

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ

Сборник материалов Международной научной конференции, посвященной 85-летию  
со дня рождения профессора В. К. Кухты

(Минск, 25 января 2022 г.)



Под редакцией А. Д. Тагановича, Н. Н. Ковганко, В. В. Хрусталёва



Минск БГМУ 2022

УДК 61:577.1(06)  
ББК 28.072  
С 23

**Редакционная коллегия:** заведующий кафедрой биологической химии, д.м.н., профессор А. Д. Таганович; заведующий кафедрой общей химии, к.б.н., доцент В. В. Хрусталёв; заведующий кафедрой биоорганической химии, к.м.н., доцент О. Н. Ринейская; к.х.н., доцент Н.Н.Ковганко; к.м.н., доцент И.Л.Котович; к.м.н., доцент Е.А. Девина, Д. И. Мурашко.

**Рецензенты:** д.м.н., профессор А. Д. Таганович; к. х. н., доцент Н. Н. Ковганко; к. м. н., доцент И. Л. Котович; к. б. н., доцент В. В. Хрусталева; к. м. н., доцент О. Н. Ринейская.

Современные проблемы медицинской биохимии [Электронный ресурс]: сборник материалов Международной научной конференции, посвященной 85-летию со дня рождения профессора В.К.Кухты, Республика Беларусь, г. Минск, 25 января 2022 г. / под ред. А.Д.Тагановича, Н.Н.Ковганко, В.В.Хрусталева. – Минск: БГМУ, 2022. – 337 с. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

**ISBN 978-985-21-0945-1.**

Ответственность за содержание публикаций и допущенные ошибки несут авторы.

Ответственные за издание: заведующий кафедрой биологической химии, д.м.н., профессор А. Д. Таганович; к. х. н., доцент Н. Н. Ковганко, Д. И. Мурашко.

Представленные результаты исследований относятся к области медицинской биологической химии.  
Предназначено для широкого круга научных работников.

ISBN 978-985-21-0945-1



9 789852 109451

УДК 61:577.1(06)  
ББК 28.072  
С 23

© УО «Белорусский государственный  
медицинский университет», 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Аль Зубаиди А. Х. А. А., Канунникова Н. П. <b>ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ И ЛИПИДОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА И ГИПОТИРЕОЗЕ У ПАЦИЕНТОВ В ИРАКЕ</b> .....	9
Аль Меселмани М. А. <b>СОСТОЯНИЕ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ТКАНЯМИ СЕМЕННИКОВ У КРЫС ПРИ ДОЗЕ 0,5 ГР ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВНЕШНЕГО <math>\gamma</math>- ОБЛУЧЕНИЯ</b> .....	15
Байда А.В., Степанова Ю.И., Кузнецова Н.Б., Капустина Е.В. <b>СОСТОЯНИЕ ЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА У ЛИЦ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С НОРМАЛЬНОЙ И ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА</b> .....	18
Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Лычковская М.А. <b>НОВЫЙ СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ, ПОЗВОЛЯЮЩИЙ ИЗУЧИТЬ АДАПТАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА</b> .....	24
Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Лычковская М.А. <b>ИЗМЕНЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА И ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ В СРАВНИТЕЛЬНОМ АСПЕКТЕ</b> .....	26
Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Лычковская М.А. <b>ЭФФЕКТЫ ВВЕДЕНИЯ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ У КРЫС</b> .....	31
Бурлака А.П, Бурлака А.А., Ганусевич И.И. <b>РАДИКАЛЫ КИСЛОРОДА ОПУХОЛЕВОЙ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ, НЕЙТРОФИЛОВ И ТРОБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ</b> .....	37
Войнаровский В.В., Вчерашняя А.В., Мартинович Г.Г. <b>РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГЕМОЛИЗЕ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА</b> .....	44
Галюк Е.Н., Ринейская О.Н. <b>ПЕРВИЧНАЯ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТОМ ЦИСПЛАТИН И ЕГО НЕАКТИВНЫМ АНАЛОГОМ ТРАНСПЛАТИНОМ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ</b> .....	50
Горудко И.В., Григорьева Д.В., Живолковская А.Д., Реут В.Е., Графская Е.Н., Лацис И.А., Горбунов Н.П., Костевич В.А., Соколов А.В., Панасенко О.М., Лазарев В.Н. <b>ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ <i>HIRUDO MEDICINALIS</i> НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ</b> .....	56
Грищенко Л.Н., Борисевич С.Н. <b>РОЛЬ БИОМАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ</b> .....	62
Губич О.И., Павловский С.В., Федькович Д.И.	

