analgesic, antipyretic, choleric effect. The chemical composition of the plant and the possible therapeutic and prophylactic effects have not been studied enough [6].

Thus, given the insufficient data on the composition of the herbal extract of the Buxus plant and its use in folk medicine, we set the task to study the composition of the Buxus plant extract and its antimicrobial activity, therapeutic possibilities in the treatment of conditions associated with the violation of the anatomical integrity of the skin covers.

Purpose of scientific review – to evaluate the composition and antimicrobial activity of plant extracts, as well as their therapeutic possibilities in the treatment of conditions associated with a violation of the anatomical integrity of the skin.

#### *Plant extracts and components*

These days it has become known how many plants have an important role in the medicinal and therapeutic fields, as plant parts (stems, roots, leaves, etc.) were used in many civilizations during ancient and modern times [7].

*Coriandrum sativum* (L.) (*Umbelliferae-Apiaceae*) (coriander, cilantro) was introduced to Chinese cooking and medicine around AD 600, since when it has been known as hu, 'foreign'. In the Chinese

*Materia Medica*, it was recommended for certain types of non-pathogenic food poisoning caused by decaying matter. The parts of the coriander used are its leaves, seeds and oil. The fresh leaves and ripe seeds have quite different aromas and uses. Both the leaves and seeds are rich in volatile oils that act mainly on the digestive system, stimulating the appetite and relieving irritation. They also act as an expectorant. The oil is fungicidal and bactericidal. The leaves are widely used to flavor food, especially in the Middle East, and southeast Asia. The seeds are also an ingredient of curries and pickling spices, and bakery products. Medicinally, coriander is used internally for minor digestive problems, and externally for hemorrhoids and painful joints (seeds). Seeds reduce griping in laxative preparations based on *Rheum officinale* and *Cassia angustifolia*. The oil adds to the flavor of gin, vermouth and Chartreuse, and is also prized in perfumery the plant *Juniperus oxycedrus* (L.) (*Cupressaceae*) (juniper) is a Mediterranean plant, it is found in Thrace and many parts of Anatolia. A drug made from *J. oxycedrus* is called *Pix Juniperi* (T.K.) (*Juniper Tarry*, *Oleum cadinum*). *Pix Juniperi* shows a powerful antiseptic effect and is used externally in the field of dermatology for mange, eczema and curing oily hair. It is found in soaps and in pomades with the aim of curing alopecia. Various junipers are used medicinally for example, native North Americans use it to treat a wide range of conditions, from kidney complaints to dandruff and syphilis. Various parts such as the fruits, seeds and oil of the juniper are used [8].

In ancient Mesopotamia herbal medicine and other pharmaceuticals were ubiquitously used tools of as physicians. Some treatments were likely based on empirically discovered characteristics of the ingredients used, while others were less based in effectiveness and more based in the attribution of superstitious or symbolic qualities. A Sumerian cuneiform tablet from c. 3000 BCE details fifteen pharmaceutical prescriptions, though it lacks the context that would be provided by the names of the associated diseases or the amounts of the ingredients. The elements of the treatments are faunal, botanic, and mineral: sodium chloride (salt), potassium nitrate (saltpeter), milk, snakeskin, turtle shell, cassia, myrtle, asafetida, thyme, willow, pear, fig, fir, and date. All parts of plant anatomy were utilized: branches, roots, seeds, bark, sap, and branches.

Opiates were another class of botanical medicine that was utilized by the ancient Mesopotamians: narcotics were derived from *Cannabis sativa* (hemp), *Mandragora* spp. (mandrake), *Lolium temulentum* (darnel), and *Papaver somniferum* (opium). There is evidence that opium poppies were definitely present

in Sumeria by 3000 BCE, but they were probably reserved for use by ashipu and priests in healing temples, and they were used in conjunction with hemlock as euthanasia. Clearly the pharmacopeia of Mesopotamia was elaborate even in Sumerian times, and the unnamed writer of the prescription tablet knew the correlation between illnesses and prescriptions without having to name the illnesses [9].

#### *Medical uses of plants extract*

As nature is rich with different plants, researchers have focused their attention towards plant extracts as an alternative to synthetic drugs to be applied in the clinical setting.

It has been widely reported that plant extracts such as essential oils contain various bioactive compounds which are responsible for bioactivities, such as antimicrobial, anticancer, and anti-inflammatory agents [10].

#### *Antimicrobial activity*

Antimicrobial use has been common practice for at least 2000 years. Ancient Egyptians and ancient Greeks used specific molds and plant extracts to treat infection.

The ethanolic extract of *Sphareranthu hirtus* exhibited a higher effect of the antimicrobial activity than the hot water extract. Also it was active against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and enterohemorrhagic *E. coli* 0157 EHEC [11].

The date palm tree from the African region, which has been tested for its antibacterial activity and has been reported to have activity against *Enterobacteriaceae*, such as pathogenic strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, and *Proteus mirabilis*, but, other than *E. coli* and *K. pneumoniae* strains, date palm trees from the Middle East have yet to be tested for antibacterial activity against other *Enterobacteriaceae*. The leaves of date palm have been shown to exhibit antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

The anti microbial property of a plant extract is determined by the presence of compounds such as phenols, tannins, flavonoids, terpenoids, and saponins, and the methanol extract of plants has been recorded to contain high amount of these compounds.

#### *Major groups of antimicrobial compounds from plants*

Plants have an almost limitless ability to synthesize aromatic substances, most of which are phenols or their oxygen-substituted derivatives [12]. Most are secondary metabolites, of which at least 12,000 have been isolated, a number estimated to be less than 10% of the total. In many cases, these substances serve as plant defense mechanisms against predation by

microorganisms, insects, and herbivores. Some, such as terpenoids, give plants their odors; others (quinones and tannins) are responsible for plant pigment. Many compounds are responsible for plant flavor (e.g., the terpenoid capsaicin from chili peppers), and some of the same herbs and spices used by humans to season food yield useful medicinal compounds [13].

#### a) Phenolics and Polyphenols

Dates (*Phoenix dactylifera*) have been identified to exhibit antimicrobial activity and anti-inflammatory response from various parts of the tree, such as the fruit and seeds, due to the presence of phenolic compounds and flavonoids.

Other than the date palm, the phytochemical analysis of figwort (*Scrophularia* sp.) plant extract from various showed that the extracts contain phenolic compounds, which is attributed to the antimicrobial activity.

Catechol and pyrogallol both are hydroxylated phenols, shown to be toxic to microorganisms. Catechol has two 2OH groups, and pyrogallol has three. The site(s) and number of hydroxyl groups on the phenol group are thought to be related to their relative toxicity to microorganisms, with evidence that increased hydroxylation results in increased toxicity.

The mechanisms thought to be responsible for phenolic toxicity to microorganisms include enzyme inhibition by the oxidized compounds, possibly through reaction with sulfhydryl groups or through more nonspecific interactions with the proteins [14]. Phenolic compounds act on the bacteria by altering the permeability of the plasma membrane of bacterial cells, altering enzymes in the cells or through modifying the rigidity of the cell wall; this results in the loss of integrity in the cell membrane.

The common herbs tarragon and thyme both contain caffeic acid, which is effective against viruses, bacteria, and fungi.

#### Quinones

Quinones are aromatic rings with two ketone substitutions. They are ubiquitous in nature and are characteristically highly reactive. In addition to providing a source of stable free radicals, quinones are known to complex irreversibly with nucleophilic amino acids in proteins, often leading to inactivation of the protein and loss of function. For that reason, the potential range of quinone antimicrobial effects is great. Probable targets in the microbial cell are surface-exposed adhesins, cell wall polypeptides, and membrane-bound enzymes. Quinones may also render substrates unavailable to the microorganism. As with all plant-derived antimicrobials (6).

#### Flavones, flavonoids, and flavonols

Flavones are phenolic structures containing one carbonyl group (as opposed to the two carbonyls in

quinones). The addition of a 3-hydroxyl group yields a flavonol.

Flavonoids also are hydroxylated phenolic substances known to be synthesized by plants in response to microbial infection and they have been found to be antimicrobial substances against wide array of microorganisms in vitro [3]. Their activity is probably due to their ability to complex with extracellular and soluble proteins and to complex with bacterial cell wall [15].

Delineation of the possible mechanism of action of flavones and flavonoids is hampered by conflicting findings. Flavonoids lacking hydroxyl groups on their b-rings are more active against microorganisms than are those with the 2OH groups; this finding supports the idea that their microbial target is the membrane. Lipophilic compounds would be more disruptive of this structure. However, several authors have also found the opposite effect; i.e., the more hydroxylation, the greater the antimicrobial activity. This latter finding reflects the similar result for simple phenolics (see above). It is safe to say that there is no clear predictability for the degree of hydroxylation and toxicity to microorganisms.

Catechins, the most reduced form of the C3 unit in flavonoid compounds, deserve special mention. These flavonoids have been extensively researched due to their occurrence in oolong green teas. It was noticed some time ago that teas exerted antimicrobial activity and that they contain a mixture of catechin compounds. These compounds inhibited in vitro *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella*, and other bacteria and microorganisms.

#### b) Terpenoids and Essential Oils

The fragrance of plants is carried in the so called quinta essentia, or essential oil fraction. These oils are secondary metabolites that are highly enriched in compounds based on an isoprene structure. They are called terpenes, their general chemical structure is  $C_{10}H_{16}$ .

Terpenoids are synthesized from acetate units, and as such they share their origins with fatty acids. They differ from fatty acids in that they contain extensive branching and are cyclized. Examples of common terpenoids are methanol and camphor (monoterpenes) and farnesol and artemisin (sesquiterpenoids).

Terpenenes or terpenoids are active against bacteria, fungi, viruses, and protozoa. In 1977, it was reported that 60 % of essential oil derivatives examined to date were inhibitory to fungi while 30 % inhibited bacteria [16].

The mechanism of action of terpenes is not fully understood but is speculated to involve membrane disruption by the lipophilic compounds.

### c) Alkaloid

Heterocyclic nitrogen compounds are called alkaloids. The first medically useful example of an alkaloid was morphine. Codeine and heroin are both derivatives of morphine. Berberine is an important representative of the alkaloid group. It is potentially effective against trypanosomes and plasmodia. The mechanism of action of highly aromatic planar quaternary alkaloids such as berberine and harmaline is attributed to their ability to intercalate with DNA.

### d) Lectins and Polypeptides

Peptides which are inhibitory to microorganisms were first reported in 1942. They are often positively charged and contain disulfide bonds. Their mechanism of action may be the formation of ion channels in the microbial membrane or competitive inhibition of adhesion of microbial proteins to host polysaccharide receptors. Recent interest has been focused mostly on studying anti-HIV peptides and lectins, but the inhibition of bacteria and fungi by these macromolecules, such as that from the herbaceous *Amaranthus*, has long been known.

### Others

Many phytochemicals not mentioned above have been found to exert antimicrobial properties. There are reports of antimicrobial properties associated with polyamines (in particular spermidine), isothiocyanates, thiosulfonates, and glucosides.

Polyacetylenes deserve special mention. Estevez-Braun et al. isolated a C17 polyacetylene compound from *Bupleurum salicifolium*, a plant native to the Canary Islands. The compound, 8S-heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diyne-1,8-diol, was inhibitory to *S. aureus* and *B. subtilis* but not to gram-negative bacteria or yeasts (8). Acetylene compounds and flavonoids from plants traditionally used in Brazil for treatment of malaria fever and liver disorders have also been associated with antimalarial activity.

### Anti-Cancer and Anti-Tumor Activity

Plant extracts from the Middle East are known to have anti-cancer and anti-tumor properties, with the added ability to also enhance the immune system and induce apoptosis among carcinoma cells [17].

The anti-cancer and anti-tumor activities in the plant extract are due to the presence of various groups of compounds, such as alkaloids, diterpenes, diterpenoquinone, purine-based compounds, lactonic sesquiterpene, proteins, and macrolides.

A total of 7500 plant extracts were screened for *in vitro* anticancer activity against a panel of three human cell lines and the results showed that the largest number of plant specimens in that study was from the family *Asteraceae*, which is rich in sesquiterpene lactones [18].

### Anti-Inflammation and Anti-Diabetic Activity

Anti-inflammation is an important aspect which enhances the immune system of the host when the host is invaded by pathogens. However, inflammation may cause diseases such as heart disease, diabetes, cancer, and arthritis. This issue can be overcome by consuming a diet which includes flavonoids and phenolic compounds that possess antioxidant activities. Plant extracts isolated from the Middle East region have exhibited anti-inflammation and anti-diabetic properties, which aid in enhancing the immune system of the host.

Cactus has been identified to have anti-diabetic properties due to the presence of compounds such as linoleic acid (polyunsaturated fatty acid), oleic acid (monounsaturated fatty acid), vitamins such as tocopherols and vitamin K1, sterols, and carotenoids.

### Plant extract synthesized nanoparticles

The use of plant extracts for making metallic nanoparticles is inexpensive, easily scaled up and environmentally benign. It is especially suited for making nanoparticles that must be free of toxic contaminants as required in therapeutic applications. The plant extract based synthesis can provide nanoparticles of a controlled size and morphology. In medicine, nanoparticles are being used as antimicrobial agents in bandages, for example. Applications in targeted drug delivery and clinical diagnostics are developing [19].

Even though the importance of plants for nanoparticles synthesis was realized and also reported since 2004, the number of publications on plant extract synthesized nanoparticles is steadily being increased from 2009 and the maximum number of papers was published in 2012 and 2013 with 54 and 74 publications [20, 21, 22, 23, 24].

*Boxwood (Latin Buxus) is a genus of plants of the Boxwood family*

Boxwood (*Buxus*) is a genus of plants of the Boxwood family, slow-growing evergreen shrubs and trees that grow to a height of 2 to 12 m (occasionally up to 15 m). The Latin name of the genus comes from ancient Greek. Πύξος - bux, boxwood, borrowings from an unknown language [25].

### Distribution and ecology

Boxwoods are very unpretentious plants: they grow on scree, on the edges of forests, in shrubs and dark deciduous forests. Very shade-tolerant, but also thermophilic. In nature, they live on slightly acidic soils.

There are three large areas:

African – in forests south of Equatorial Africa and Madagascar,

Central American - in the tropics and subtropics south of northern Mexico and Cuba (25 species);

American species are the largest-leaved plants of the genus, often reaching the size of medium-sized trees (up to 20 m),

Euro-Asian - from the British Isles through Southern Europe, Asia Minor and Western Asia, Transcaucasia, China to Japan and Sumatra.

#### *Meaning and application*

Boxwood is one of the oldest ornamental plants used for landscaping and ornamental horticulture (often called *Buxus*). Valued for its dense, beautiful crown, shiny foliage and the ability to tolerate a haircut well, which allows you to create hedges and curbs from them, as well as bizarre shapes that retain their shape for a long time.

Catholics, as well as Orthodox Christians of Georgia, decorate their homes with boxwood branches on Palm Sunday.

Boxwood is a kernelless ripe woody breed. Dried boxwood has a uniform matte color from light yellow to waxy color, which darkens little over time, and a homogeneous structure with narrow annual layers. The vessels are small, solitary, not visible to the naked eye. The core rays are almost invisible in the cuts. The wood tastes a little bitter, there is no particular smell.

Boxwood is the hardest and densest wood found in Europe. Its density is from 830 kg / m<sup>3</sup> (absolutely dry) to 1300 kg / m<sup>3</sup> (freshly cut), and its hardness is from 58 N / mm<sup>2</sup> (radial) to 112 N / mm<sup>2</sup> (end). In terms of strength, boxwood is superior to hornbeam [26].

#### *Medicine*

Already in ancient times, boxwood was used as a medicinal plant as a remedy for coughs, gastrointestinal diseases, as well as chronic fevers, such as malaria. As a remedy against malaria, it is supposedly comparable in action to quinine. Due to their toxicity, boxwood preparations are rarely used these days, since they are very difficult to accurately dose. Overdose can lead to vomiting, seizures, and even death. Homeopaths still use boxwood as, ostensibly, a remedy for rheumatism.

#### *Poisonous properties*

All parts of the plant and especially the leaves are poisonous. Boxwood contains about 70 alkaloids, including cyclobuxin D. In the leaves and bark, the alkaloids content is about 3 %. The lethal dose of cyclobuxin D for dogs is 0.1 mg per kilogram of body weight when taken orally.

According to the site The Plant List, the genus contains 104 species (*Buxus* spp).

#### *Chemical composition of boxwood*

Boxwood (*buxus*) is rich in alkaloids. These substances have long been used in medicine and not only. Many alkaloids have both a therapeutic effect (vincristine is an antitumor) and a psychostimulating or narcotic (caffeine, cocaine).

In all parts of the boxwood (root, leaves, shoots and even bark) there are about 70 alkaloids, which have different effects on the human body. The main ones are cyclocoreanin B, cyclobuxin D, buxin, parabuxin, buxipin. Boxwood leaves contain approximately 3 % of these substances. This percentage is considered high and is valued in folk medicine [27].

In addition to alkaloids, boxwood contains bioflavonoids (regulate the action of enzymes and restore body cells), resins, essential oils and tannins (have antimicrobial effects).

#### *Boxwood (buxus): medicinal properties and contraindications*

The rich chemical composition provides the beneficial properties of boxwood.

The content of a significant amount of alkaloids in the composition play an important role in the treatment of arterial hypertension and heart diseases: arrhythmias and myocardial ischemia.

Tannins in the structure of the *buxus* provide antibacterial and antiseptic action. Oil - celery - also has a strong antimicrobial effect.

The presence of bioflavonoids in the composition regulates the action of enzymes and ensures the restoration of body cells.

The phytoncides released by the plant destroy viruses, bacteria and various harmful microorganisms in the air.

In folk medicine, *buxus* is used for:

- elevated temperature;
- inflammation of the gallbladder and bile ducts;
- cardiovascular diseases (arrhythmias and ischemia). For diseases of the heart and blood vessels, *sagan-daila* is also indicated for use;
- diseases of the urinary tract;
- joint pain;
- non-healing wounds and abrasions;
- baldness and seborrhea.

#### *Contraindications*

Treatment with boxwood and taking funds based on it is contraindicated in: pregnancy at all stages, lactation period, tendency to allergic reactions, individual plant intolerance, complicated heart diseases, asthma, stomach and duodenal ulcers [28].

Means based on boxwood should be used with caution and avoid overdose, otherwise it is fraught with severe poisoning, which may accompany diarrhea, vomiting, hyperemia, convulsions and respiratory arrest. Exceeding the dose is dangerously fatal due to suffocation [29].

### **Conclusions**

The presented analytical review on the assessment of antibacterial and wound healing properties of plant extracts indicates the ambiguity and inconsistency of

the research results. The more interesting will be the perceived results of further research in this direction.

Currently, plant extracts should be considered as promising components in the fight against bacterial infection and the treatment of wounds (skin lesions), which requires further scientific research.