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

<b>ВЛИЯНИЕ АСПАЛАТУСА ЛИНЕЙНОГО (<i>ASPALATHUS LINEARIS</i>) НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРФАГИЕЙ.....</b>	<b>69</b>
Губич О.И., Игнацкая А.Ю., Станкевич И.В.	
<b>ИЗУЧЕНИЕ АДАПТОГЕННЫХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ГИНОСТЕММЫ ПЯТИЛИСТНОЙ (<i>GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM</i>) И АСПАЛАТУСА ЛИНЕЙНОГО (<i>ASPALATHUS LINEARIS</i>) НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИНТЕНСИВНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ</b>	<b>73</b>
Данченко Е. О.	
<b>УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВАЯ КИСЛОТА И РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ .....</b>	<b>78</b>
Девина Е. А, Ванда А.С., Малькевич Л.А.	
<b>ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГЕМОКОАГУЛЯЦИИ ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ СО СПОРТИВНЫМ АНАМНЕЗОМ .....</b>	<b>83</b>
Зинчук В. В, Билецкая Е. С.	
<b>ИЗМЕНЕНИЕ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОЗОНА ПРИ ГИПЕРКАПНЕМИИ .....</b>	<b>89</b>
Зорина Т. Е., Кравченко И. Е., Ермилова Т. И., Шман Т. В., Кустов А. В., Березин Д. Б., Зорин В. П.	
<b>ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ АМИНОПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА E<sub>6</sub> И ИХ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ.....</b>	<b>93</b>
Зубрицкая Г.П., Нападковская К.Д., Слобожанина Е.И., Найда Н. Н., Климович Е.С., Григоренко Е.А., Митьковская Н.П.	
<b>ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ АНТИОКСИДАНТНЫХ И МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ .....</b>	<b>99</b>
Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Талабаева Э.И., Пластинина А.В., Левандовская О.В.	
<b>ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА ВЫРАБОТКУ ПРОВΟΣПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ.....</b>	<b>106</b>
Камионская М. В., Созарукова М. М. Проскурнина Е. В.	
<b>МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ГЕМОГЛОБИН/ГИДРОПЕРОКСИД ФОСФАТИДИЛХОЛИНА/КУМАРИН 334 .....</b>	<b>112</b>
Карпович О.А.	
<b>ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ МЕЛАТОНИНА У ПАЦИЕНТОВ С ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНЬЮ .....</b>	<b>117</b>
Клачек В. С., Котович И.Л., Рутковская Ж.А.	
<b>ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ ЗАЩИТУ НОВОРОЖДЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОКСИИ.....</b>	<b>122</b>
Коваль А. Н.	