### Reference

- 1 Korsun VF. Fitoterapiya v komplementarnoj medicine / Sovremennye problemy fitoterapii travnichestva // Materialy 3-go Mezhhdunarodnogo s"ezda fitoterapevtov i travnikov. – M.: Institut fitoterapii. – 2013, pp. 83–93.
- 2 Dikorastushchie poleznye rasteniya Rossii / otv. red. A. L. Budancev, E.E. Lesiovskaya // CPb.: Izd-vo SPHFA, 2001. – 663 s.
- 3 Kumysheva LA. Protivovospalitel'naya i antibakterial'naya aktivnost' nekotorykh lekarstvennykh rastenij i ih sborov – perspektivnykh mukozoprotektorov. *Rast. resursy*, 2009, vyp.1, pp. 126–139.
- 4 Cybikova EB. Dinamika pokazatelej zaboлеваemosti i smertnosti ot tuberkuleza v Rossii v 2005 g. *Problemy tuberkuleza i boleznej legkih*, 2007, №3, pp. 8–11.
- 5 Vodolazova SV, Myadolec MA, Karpova MR, Sarancyna YuV. Antimikrobnaya aktivnost' efirnykh masel i vodnykh izvlechenij iz lekarstvennykh rastenij Hakasii. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal*, 2011, №2, pp. 54–58.
- 6 Orhan EI, Khan TH, Erdem AS, Kartal M, Sener B. Selective cholinesterase inhibitors from *Buxus sempervirens* L. and their molecular docking studies. *Current Computer-Aided Drug Design*, 2011, 7(4), pp. 276–286.
- 7 Walde A. Lateinisches etymologisches Wörterbuch. Carl Winter's Universitätsbuchhandlung, 1938, 125 p.
- 8 Frisk H. Griechisches etymologisches Wörterbuch, Band II / Heidelberg: Carl Winter's Universitätsbuchhandlung, 1960, 626 p.
- 9 Fasmer M. Samshit / Etimologicheskij slovar' russkogo yazyka: v 4 t.avt. pod red. prof. B.A. Larina [t. I]. – izd. 2-e, ster. – M.: Progress. – 1986–1987.
- 10 Ahmed D, Asif E, Ahmad S, Sener B, Turkoz S. Chemical constituents of *Buxus sempervirens*. *Journal of Natural Products*, 1991, 54(1), pp. 79–82.
- 11 Vikani KV, Dangar RD, Kapadia NS, Shah MB. A pharmacognostic study on *Sphaeranthus indicus*. *J. Nat. Remed*, 2008, no. 8, pp. 61–67.
- 12 Osaki YOsio. Krasota syogi. *The Japan Foundation Newsletter*, vol. XXVI, no. 5, 1999.
- 13 Abreu AC, McBain AJ, Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*, 2012, vol. 29, pp.1007–1021. DOI: 10.1039/c2np20035j.
- 14 Bown D. The Royal Horticultural Society Encyclopedia of Herbs and Their Uses. Dorling Kindersley Ltd. London, 1995, 424 p.
- 15 Teall EK. Medicine and Doctoring in Ancient Mesopotamia. *Grand Valley Journal of History*, 2014, vol. 3, no. 2.
- 16 Yadav RNS, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*, 2011, vol. 3, no. 12, pp. 10–14.
- 17 Marjorie C. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*, 1996, vol. 12, pp. 564–582.
- 18 Geissman TA. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds / Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents. Elsevier, N.Y., 1963, vol. 9, 265 p.
- 19 Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, vol. 12, pp. 564–582.

- 20 Mason TL, Wasserman BP. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, 1987, vol. 26, pp. 2197–2202.
- 21 Estevez-Braun A, Estevez-Reyes R, Moujir LM, Ravelo AG, Gonzalez AG. Antibiotic activity and absolute configuration of 8S-heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diyne-1,8-diol from *Bupleurum salicifolium*. *Journal of Natural Products*, 1994, vol. 57, pp. 1178–1182.
- 22 Hassan A, Rahman S, Deeba F, Mahmud S. Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. *Medicinal Plants Research*, 2009, vol. 3(1), pp. 20–23.
- 23 Varijakzhan D, Chong Ch-M, Abushelaibi Ai, Lai K-S, Lim SHE. Middle Eastern Plant Extracts: An Alternative to Modern Medicine Problems. *Molecules*, 2020, vol. 25, pp. 11–26.
- 24 Fouche G. In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, vol. 119, pp. 455–461.
- 25 Rajanl R. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*, 2015, vol. 70, pp. 356–373.
- 26 Shakeel A, Saiqa I. Synthesis of Gold Nanoparticles using Plant Extract: An Overview. *Nano Research & Applications*, 2015, vol. 1, no. 5.
- 27 Althaus JB, Kaiser M, Brun R, Jerz G, Schmidt TJ. Buxus alkaloids with antiparasitic activity: Cyclovirobuxein B shows strong and selective toxicity against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Planta Medica*, 2016, vol. 82(S01), no. SL43.
- 28 Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 2016, vol. 7(1), pp. 17–28. DOI:10.1016/j.jare.2015.02.007.
- 29 Ajebli M, Eddouks M. *Buxus sempervirens* L Improves Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus in Rats. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug. Targets.*, 2017, vol. 17(2), pp. 142–152. DOI: 10.2174/1871529X17666170918140817.

### Список цитированных источников

1. Корсун, В. Ф. Фитотерапия в комPLEMENTАРНОЙ медицине / В. Ф. Корсун, В. А. Куркин, Е. В. Корсун / Современные проблемы фитотерапии травничества // Материалы 3-го Международного съезда фитотерапевтов и травников. – М. : Институт фитотерапии. – 2013. – С. 83–93.
2. Дикорастущие полезные растения России / отв. ред. А. Л. Буданцев, Е. Е. Лесновская // СПб. : Изд-во СПХФА, 2001. – 663 с.
3. Кумышева, Л. А. Противовоспалительная и антибактериальная активность некоторых лекарственных растений и их сборов – перспективных мукозопротекторов / Л. А. Кумышева // Раст. ресурсы. – 2009. – Вып. 1. – С. 126–139.
4. Цыбикова, Э. Б. Динамика показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза в России в 2005 г. / Э. Б. Цыбикова, И. М. Сон // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – №3. – С. 8–11.
5. Водолозова, С. В. Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии / С. В. Водолозова, М. А. Мяделец, М. Р. Карпова, Ю. В. Саранчина // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – №2. – С. 54–58.
6. Selective cholinesterase inhibitors from *Buxus sempervirens* L. and their molecular docking studies / E. I. Orhan [et al.] // Current computer-aided drug design. – 2011. – 7(4). – P. 276–286.

7. Walde, A. Lateinisches etymologisches Wörterbuch / A. Walde // Carl Winter's Universitätsbuchhandlung. – 1938. – P. 125.
8. Frisk, H. Griechisches etymologisches Wörterbuch, Band II / H. Frisk // Heidelberg: Carl Winter's Universitätsbuchhandlung. – 1960. – P. 626.
9. Фасмер, М. Самшит / М. Фасмер // Этимологический словарь русского языка: в 4 т. / под ред. проф. Б. А. Ларина [т. I]. – изд. 2-е, стер. – М.: Прогресс. – 1986–1987.
10. Chemical constituents of *Buxus sempervirens* / D. Ahmed [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 1991. – Vol. 54(1). – P. 79–82.
11. Vikani, K.V. A pharmacognostic study on *Sphaeranthus indicus* / K. V. Vikani, R. D. Dangar, N. S. Kapadia, M. B. Shah // *J. Nat. Remed.* – 2008. – Vol. 8. – P. 61–67.
12. Осаки Ёсио. Красота сёги / Ё. Осаки // *The Japan Foundation Newsletter*. – Т. XXVI. – № 5. – 1999.
13. Abreu, A. C. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents / A. C. Abreu, A. J. McBain, M. Simões // *Nat Prod Rep.* – 2012. – Vol. 29. – P. 1007–1021. DOI: 10.1039/c2np20035j.
14. Bown, D. The Royal Horticultural Society Encyclopedia of Herbs and Their Uses / D. Bown // Dorling Kindersley Ltd. – London. – 1995. – 424 p.
15. Teall, E. K. Medicine and Doctoring in Ancient Mesopotamia / E. K. Teall // *Grand Valley Journal of History*. – 2014. – Vol. 3. – № 2.
16. Yadav and Munin Agarwala. Phytochemical analysis of some medicinal plants / Agarwala Yadav and Munin // *Journal of Phytology*. – 2011. – Vol. 3(12). – P. 10–14.
17. Marjorie, C. Plant products as antimicrobial agents / C. Marjorie // *Clinical Microbiol.* – 1996. – Vol. 12. – P. 564–582.
18. Geissman, T. A. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds / T. A. Geissman // *Pyrrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*. Elsevier, N. Y. – 1963. – Vol. 9. – P. 265.
19. Cowan, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents / M. M. Cowan // *Clin Microbiol Rev.* – 1999. – Vol. 12. – P. 564–582.
20. Mason, T. L., Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds / T. L. Mason, B. P. Wasserman // *Phytochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – P. 2197–2202.
21. Antibiotic activity and absolute configuration of 8S-heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diyne-1,8-diol from *Bupleurum salicifolium* / A. Estevez-Braun [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 1994. – Vol. 57. – P. 1178–1182.
22. Hassan, A. Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects / A. Hassan, S. Rahman, F. Deebe, S. Mahmud // *Medicinal Plants Research*. – 2009. – Vol. 3(1). – P. 20–23.
23. Middle Eastern Plant Extracts: An Alternative to Modern Medicine Problems / D. Varijakzhan [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 11–26.
24. Fouche, G. In vitro anticancer screening of South African plants / G. Fouche // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2008. – Vol. 119. – P. 455–461.
25. Rajan, R. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials / R. Rajan // *Industrial Crops and Products*. – 2015. – Vol. 70. – P. 356–373.
26. Shakeel, A. Synthesis of Gold Nanoparticles using Plant Extract: An Overview / S. Ahmed, S. Ikram // *Nano Research & Applications*. – 2015. – Vol. 1. – P. 5.
27. *Buxus* alkaloids with antiparasitic activity: Cyclovirobuxein B shows strong and selective toxicity against *Trypanosoma brucei rhodesiense* / J. B. Althaus [et al.] // *Planta Medica*. – 2016. – Vol. 82 (S01). – SL43.
28. Ahmed, S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise / S. Ahmed, M. Ahmad, B. L. Swami, S. Ikram // *Journal of Advanced Research*. – 2016. – Vol. 7(1). – P. 17–28. – DOI:10.1016/j.jare.2015.02.007.
29. Ajebli, M. *Buxus sempervirens* L Improves Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus in Rats / M. Ajebli, M. Eddouks // *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*. – 2017. – Vol. 17(2). – P. 142–152. – DOI: 10.2174/1871529X17666170918140817.



# АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

---

*Джаббар Мустафа Салех Джаббар*

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

**Введение.** В настоящее время антибиотики широко используются в качестве противомикробных средств. Однако развитие резистентности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам определяет поиск новых противомикробных препаратов среди фитопрепаратов.

**Цель научного обзора** – оценить состав и антимикробную активность растительных экстрактов, а также их терапевтические возможности при лечении состояний, связанных с нарушением анатомической целостности кожи.

**Заключение.** В наши дни стало известно, как много растений играют важную роль в медицине и терапии, поскольку части растений использовались во многих цивилизациях в древние и современные времена. Уже в древности самшит использовали в качестве лекарственного растения как средство от кашля, желудочно-кишечных заболеваний, а также хронических лихорадок, например малярии. Как средство от малярии он якобы сравним по действию с хинином. Из-за своей токсичности препараты самшита в наши дни применяются редко, так как их очень трудно точно дозировать. Передозировка может привести к рвоте, судорогам и даже смерти. Гомеопаты до сих пор используют самшит якобы как средство от ревматизма. Представленный обзор об антибактериальных и ранозаживляющих свойствах растительных экстрактов, свидетельствует о неоднозначности и противоречивости результатов исследований. Тем интереснее будут воспринимаемые результаты дальнейших исследований в этом направлении.

**Ключевые слова:** антимикробная активность, экстракт растений, лекарственные растения, свойства.

**Для цитирования.** Джаббар Мустафа Салех Джаббар. Антимикробная активность экстрактов растительного происхождения, перспективных для использования в медицинской практике / Джаббар Мустафа Салех Джаббар // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1(2). – С. 120–127.

*Поступила 09.01.2023*

**К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ  
ПРОФЕССОРА АЛЕКСАНДРА АЛЕКСАНДРОВИЧА ЧИРКИНА**

2 января 2023 года отмечено значимой датой для биохимической науки республики – 80-летний юбилей известного ученого-биохимика, доктора биологических наук, профессора Александра Александровича Чиркина.

Мы рады поздравить Александра Александровича с этой знаменательной датой. Сложно оценить огромный многолетний труд и бесценный научный опыт, который вложен профессором А. А. Чиркиным в развитие биохимической науки в Беларуси, в совершенствование образования молодого поколения, в подготовку научных кадров в области биомедицинской химии и молекулярной биологии.

Александр Александрович Чиркин – ученый, учитель, педагог, автор 810 научных публикаций, в том числе 31 монографии по специальности «Биохимия» и «Биология», включая «Клинический анализ лабораторных данных», учебники «Биохимия», «Биохимия филогенеза и онтогенеза», является автором 40 рационализаторских предложений, 11 авторских свидетельств и патентов.

Профессор А. А. Чиркин подготовил 2 докторов наук, 25 кандидатов наук, 40 магистров. Более 90 учащихся, с которыми он работал, – победители и призеры олимпиад по биохимии и молекулярной биологии.

Вся биография Александра Александровича неразрывно связана с научно-педагогической деятельностью в нашей стране: родился в г. Слуцке Минской области в 1943 году. В 1965 году с отличием

закончил лечебный факультет Витебского медицинского института. В 1968 г. защитил кандидатскую диссертацию «Возрастные особенности обмена веществ и некоторых метаболических реакций на алиментарную нагрузку липидами у крыс разного возраста», а в 1979 году – докторскую диссертацию «Метаболические реакции организма на различные варианты ультразвукового воздействия».

С 1983 года А. А. Чиркин заведовал кафедрой биохимии Витебского государственного медицинского института, с 2002 года – заведующий кафедрой химии учреждения образования «Витебский государственный университет имени П. М. Машерова». С 2015 г. – профессор кафедры химии и естественно-научного образования факультета химико-биологических и географических наук Витебского государственного университета имени П. М. Машерова.

Значимые научные достижения профессора А. А. Чиркина:

– созданы теория и практика амплитудно-модулированного ультразвука, разработана концепция радиационно-индуцированного атеросклероза (результат 35-летних исследований состояния обмена веществ у участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС, исследований по развитию метаболического синдрома у населения Витебской области);

– разработаны возрастные нормы биохимических показателей жителей Беларуси, опубликован комплекс оригинальных статей по биохимии спор-



та и монография по биохимии спорта в пубертатном периоде, запатентован препарат для коррекции инсулинорезистентности в эксперименте.

В области научной-педагогической деятельности нельзя не отметить предложенную профессором А. А. Чиркиным оригинальную концепцию подготовки биологов по специализации «Биохимия», издание учебника по биологической химии для студентов биологических специальностей, разработанный комплекс учебных пособий по биохимии для студентов первой и второй ступеней высшего образования.

Александр Александрович – идейный вдохновитель и непосредственный участник создания кластера «Союз медицинских, фармацевтических и научно-образовательных организаций «Медицина и фармацевтика – инновационные проекты».

Профессор А. А. Чиркин внес значимый вклад в восстановление и развитие в Республике Беларусь общественного объединения «Белорусское общество биохимиков и молекулярных биологов». Неоднократно как председатель конкурсной комиссии оценивал работы и награждал молодых биохимиков «За лучшую научную работу». Александр Александрович тесно сотрудничает с Институтом биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси.

Профессор А. А. Чиркин – Лауреат Государственной премии Республики Беларусь, отмечен нагрудными знаками «Отличник здравоохранения», «Отличник образования», «Изобретатель СССР». Имеет Почетное звание «Человек года Витебщины – 2018» и медаль Франциска Скорины за многолетний плодотворный труд, высокий профессионализм, заслуги в развитии сферы образования и науки (2020), нагрудный знак отличия Витебского государственного университета имени



П. М. Машерова «За адзнаку», награжден Почетной грамотой Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь за многолетнюю плодотворную работу по подготовке и аттестации научных и научно-педагогических кадров высшей квалификации.

Коллектив Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, члены Белорусского общества биохимиков и молекулярных биологов искренне поздравляют уважаемого Александра Александровича Чиркина с Юбилеем!

Ваше огромное трудолюбие, высокий научный и педагогический профессионализм, Ваша удивительная мудрость, доброжелательность, умение помочь, поддержать и быть рядом в сложную минуту вызывают восхищение и уважение. Мы благодарим Вас за Ваше нестандартное понимание и трактовку наших научных результатов, представленных в кандидатских и докторских диссертациях, за Ваши глубокие отзывы и рецензии на наши авторефераты, диссертации, монографии, которые нас радовали и озадачивали, помогали осознать себя участником большой биохимической науки. Спасибо за Ваше служение биохимической науке и огромный вклад в ее развитие!

Мы гордимся Вами, учимся у Вас и желаем Вам доброго здоровья и долголетия! Новых творческих идей и успехов во всех Ваших делах и начинаниях! С Юбилеем Вас!

*Коллектив сотрудников  
Института биохимии  
биологически активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси*

*Агейко Светлана Алексеевна* – научн. сотрудник; Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (220030, бульвар Ленинского комсомола, 50, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: swet.labor2010@yandex.by

*Svetlana A. Aheika* – researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (230030, 50, Bulvar Leninskogo Komsomola, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: swet.labor2010@yandex.by

*Адзержихо Игорь Эдуардович* – доктор мед. наук; ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (220013, ул. П. Бровки, 3, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: adzerikhoigor@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>

*Igor E. Adzerikho* – PhD, MD (Medicine), Professor, Professor at the Department of Clinical Pharmacology and Therapy; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (220013, 3, Brovki str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: adzerikhoigor@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>

*Аксёненко Ольга Сергеевна* – мл. научн. сотрудник; Институт радиобиологии НАН Беларуси (246007, ул. Фёдоровского, 4, г. Гомель, Республика Беларусь); e-mail: grebczovao@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9431-3758>

*Volha S. Aksionenka* – junior researcher, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (246007, 4, Fedyuninskogo str., Gomel, Republic of Belarus); e-mail: grebczovao@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9431-3758>

*Александров Денис Александрович* – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры нормальной физиологии УО «Белорусский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь (220083, пр. Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: dextran.by@gmail.com

*Denis A. Alexandrov* – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Normal Physiology of the Belarusian State Medical University of the Ministry of Health of the Republic of Belarus (220083, 83, Dzerzhinsky ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: dextran.by@gmail.com

*Али Адиб Хуссейн Али* – аспирант кафедры биохимии УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы» (230023, ул. Ожешко, 22, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: medic\_lab2015@yahoo.com

*Ali Adeeb Hussein Ali* – PhD student, Yanka Kupala State University of Grodno (230023, 22, Ozheshko str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: medic\_lab2015@yahoo.com

*Амаэбери Надежда Викторовна* – канд. биол. наук, доцент кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ (220030, пр-т. Независимости, 4, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: n.amaegberi@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8907-867X>

*Nadezda V. Amaegberi* – PhD (Biology), Associate Professor at the Department of Radiation Chemistry and Chemical-Pharmaceutical Technologies, Faculty of Chemistry, Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: n.amaegberi@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8907-867X>

*Бабарико Дарья Викторовна* – магистр биол. наук, мл. научн. сотрудник; УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория» (223040, а.г. Лесной, 31, Минский р-н, Республика Беларусь); e-mail: rlab@antidoping.by

*Darya V. Babaryko* – M.Sc. (Biology), Junior Researcher, National Anti-Doping Laboratory (223040, 31, Lesnoy, Minsk reg., Republic of Belarus); e-mail: rlab@antidoping.by

*Бабенко Андрей Сергеевич* – канд. хим. наук, доцент кафедры биоорганической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет» (220116, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, корпус 15, Республика Беларусь); e-mail: labmdbt@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

*Andrei S. Babenka* – PhD (Biology), Associate Professor of the Department of Bioorganic chemistry Belarusian State Medical University (220116, Dzerzhinsky ave., 83, build. 15, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: labmdbt@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

*Бакакина Юлия Сергеевна* – канд. биол. наук, вед. научн. сотрудник; УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория» (223040, а.г. Лесной, 31, Минский р-н, Республика Беларусь); e-mail: rlab@antidoping.by; <https://orcid.org/0000-0002-2948-4200>

*Yulia S. Bakakina* – PhD, Leading Researcher; National Anti-Doping Laboratory (223040, 31, Lesnoy, Minsk reg., Republic of Belarus); e-mail: rlab@antidoping.by; <https://orcid.org/0000-0002-2948-4200>

*Басалай Анастасия Александровна* – науч. сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси