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

- РИСК РАЗВИТИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, СВЯЗАННЫХ С УРОТЕЛИАЛЬНОЙ  
КАРЦИНОМОЙ, НА ОСНОВАНИИ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ГУАНИНА В  
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ГУАНИНОВЫХ КВАДРУПЛЕКСАХ ..... 127**  
Ковганко Н.Н., Таганович А.Д., Прохорова В.И., Мурашко Д.И., Колб А.В., Готько О.В.
- ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ НА РАННИХ  
СТАДИЯХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО НА ОСНОВАНИИ  
КОМПЛЕКСНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ CYFRA 21-1 И РЕЦЕПТОРОВ CXCR1,  
CXCR2, CD44v6 В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ..... 129**  
Ковганко Н.Н., Таганович А.Д., Прохорова В.И., Мурашко Д.И., Постоляко  
С.А., Герасименко А.М., Готько О.В., Державец Л.А.
- УРОВЕНЬ РЕЦЕПТОРА CXCR2 У ПАЦИЕНТОВ С АДЕНОКАРЦИНОМОЙ И  
ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ..... 134**  
Котович И. Л., Рутковская Ж. А., Таганович А. Д.
- СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ АЛЬФА-  
ТОКОФЕРОЛ И РЕТИНОИДЫ, НА УРОВЕНЬ ФОСФОЛИПИДОВ СУРФАКТАНТА  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИИ ..... 139**  
Кочнева Е. М., Созарукова М. М. Проскурнина Е. В.
- ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА В  
ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ..... 145**  
Людчик Т.Б., Артюшкевич А.С., Степанова Ю.И., Насибянец Н.В., Матюшев Л.И.,  
Перепелица М.С.
- МАРКЕРЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ COVID-19 АССОЦИИРОВАННЫХ  
ЛИМФАДЕНИТАХ..... 150**  
Люзина К.М., Чергейко М.С.
- АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ИНДЕКСОВ РИТМОВ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ ПРИ  
ПОТРЕБЛЕНИИ ПИЩИ ..... 156**  
Макаревич В. В., Хотько Е. А.
- ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ IL-10 КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ  
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ..... 16459**  
Макаревич Д.А., Рябцева Т.В., Ковганко Н.Н., Штемплук Р.Г.
- ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ АКРИЛАМИДНЫХ СОПОЛИМЕРОВ С  
НАНОАЛМАЗАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО РАЗЛОЖЕНИЯ  
..... 164**  
Марцинкевич А. Ф., Фомченко Г. Н., Буянова С. В.
- МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПОДОБИЕ 6-ТЕТРАГИДРОГАРМОЛА И ТАБЕРНАНТАЛОГА,  
СИНТЕТИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА СЕРОТОНИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА ..... 169**  
Мурашко Д.И., Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Аркадьев К. А.
- ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ХЕМОКИНА  
CXCL8 И ЕГО РЕЦЕПТОРА CXCR1 В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С  
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО ..... 174**  
Мурашко Д.И., Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Прохорова В. И., Готько О. В.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

<b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМБИНАЦИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОПУХОЛЕВОГО МЕТАБОЛИЗМА В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО .....</b>	<b>180</b>
<b>Мурина М. А. Рошупкин Д. И, Буравлева К. В., Аносов А.К., Сергиенко В. И. КОВАЛЕНТНЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА: МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МИШЕНЯМИ, КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ СВОЙСТВ.....</b>	<b>188</b>
<b>Мышковец Н. С.</b>	
<b>ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ОКИСЛЕНИЕМ И НЕКОТОРЫМИ МОРФОМЕТРИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ СЛИЗИСТОЙ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ В ДОЗЕ 1 ГР.....</b>	<b>193</b>
<b>Никитина И.А., Грицук А.И.</b>	
<b>ИЗМЕНЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ТИМОЦИТОВ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИНИТРИТА .....</b>	<b>197</b>
<b>Пашкова О.Л.</b>	
<b>НОВЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСТВОРИМОГО РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА .....</b>	<b>203</b>
<b>Пашковская И.Д., Нечипуренко Н.И., Степанова Ю.И., Сидорович Р.Р., Ахремчук А.И., Прокопенко Т.А.</b>	
<b>БИОХИМИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ АНЕВРИЗМАТИЧЕСКИХ СУБАРАХНОИДАЛЬНЫХ КРОВОИЗЛИЯНИЙ .....</b>	<b>208</b>
<b>Пинчук П.Ю., Чиркин А.А.</b>	
<b>МОДЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КАТАБОЛИЗМА МОЛЕКУЛ.....</b>	<b>213</b>
<b>Побойнев В.В., Хрусталёв В.В.</b>	
<b>ОСОБЕННОСТИ КОЙЛА, СПОСОБНОГО К СТРУКТУРНОМУ ПЕРЕХОДУ В ПОЛНОСТЬЮ НЕУПОРЯДОЧЕННОЕ СОСТОЯНИЕ .....</b>	<b>219</b>
<b>Пойменова Ю. А., Созарукова М. М. Проскурнина Е. В.</b>	
<b>МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ С УЧАСТИЕМ ТИОЛОВ.....</b>	<b>224</b>
<b>Прокопенко Т.А., Нечипуренко Н. И., Батян А. И.</b>	
<b>ВЗАИМОСВЯЗЬ БИОХИМИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНЫМИ АНЕВРИЗМАМИ И РАЗВИТИЕМ ОТСРОЧЕННОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ .....</b>	<b>229</b>
<b>Проскурнина Е. В., Гришина Н. К., Созарукова М. М., Подлепич В. В., Портнова Г. В.</b>	
<b>ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЛАЗМЫ ПАЦИЕНТОВ В КОМЕ .....</b>	<b>235</b>
<b>Прохорова В.И., Готько О.В., Таганович А.Д., Ковганко Н.Н.</b>	
<b>ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ ХЕМОКИНОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....</b>	<b>241</b>