(220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: anastasiya.basalay@gmail.com; <http://ocid.org/0000-0002-1878-9623>

*Anastasia A. Basalai* – Researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: anastasiya.basalay@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1878-9623>

*Батуревич Людмила Викторовна* – канд. мед. наук, доцент; Белорусская медицинская академия последипломного образования (220013, ул. П. Бровки, 3/3, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: ludmila-3114@tut.by; <https://orcid.org/0000-0003-0077-3137>

*Lyudmila V. Baturevich* – PhD (Medicine), Associate Professor, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (220013, 3/3, P. Brovki str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: ludmila-3114@tut.by; <https://orcid.org/0000-0003-0077-3137>

*Башилов Антон Вячеславович* – канд. биол. наук, доцент, вед. научн. сотрудник; Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (220012, ул. Сурганова, 2в, Минск, Республика Беларусь); <https://orcid.org/0000-0002-6413-9883>

*Anton V. Bashylau* – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher; Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (220012, 2v, Surganova str., Minsk, Republic of Belarus); <https://orcid.org/0000-0002-6413-9883>

*Блашко Андрей Сергеевич* – ассистент кафедры нормальной физиологии УО «Белорусский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь (220083, пр. Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: 220270@mail.ru

*Andrey S. Blazhko* – Assistant of the Department of Normal Physiology of the Belarusian State Medical University of the Ministry of Health of the Republic of Belarus (220083, 83, Dzerzhinsky ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: 220270@mail.ru

*Бойко Инна Ивановна* – ст. преп., УО «Белорусский государственный университет» (220030, пр. Независимости 4, Минск, Республика Беларусь); e-mail: boikoulyana03@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0000>

*Ina I. Boiko* – senior lecturer, Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: boikoulyana03@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3172-5146>

*Веялкина Наталия Николаевна* – канд. биол. наук, зав. лабораторией; Институт радиобиологии

НАН Беларуси; УО «Гомельский государственный медицинский университет» (246007, ул. Федюнинского 4, г. Гомель, Республика Беларусь); e-mail: veyalkina@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5016-6664>

*Natalia N. Veyalkina* – PhD (Biology), Head of the Laboratory of Experimental Biological Models, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus; Gomel State Medical University (246007, 4, Fedyuninskogo str., Gomel, Republic of Belarus); e-mail: veyalkina@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5016-6664>

*Виницкая Анна Георгиевна* – доктор мед. наук, профессор, доцент кафедры биологической химии; УО «Гродненский государственный медицинский университет» (230009, ул. Горького, 80, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: vinitckaya@tut.by

*Anna G. Vinitckaya* – Associate Professor of the Department of Biochemistry; Grodno State Medical University (230009, 80, Gorkogo str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: vinitckaya@tut.by

*Владимирская Татьяна Эрнстовна* – канд. биол. наук, руководитель отдела общей патологии научно-исследовательской лаборатории, вед. научн. сотрудник ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (220013, ул. П. Бровки, 3, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: tan\_2304@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>

*Tatyana E. Vladimirskaia* – PhD (Biology), Head of the Department of General Pathology, Leading Researcher; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (220013, 3, Brovki str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: tan\_2304@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>

*Вэлком Мэнизибэя Осайн* – канд. мед. наук, доцент, зав. кафедры физиологии человека НИЛ университета (Абуджа, Нигерия); e-mail: menimed1@yahoo.com

*Menizibeya Osain Welcome* – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Human Physiology; NILE University (Abuja, Nigeria); e-mail: menimed1@yahoo.com

*Готько Оксана Владимировна* – ст. научн. сотрудник; РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (223040, аг. Лесной, Минский район, Республика Беларусь); e-mail: babuka.05@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8083-0861>

*Oksana V. Gotko* – Senior Researcher of RSPC of oncology and medical radiology, (223040, at. Lyasnoy, Minsk district, Republic of Belarus); e-mail:

babuka.05@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6078-4447>

*Державец Лилия Александровна* – доктор биол. наук, зав. клинко-диагностической лабораторией; РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (223040, аг. Лесной, Минский район, Республика Беларусь); e-mail: dzerjavets@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-9246-4704>

*Lilija A. Derzhavets* – Ph.D. (Biology) Head of Clinical Diagnostic Laboratory RSPC of oncology and medical radiology (223040, at. Lyasnoy, Minsk district, Republic of Belarus); e-mail: dzerzhavets@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9246-4704>

*Джаббар Мустафа Салех Джаббар* – аспирант; Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (230030, бульвар Ленинского комсомола, 50, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: mustafasaleh340@gmail.com.

*Jabbar Mustafa Saleh Jabbar* – postgraduate student, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (230030, 50, Bulvar Leninskogo Komsomola, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: mustafasaleh340@gmail.com

*Дорошенко Евгений Михайлович* – доц. кафедры биологической химии; УО «Гродненский государственный медицинский университет», кандидат медицинских наук (230009, ул. Горького, 80, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: dgi03@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9939-8749>

*Evgeniy M. Doroshenko* – associate Professor of the Department of Biological Chemistry of the Educational Institution "GrSMU" (230009, 80, Gorky str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: dgi03@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9939-8749>

*Евсеев Андрей Викторович* – доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии, зав. научно-исследовательским центром ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, (Российская Федерация); e-mail: hypoxia@yandex.ru

*Andrey V. Evseev* – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Normal Physiology, Head of the Research Center of the Smolensk State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Russian Federation); e-mail: hypoxia@yandex.ru

*Жаворонок Ирина Петровна* – канд. биологических наук, зав. лабораторией модуляции функций организма; ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси» (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Бела-

русь); e-mail: iri8308@yandex.ru; <http://ocid.org/0000-0001-9982-0719>

*Irina P. Zhavoronok* – candidate of Biological Sciences of Belarus, Head of the Laboratory of Modulation of Body Functions; Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: iri8308@yandex.ru; <http://ocid.org/0000-0001-9982-0719>

*Кадушкин Алексей Геннадьевич* – канд. мед. наук, доцент; Белорусский государственный медицинский университет (220116, пр. Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: korridas@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1620-8477>.

*Aliaksei G. Kadushkin* – PhD (Medicine), Associate Professor; Belarusian State Medical University (220116, 83, Dzerzhynski ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: korridas@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1620-8477>.

*Карпушенко Вероника Сергеевна* – студентка химического факультета; Белорусский государственный университет (220030, пр. Независимости 4, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: karpushenkova.v.s@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8590-425X>.

*Veronika S. Karpushenkova* – student of Chemistry Department; Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: karpushenkova.v.s@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8590-425X>.

*Ковганко Николай Николаевич* – канд. хим. наук, доцент кафедры биологической химии; УО «Белорусский государственный медицинский университет» (220116, пр-т Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: mikalai44@tut.by; <https://orcid.org/0000-0002-3193-5955>

*Mikaiai M. Kauhanka* – PhD (Chemistry), associate professor of the department of biochemistry; Belarusian State Medical University (220116, 83, Dzerzhinsky ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: dashamurashka@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1890-6252>

*Колб Александр Владимирович* – канд. биол. наук, доцент кафедры биологической химии; УО «Белорусский государственный медицинский университет» (220116, пр-т Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: sanya.kolb@yandex.by; <https://orcid.org/0000-0003-1224-2878>

*Alexander V. Kolb* – Ph.D (Biology), Associate professor, Dep. of Biochemistry (biochemistry (220116, 83, Dzerzhinsky ave., Minsk, Republic of

Belarus); e-mail: sanya.kolb@yandex.by; <https://orcid.org/0000-0003-1224-2878>

*Коломиец Александра Олеговна* – мл. научн. сотрудник; Белорусская медицинская академия последипломного образования (220013, ул. П. Бровки, 3/3, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: sasha.kalacheva.97@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1578-8323>.

*Alexandra O. Kolomiets* – Junior Researcher; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (220013, 3/3, P. Brovki str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: sasha.kalacheva.97@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1578-8323>

*Костюченко Никита Сергеевич* – мл. науч. сотрудник; Институт физиологии НАН Беларуси (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: nkostuchenko888@gmail.com

*Mikita S. Kastsiuchenka* – Junior Researcher; Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: nkostuchenko888@gmail.com

*Курбат Михаил Николаевич* – доцент кафедры биологической химии; УО «Гродненский государственный медицинский университет», канд. мед. наук; зав. ЦНИЛ НИЧ УО «Гродненский государственный медицинский университет» (230009, ул. Горького, 80, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: vwmisha@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8518-2450>

*Mikhail N. Kurbat* – head of Research Laboratory of the Educational Institution "GrSMU"; Associate Professor of the Department of Biological Chemistry of the Educational Institution "GrSMU" (230009, 80, Gorky str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: vwmisha@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8518-2450>

*Лебедева Елена Ивановна* – канд. биол. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (210009, пр-т Фрунзе, 27, г. Витебск, Республика Беларусь); e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

*Elena I. Lebedeva* – PhD (Biology), Associate Professor of the Department of Histology, Cytology and Embryology Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (210009, 27, Frunze ave., Vitebsk, Republic of Belarus); e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

*Лелевич Владимир Валерьянович* – доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии

УО «Гродненский государственный медицинский университет» (230009, ул. Горького, 80, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: vlelevich@yandex.ru  
*Vladimir V. Lelevich* – Dr. Sc. (Medicine), Professor, Head of the Department of Biochemistry; Grodno State Medical University (230009, 80, Gorkogo str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: vlelevich@yandex.ru

*Лисовская Марина Владимировна* — научн. сотрудник; ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» (220141, ул. акад. В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, г. Минск, Республика Беларусь) e-mail: lisovskaya@iboch.by; <https://orcid.org/0000-0001-9035-8513>

*Maryna U. Lisouskaya* — researcher, Institute of bioorganic chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (220141, 5, Academician V. F. Kuprevich str., build. 2, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: lisovskaya@iboch.by; <https://orcid.org/0000-0001-9035-8513>

*Митюкова Татьяна Алексеевна* – канд. биол. наук, гл. науч. сотрудник; Институт физиологии НАН Беларуси (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: mityukovat@gmail.com

*Tatyana A. Mityukova* – PhD (Biology), Chief Researcher; Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: mityukovat@gmail.com.

*Михальчук Александр Леонидович* — канд. хим. наук, вед. научн. сотрудник; ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» (220141, ул. академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, г. Минск, Республика Беларусь) e-mail: lipmal@iboch.by; <https://orcid.org/0000-0003-4344-4616>

*Alexander L. Mikhal'chuk* – PhD in chemistry, leading researcher, Institute of bioorganic chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (220141, 5, Academician V. F. Kuprevich str., build. 2, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: – lipmal@iboch.by; <https://orcid.org/0000-0003-4344-4616>

*Мотолько Светлана Фёдоровна* – врач-кардиолог; УЗ «2-я городская клиническая больница г. Минска» (220030, ул. Энгельса, 25, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: mot.svet@mail.ru

*Svetlana F. Motolko* – cardiologist; 2nd City Clinical Hospital of Minsk (220030, 25, Engels str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: mot.svet@mail.ru

*Мурашко Дарья Игоревна* – аспирант кафедры биологической химии; УО «Белорусский государственный медицинский университет» (220116,

проспект Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: dashamurashka@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1890-6252>

*Darya I. Murashka* – aspirant of the department of biological chemistry; Belarusian State Medical University (220116, 83, Dzerzhinsky ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: dashamurashka@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1890-6252>

*Новицкий Илья Андреевич* – магистрант кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета; Белорусский государственный университет (220030, пр-т. Независимости, 4, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [ilya.nov42@gmail.com](mailto:ilya.nov42@gmail.com)

*Ilya A. Novitskiy* – Master student, Faculty of Chemistry, Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [ilya.nov42@gmail.com](mailto:ilya.nov42@gmail.com)

*Переверзев Владимир Алексеевич* – доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии; УО «Белорусский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь (220083, пр. Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [pereverzev2010@mail.ru](mailto:pereverzev2010@mail.ru); [pereverzevVA@bsmu.by](mailto:pereverzevVA@bsmu.by)

*Vladimir A. Pereverzev* – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Normal Physiology of the Belarusian State Medical University of the Ministry of Health of the Republic of Belarus (220083, 83, Dzerzhinsky ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [pereverzev2010@mail.ru](mailto:pereverzev2010@mail.ru); [pereverzevVA@bsmu.by](mailto:pereverzevVA@bsmu.by)

*Переверзева Елена Вячеславовна* – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры патологической физиологии; УО «Белорусский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь (220083, пр. Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [elenaVP2015@mail.ru](mailto:elenaVP2015@mail.ru)

*Elena V. Pereverzeva* – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology of the Belarusian State Medical University of the Ministry of Health of the Republic of Belarus (220083, 83, Dzerzhinsky ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [elenaVP2015@mail.ru](mailto:elenaVP2015@mail.ru)

*Пилотович Анастасия Станиславовна* – мл. научн. сотрудник; Институт радиобиологии НАН Беларуси (246007, ул. Федюнинского, 4, г. Гомель, Республика Беларусь); e-mail: [ms.pilotovich@list.ru](mailto:ms.pilotovich@list.ru); <https://orcid.org/0000-0002-8226-6843>

*Nastassia S. Pilotovich* – junior researcher, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (246007, 4, Fedyuninskogo str., Gomel,

Republic of Belarus); e-mail: [ms.pilotovich@list.ru](mailto:ms.pilotovich@list.ru); <https://orcid.org/0000-0002-8226-6843>

*Полукошко Елена Федоровна* – научн. сотрудник; Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [efpoluko@list.ru](mailto:efpoluko@list.ru); <https://orcid.org/0000-0003-2460-5242>

*Alena F. Palukoshka* – researcher; Institute of physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Academicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [efpoluko@list.ru](mailto:efpoluko@list.ru); <https://orcid.org/0000-0003-2460-5242>

*Полулях Ольга Евгеньевна* – науч. сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [oilipol@yandex.ru](mailto:oilipol@yandex.ru)

*Olga Y. Poluliakh* – Researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Academicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [oilipol@yandex.ru](mailto:oilipol@yandex.ru)

*Правдивцев Виталий Андреевич* – доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии; Смоленская государственная медицинская академия (214019, ул. Крупской, 28, г. Смоленск, Российская Федерация); email: [nau@sgma.info](mailto:nau@sgma.info)

*Vitaliy A. Pravdivtsev* – Doctor of Med. Sci., Professor, Head of the Dept. of Normal Physiology; Smolensk State Medical Academy (214019, 28, Krupskaya str., Smolensk, Russian Federation); e-mail: [nau@sgma.info](mailto:nau@sgma.info)

*Прохорова Виолетта Игоревна* – доктор мед. наук, профессор, зав. диагностическим отделом с группой лучевой диагностики; РНПЦ онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (223040, аг. Лесной, Минский район, Республика Беларусь); e-mail: [vprohorova@mail.ru](mailto:vprohorova@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-6078-4447>

*Violetta I. Prokhorova* – MD, professor, head of the diagnostic department with a block of radiation diagnostics; RSPC of oncology and medical radiology (223040, at. Lyasnoy, Minsk district, Republic of Belarus); e-mail: [vprohorova@mail.ru](mailto:vprohorova@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-6078-4447>

*Разводовский Юрий Евгеньевич* – канд. мед. наук, зав. отделом медико-биологических проблем алкоголизма ГП «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (230030, бульвар Ленинского комсомола, 50, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: [razvodovsky@tut.by](mailto:razvodovsky@tut.by)

*Yuri E. Razvedovsky* – Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Biomedical Problems of Alcoholism of Institute of Biochemistry



of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (230030, 50, Bulvar Leninskogo Komsomola, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: razvodovsky@tut.by

*Рудниченко Юлия Анатольевна* – канд. биол. наук, заведующий лабораторией; Институт физиологии НАН Беларуси (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: link060619@list.ru

*Yulia A. Rudnichenko* – PhD (Biology), Head of the Laboratory, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: link060619@list.ru

*Свирид Андрей Васильевич* – канд. хим. наук, доцент, ст. научн. сотрудник; Институт биоорганической химии НАН Беларуси (220141, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: svirid.andrei@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9035-1661>

*Andrey V. Svirid* – PhD, Associate Professor, Senior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, (220141, 5, Academician V. F. Kuprevich str., build. 2, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: svirid.andrei@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9035-1661>

*Семенкова Галина Николаевна* – канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ (220030, пр-т. Независимости, 4, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: galina\_semenkova@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-6048-4383>

*Galina N. Semenкова* – PhD (Biology), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Radiation Chemistry and Chemical-Pharmaceutical Technologies, Faculty of Chemistry; Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Belarus); e-mail: galina\_semenkova@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-6048-4383>

*Семенчук Анна Константиновна* – преподаватель кафедры общей и биоорганической химии; УО «Гродненский государственный медицинский университет» (230009, ул. Горького, 80, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: annasemenchuk24@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4844-5127>

*Anna K. Semenchuk* – the university teacher of the department of General and bioorganic chemistry of Grodno State Medical University (230009, 80, Gorkogo str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: annasemenchuk24@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4844-5127>

*Серебро Алла Михайловна* – врач-кардиолог; УЗ «Минская областная больница» (223041, аг. Лесной, 1, Минский район, Республика Беларусь); e-mail: dr.allaserabro@gmail.com

*Alla M. Serebro* – cardiologist; Minsk Regional Hospital (223041, 1, Lesnoy, Minsk district, , Republic of Belarus); e-mail: dr.allaserabro@gmail.com

*Сикорский Анатолий Викторович* – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры детских болезней №2; УО «Белорусский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь (220083, пр. Дзержинского, 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: sikorski@bsmu.by

*Anatoly V. Sikorski* – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Children's Diseases No. 2 of the Belarusian State Medical University of the Ministry of Health of the Republic of Belarus (220083, 83, Dzerzhinsky ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: sikorski@bsmu.by

*Смирнов Виталий Юрьевич* – ст. науч. сотрудник, доцент; Гродненский государственный медицинский университет (230009, ул. Горького, 80, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: vit\_sm@mail.ru

*Vitali Yu. Smirnov* – Senior Researcher, Assistant Professor. Grodno State Medical University (230009, 80, Gorkogo str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: vit\_sm@mail.ru

*Степура Виталий Иванович* – канд. физ.-мат. наук, доцент, вед. науч. сотрудник; Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (230023, ул. Ожешко, 22, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: stsiapura@gmail.com

*Vitali I. Stsiapura* – Ph. D. (Phys. and Math.), Associated Professor, Leading researcher. Yanka Kupala Grodno State University (230023, 22, Ozheshko str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: stsiapura@gmail.com.

*Степура Иван Иванович* – канд. биол. наук, доцент, вед. научн. сотрудник; Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (230030, бульвар Ленинского комсомола, 50, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: scepura@gmail.com.

*Ivan I. Stepuro* – Ph. D. (Biol.), Associated Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (230030, 50, Bulvar Leninskogo Komsomola, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: scepura@gmail.com

*Столярчук Анна Петровна* – студентка химического факультета; Белорусский государствен-

ный университет (220030, пр. Независимости 4, Минск, Республика Беларусь); e-mail: stoliarchuk.anna@outlook.com; <https://orcid.org/0000-0001-8102-5282>

*Anna P. Stolyarchuk* – student of Chemistry Department; Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: stoliarchuk.anna@outlook.com; <https://orcid.org/0000-0001-8102-5282>

*Сяхович Виталий Эдуардович* – зав. научно-исследовательской лабораторией; Национальная антидопинговая лаборатория (223040, а.г. Лесной, 31, Минский р-н, Республика Беларусь); e-mail: rlab.head@antidoping.by

*Vitaly E. Syakhovich* – Head of the Research Laboratory, National Anti-Doping Laboratory (223040, 31, Lesnoy, Minsk reg., Republic of Belarus); e-mail: rlab.head@antidoping.by

*Таганович Анатолий Дмитриевич* – доктор биол. наук, профессор, зав. кафедрой биологической химии; Белорусский государственный медицинский университет (220116, пр. Дзержинского 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: a.taganovich@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-0668-2888>

*Anatolyi D. Tahanovich* – Doctor of Med. Sci., Professor, Head of the department of Biochemistry, Belarusian State Medical University (220116, 83, Dzerzhynski ave., Minsk, Republic of Belarus); email: a.taganovich@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-0668-2888>

*Терпинская Татьяна Ильинична* – канд. биол. наук, вед. научн. сотрудник; ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси» (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь), e-mail: terpinskayat@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4536-3580>

*Tatiana I. Terpinskaya* – PhD in Biology, leading researcher, Institute of physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Academicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: terpinskayat@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4536-3580>

*Тихинская Дарья Вячеславовна* – студент 4 курса кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ (220030, пр-т. Независимости, 4, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: tikhinskaya333@mail.ru

*Daria V. Tikhinskaya* – 4th year student, Faculty of Chemistry, Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: tikhinskaya333@mail.ru

*Тумилович Анастасия Михайловна* – научн. сотрудник; Институт биоорганической химии НАН Беларуси (220141, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: tumilovicham@gmail.com

*Anastasiya M. Tumilovich* – Researcher; Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (220141, 5, Academician V. F. Kuprevich str., build. 2, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: tumilovicham@gmail.com

*Фалетров Ярослав Вячеславович* – канд. хим. наук, доцент; Белорусский государственный университет (220030, пр. Независимости, 4, г. Минск, Республика Беларусь); Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физикохимических проблем» (220006, ул. Ленинградская, 14, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: yaroslav82@tut.by; <https://orcid.org/0000-0001-8168-5897>

*Yaroslav V. Faletrov* – PhD (Chemistry), Associate Professor; Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti Avenue, Minsk, Republic of Belarus); Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University (220006, 14, Leningradskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: yaroslav82@tut.by; <https://orcid.org/0000-0001-8168-5897>

*Фатыхова Светлана Анатольевна* – ст. научн. сотрудник лаборатории физико-химических методов исследований; ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (220141, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: iboh\_lfhi@rambler.ru, 0000-0002-6104-6008

*Sviatlana A. Fatykhava* – senior researcher, Laboratory of Physical and Chemical Research Methods, Institute of Bioorganic Chemistry, NASB (220141, 5, Academician V. F. Kuprevich str., build. 2, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: iboh\_lfhi@rambler.ru, 0000-0002-6104-6008

*Филина Нина Ивановна* – ст. преподаватель кафедры общей и биоорганической химии; УО «Гродненский государственный медицинский университет» (230009, ул. Горького, 80, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: nina-filina-2017@mail.ru

*Nina I. Filina* – senior lecturer of the Department of General and Bioorganic Chemistry of the Educational Institution "GrSMU" (230009, 80, Gorky str., Grodno, Republic of Belarus); e-mail: nina-filina-2017@mail.ru

*Хотько Екатерина Александровна* – канд. мед. наук, ассистент; Белорусский государственный медицинский университет (220116, пр. Дзержинского 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: qwert.poilk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8630-7692>

*Ekaterina A. Khotko* – PhD (Medicine), Assistant; Belarusian State Medical University (220116, 83, Dzerzhynski ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [qwert.poilk@mail.ru](mailto:qwert.poilk@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0001-8630-7692>

*Черней Ирина Сергеевна* – магистр биол. наук, аспирант; Полесский государственный университет (225710, ул. Днепровской флотилии, 23, г. Пинск, Республика Беларусь); e-mail: [semitcko.i@yandex.ru](mailto:semitcko.i@yandex.ru); <https://orcid.org/0000-0002-6626-7651>

*Iryna S. Chernei* – Master of Biological Sciences, PhD student; Polessky State University (225710, 23, Dneprovskaya flotilla str., Pinsk, Republic of Belarus); e-mail: [semitcko.i@yandex.ru](mailto:semitcko.i@yandex.ru); <https://orcid.org/0000-0002-6626-7651>

*Чещевик Виталий Тадеушевич* – канд. биол. наук; Полесский государственный университет (225710, ул. Днепровской флотилии, 23, г. Пинск, Республика Беларусь); e-mail: [cheshchevik.v@polessu.by](mailto:cheshchevik.v@polessu.by)

*Vitaliy T. Cheshchevik* – PhD (Biological); Polessky State University (225710, 23, Dneprovskaya flotilla str., Pinsk, Republic of Belarus); e-mail: [cheshchevik.v@polessu.by](mailto:cheshchevik.v@polessu.by)

*Чудиловская Екатерина Николаевна* – научн. сотрудник; Институт физиологии НАН Беларуси (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [e.chudilovskaya@gmail.com](mailto:e.chudilovskaya@gmail.com)

*Katerina N. Chudilovskaya* – Researcher; Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [e.chudilovskaya@gmail.com](mailto:e.chudilovskaya@gmail.com)

*Шабеев Глеб Витальевич* – студент Белорусского государственного медицинского университета (220116, пр. Дзержинского 83, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [glebshab@mail.ru](mailto:glebshab@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-9795-0648>

*Gleb V. Shabaev* – student of Belarusian State Medical University (220116, 83, Dzerzhynski ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [glebshab@mail.ru](mailto:glebshab@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-9795-0648>

*Шабуня Полина Станиславовна* – канд. биол. наук, вед. научн. сотрудник лаборатории физико-химических методов исследований; ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (220141, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, Минск, Республика Беларусь); e-mail: [pshabunya@rambler.ru](mailto:pshabunya@rambler.ru); <https://orcid.org/0000-0002-5650-8538>

*Polina S. Shabunya* – candidate of Biological Sciences of Belarus, leading researcher, Laboratory of Physical and Chemical Research Methods; Institute of Bioorganic Chemistry, NASB (220141, 5, Academician

V. F. Kuprevich str., build. 2, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [pshabunya@rambler.ru](mailto:pshabunya@rambler.ru); <https://orcid.org/0000-0002-5650-8538>

*Шилейко Ирина Дмитриевна* – канд. мед. наук, доцент; Белорусская медицинская академия последипломного образования (220013, ул. П. Бровки, 3/3, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [irina.shileiko@yandex.by](mailto:irina.shileiko@yandex.by); <https://orcid.org/0000-0002-8726-8776>

*Irina D. Shileiko* – PhD (Medicine), Associate Professor; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (220013, 3/3, P. Brovki str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [irina.shileiko@yandex.by](mailto:irina.shileiko@yandex.by); <https://orcid.org/0000-0002-8726-8776>

*Шкель Татьяна Владимировна* – канд. хим. наук, научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (220141, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, Минск, Республика Беларусь); e-mail: [tvshkel@gmail.com](mailto:tvshkel@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-9239-0437>

*Tatsiana V. Shkel* – PhD, Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (220141, 5, Academician V. F. Kuprevich str., build. 2, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [tvshkel@gmail.com](mailto:tvshkel@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-9239-0437>

*Шкуматов Владимир Макарович* – доктор биол. наук, профессор; Белорусский государственный университет (220030, пр. Независимости, 4, г. Минск, Республика Беларусь); Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» (220006, ул. Ленинградская, 14, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [biopharm@bsu.by](mailto:biopharm@bsu.by); <https://orcid.org/0000-0003-1652-5701>

*Vladimir M. Shkumatov* – PhD (Biology), Professor; Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Republic of Belarus); Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University (220006, 14, Leningradskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [biopharm@bsu.by](mailto:biopharm@bsu.by); <https://orcid.org/0000-0003-1652-5701>

*Шулганова Анна Витальевна* – студент 5 курса кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ (220030, пр-т. Независимости, 4, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [annshulhanova@gmail.com](mailto:annshulhanova@gmail.com)

*Anna V. Shulhanova* – 5th year student, Faculty of Chemistry; Belarusian State University (220030, 4, Nezavisimosti ave., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [annshulhanova@gmail.com](mailto:annshulhanova@gmail.com)

*Шутова Анна Геннадьевна* – канд. биол. наук, доцент, зав. лабораторией оранжерейных растений; Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (220012, ул. Сурганова, 2в, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [anna\\_shutova@mail.ru](mailto:anna_shutova@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0001-5312-0880>

*Hanna G. Shutava* – candidate of Biological Sciences of Belarus, Associate Professor, Head of the Laboratory of Greenhouse Plants; Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences (220012, Surganova str., 2v, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [anna\\_shutova@mail.ru](mailto:anna_shutova@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0001-5312-0880>

*Щастный Анатолий Тадеушевич* – доктор мед. наук, профессор, ректор, зав. кафедрой хирургии ФПК и ПК; УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (210009, пр-т Фрунзе, 27, г. Витебск, Республика Беларусь); e-mail: [admin@vsmu.by](mailto:admin@vsmu.by); <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

*Anatoly T. Shchastniy* – MD (Medicine), Professor, rector, Head of the Chair of Hospital Surgery with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (210009, 27, Frunze ave., Vitebsk, Republic of Belarus); e-mail: [admin@vsmu.by](mailto:admin@vsmu.by); <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

*Щемелев Владислав Михайлович* – мл. научн. сотрудник; Институт радиобиологии НАН Беларуси (246007, ул. Федюнинского, 4, г. Гомель, Республика Беларусь); e-mail: [shemelev\\_vlad@mail.ru](mailto:shemelev_vlad@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-5552-0965>

*Vladislav M. Schemelev* – junior researcher; Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (246007, 4, Fedyuninskogo str., Gomel, Republic of Belarus); e-mail: [shemelev\\_vlad@mail.ru](mailto:shemelev_vlad@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-5552-0965>

*Янцевиц Алексей Викторович* – канд. хим. наук, директор; Институт биоорганической химии НАН Беларуси (220141, ул. Купревича, 5/2, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: [al.yantsevich@gmail.com](mailto:al.yantsevich@gmail.com)

*Aleksey V. Yantsevich* – Ph.D. (Chemistry), Director; Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus (220141, 5/2, Kuprevicha str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [al.yantsevich@gmail.com](mailto:al.yantsevich@gmail.com)

*Янченко Татьяна Леонидовна* – мл. научн. сотрудник; Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси (220072, ул. Академическая, 28, г. Минск, Республика Беларусь), e-mail: [tanyaya190@gmail.com](mailto:tanyaya190@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-9577-1013>

*Tatsiana L. Yanchanka* – junior researcher; Institute of physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (220072, 28, Akademicheskaya str., Minsk, Republic of Belarus); e-mail: [tanyaya190@gmail.com](mailto:tanyaya190@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-9577-1013>

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы подтверждают, что материалы представленных статей ранее нигде не были опубликованы и не представлены на рассмотрение для публикации в другом журнале.

The authors have no conflicts of interest to declare.

The authors confirm that the materials of the presented papers have not been published elsewhere and have not been under consideration for publication in other journal.

# ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА «БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ» / INFORMATION FOR AUTHORS OF THE «BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY» JOURNAL

Журнал «Биохимия и молекулярная биология» публикует оригинальные результаты исследований в области медицины и биологии, клинические исследования, научные обзоры и лекции, посвященные актуальным проблемам биохимии и биохимическим аспектам молекулярной биологии, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии и биомедицинских наук, хроники событий научной жизни, юбилеи. Статьи публикуются на белорусском, русском и английском языках.

В своей редакционной политике журнал «Биохимия и молекулярная биология» следует принципам и правилам международных ассоциаций Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), European Association of Science Editors (EASE), а также требованиям Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь.

Редакция журнала «Биохимия и молекулярная биология» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Если рукопись им не соответствует, статья не будет принята к рассмотрению.

1. Текст статьи должен быть набран в редакторе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, размером 14 пунктов с одинарным межстрочным интервалом без переносов. Ширина поля слева – 3 см, сверху и снизу – 2 см, справа – 1,5 см; абзацный отступ – 1 см, выравнивание – по ширине. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. Объем научной статьи должен составлять не менее 0,35 авторского листа (14 000 знаков с пробелами). Общий объем оригинальных статей не должен превышать 10 страниц, включая рисунки, таблицы, список цитированных источников; научных обзоров и лекций – 15 страниц.

3. Статья должна иметь следующую структуру:

- индекс по Универсальной десятичной классификации (УДК);
- название статьи (до 10–12 слов, без аббревиатур);
- инициалы и фамилия автора (авторов);
- полное наименование учреждений, где работают авторы, с указанием города и страны;
- резюме (не более 1500 знаков с пробелами), которое должно быть структурировано (введение, цель исследования, материалы и методы, результа-

ты, заключение, ключевые слова от 3 до 9) и кратко представлять результаты работы и быть понятным, в том числе и в отрыве от основного текста статьи;

- информация о статье на английском языке (для статей, предоставленных на белорусском (русском) языках): название статьи, фамилия и инициалы автора (авторов), полное наименование учреждений, где работают авторы, с указанием города и страны, резюме (англоязычная версия резюме статьи должна по смыслу и структуре (Background, Objective, Material and Methods, Results, Conclusions, Keywords) полностью соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка (статьи, представленные на английском языке, должны содержать информацию о статье на белорусском (русском) языке);

- основной текст статьи;
  - благодарности: если присутствует информация о финансировании (поддержке грантами проектов и т. п.), ее следует давать на русском (белорусском) и английском языках под заголовками «Благодарности» («Падзякі»), «Acknowledgements»;
  - конфликт интересов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»);
  - список цитированных источников;
  - список цитированных источников в романском алфавите («References»);
  - сведения об авторах на русском и английском языках: для каждого автора следует указать фамилию, имя и отчество (полностью), звание, должность, место работы с указанием полного адреса, адрес электронной почты, личный идентификатор ORCID (Open Researcher and Contributor ID). Для оперативной связи с редакцией указывается контактный номер телефона ответственного автора (в журнале не публикуется). Образец оформления статьи размещен на сайте журнала.
4. Основной текст статьи должен быть четко структурированным: введение, цель исследования, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение (выводы). В русско- и белорусскоязычных статьях подрисуночные подписи, заголовки и примечания таблиц следует делать на двух языках – русском (белорусском) и английском. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами. Если

рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник и представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию. Рисунки представляются отдельными файлами (.tif, .jpg) с разрешением не менее 300 dpi.

5. В клинических и экспериментальных работах в разделе «Материалы и методы» необходимо указание на соответствие принципам экспериментальной и клинической биоэтики. Редакция вправе потребовать от авторского коллектива информацию об утверждении протокола исследования в этическом комитете с обязательным указанием названия комитета (и организации, при котором комитет создан), даты и номера протокола заседания, на котором проведение исследования было одобрено. Раздел «Материалы и методы» должен содержать подробное изложение используемой аппаратуры и методик исследования, критерии отбора животных и больных, количество и характеристику пациентов, с разбивкой их по полу и возрасту, если это требуется для исследования. Обязательно указывается принцип разбиения пациентов на группы, а также дизайн исследования. Следует назвать все используемые в ходе работы лекарственные препараты и химические вещества, включая их международное непатентованное (общепринятое) название, дозы, пути введения.

6. Список цитированных источников (для оригинальных статей – не более 25 источников, для обзоров – не более 50 источников) оформляется в соответствии с требованиями Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь, предъявляемых к диссертационным работам (приказ ВАК от 25.06.2014 № 159 (в редакции приказа ВАК 08.09.2016 № 206)). Цитированная литература приводится общим списком по мере упоминания, ссылки в тексте даются порядковым номером в квадратных скобках (напр., [1]); ссылки на неопубликованные работы не допускаются). В список цитируемой литературы рекомендуется включать преимущественно работы, опубликованные в течение последних 5–7 лет, за исключением редких и высокоинформативных работ. Не рекомендуется ссылаться на тезисы конференций, съездов, учебники, учебные и методические пособия, справочники, неопубликованные работы, рукописи авторефератов диссертаций или сами диссертации.

7. Список цитированных источников в романском алфавите («References»). Библиографическое описание оформляется в соответствии со стандартом National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Статья, опубликованная на латинице (английском, немецком и др.) описывается на оригинальном языке; статья,

опубликованная на кириллице (русский, белорусский, украинский язык) транслитерируется: <http://translit.net>. Название цитируемой работы указывается в транслитерации, а затем на английском языке (если есть официальный перевод) в квадратных скобках. Название цитируемого издания (журнала) указывается в транслитерации, а затем на английском языке (если есть официальный перевод) в квадратных скобках. Не допускается сокращение названия русскоязычного журнала. Названия иностранных журналов могут представляться в сокращенном варианте в соответствии с каталогом названий базы данных MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). Если журнал не индексируется в MEDLINE, необходимо указывать его полное название. В описании статьи приводятся фамилии и инициалы всех (!) авторов. При наличии у цитируемого источника DOI (цифрового идентификатора объекта) его в обязательном порядке необходимо указать в конце библиографической ссылки.

8. Статья должна иметь сопроводительное письмо (образец размещен на сайте журнала), подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа, а также экспертное заключение о возможности опубликования материалов в печати. В сопроводительном письме должно быть указано, является ли данная статья исследованием, выполненным в рамках диссертационной работы.

9. Статья и сопроводительные документы могут быть направлены на бумажном носителе в 2 экземплярах в адрес редакции (230009, пл. Тызенгауза, 7, г. Гродно, Республика Беларусь, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, редакция журнала «Биохимия и молекулярная биология»). Электронный вариант статьи обязателен и направляется по адресу [journal@ibiochemistry.by](mailto:journal@ibiochemistry.by) с пометкой «Статья в журнал "Биохимия и молекулярная биология"» и указанием фамилии первого автора. Статья должна быть подписана всеми авторами.

10. Направление в редакцию ранее опубликованных или уже принятых к печати в других изданиях работ не допускается. За направление в редакцию уже ранее опубликованных статей или статей, принятых к печати другими изданиями, ответственность несут авторы. Не принимаются статьи с нарушением правил и норм гуманного обращения с биологическими объектами исследований.

11. Все научные статьи, поступившие в редакцию журнала, проходят обязательное рецензирование. Рецензирование статей осуществляется членами редакционной коллегии, а также приглашенными рецензентами.

12. Если по рекомендации рецензента рукопись возвращается автору на доработку, датой поступления считается день получения редакцией окончательного варианта рукописи вместе с ответом на все замечания рецензента.

13. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи. Рукописи, в которых будут обнаружены некорректные заимствования (плагиат), снимаются с рассмотрения.

14. Публикация статей осуществляется бесплатно. Возможна публикация статей во внеочередном порядке (за оплату, безналичный расчет, после согласования с редакцией).

15. Рассмотрение статей на предмет публикации осуществляется после предоставления копии квитанции о подписке на журнал. Статьи рекламного характера и иные виды рекламной информации публикуются после предварительной оплаты.

Институт биохимии биологически активных соединений  
Национальной академии наук Беларуси  
Беларусь, г. Гродно, пл. Антония Тызенгауза, 7  
Телефон/факс: +375152559075  
<https://ibiochemistry.by/>



## Спрей с антибактериальным эффектом

(средство для обработки рук и кожных покровов)



Защита от 99,9 %  
вирусов, бактерий  
и грибков



Антисептический  
эффект до 3-х часов



Увлажнение и защита  
кожи от негативных  
факторов внешней среды



Без ощущения липкости

**Состав:** изопропиловый спирт, глицерин, перекись водорода, вода, ароматизатор.

**Назначение:** гигиеническая обработка рук, для туалета кожи (в том числе гигиенического).

**Преимущества:** не обладает местно-раздражающим, кожно-резорбтивным и сенсибилизирующим действием, средство биоразлагаемо, не загрязняет окружающую среду.

**Срок годности:** 3 года, при температуре +5...+25 °С, для наружного применения.

**Формы выпуска:** флаконы полимерные от 60 мл.

**Применение:** нанести спрей, распределить до его полного высыхания.



**Обработывайте руки правильно!**

**Обработка рук осуществляется в течение 30 секунд!**



Том / Vol. 2 • № 1(2)/2023

Биохимия и молекулярная биология • Biochemistry and Molecular Biology

Подписные индексы:  
для индивидуальных подписчиков 00990  
для ведомственных подписчиков 009902

Subscription indexes  
For individuals 00990  
For legal entities 009902