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Прохорова В.И., Красный С.А., Державец Л.А., Цырусъ Т.П., Грачев Ю.Н., Готько О.В., Грицкова О.А.

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ С ПОМОЩЬЮ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РОСТА (BDNF, NGF- $\beta$ , CNTF) У ПАЦИЕНТОВ С ГЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....245**

Реут В.Е., Григорьева Д.В., Горудко И.В.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ pH НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФЕНОКСАЗИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ НОСЛ .....251**

Рутковская Ж.А., Котович И.Л., Дубейко А.В, Таганович А.Д.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕТИНОИДОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ ПРОТЕАЗЫ/АНТИПРОТЕАЗЫ В ЛЕГКИХ МОРСКИХ СВИНОК В ДИНАМИКЕ ГИПЕРОКСИИ.....255**

Рябцева Т.В., Таганович А.Д.

**ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ИЛ-6 В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА .....261**

Семенович Д.С., Лукиенко Е.П., Канунникова Н.П., Мойсеенок А.Г.

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО БАЛАНСА В КРОВИ И ТКАНЯХ КРЫС С ЛИМФОСАРКОМОЙ NK/Ly ПРИ ДЕЙСТВИИ ДОКСОРУБИЦИНА, ПАНТЕНОЛА И ЦИСТЕАМИНА .....267**

Sozarukova M. M., Chilikina P.A, Skachko N.A., Novikov D.O., Proskurinana E. V.

**EFFECT OF UV IRRADIATION ON FLUORESCENCE AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF  $\gamma$ -GLOBULINS.....273**

Таганович А.Д., Прохорова В.И., Мурашко Д.И., Ковганко Н. Н., Можяева А. А., Готько О.В., Державец Л.А.

**НIF-1 $\alpha$ , РЕЦЕПТОР CD44v6, ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО .....277**

Таганович А. Д., Колб А. В.

**КУХТА ВИКТОР КЛИМЕНТЬЕВИЧ – ПЕДАГОГ, УЧЕНЫЙ, ЧЕЛОВЕК.....281**

Терпинская Т.И., Янченко Т.Л., Радченко А.В., Кохановский А.И., Полукошко Е.Ф., Артемьев М.В.

**РЕГУЛИРОВАНИЕ ДИНАМИН-ЗАВИСИМОГО ЭНДОЦИТОЗА.....285**

Терпинская Т.И., Янченко Т.Л., Радченко А.В., Полукошко Е.Ф., Артемьев М.В.

**УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ В ПОГЛОЩЕНИИ НАНОЧАСТИЦ КЛЕТКАМИ .....290**

Федорова М. В., Созарукова М. М., Сапрыкин В. П., Проскурнина Е. В.

**ВЛИЯНИЕ МЕКСИДОЛА НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПРОФИЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС В МОДЕЛИ ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ.296**

Хотько Е.А., Таганович А. Д., Мурашко М. А.

**СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С ВЕРОЯТНОСТЬЮ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ .....302**

Хрусталева В. В., Хрусталева Т. А.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

<b>ДИЗАЙН ВАКЦИННОГО ПЕПТИДА ИЗ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА H5N6 .....</b>	<b>306</b>
<b>Чиркин А.А., Степанова Н.А., Чиркина А.А.</b>	
<b>МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ И ЗАНЯТИЯ СПОРТОМ.....</b>	<b>312</b>
<b>Чиркин А.А., Степанова Н.А., Чиркина А.А., Алтани Мершид Сулеман</b>	
<b>БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ЗАНЯТИЯХ СПОРТОМ В ПУБЕРТАТНОМ ВОЗРАСТЕ.....</b>	<b>318</b>
<b>Шевляков В. В., Баранов С. А.</b>	
<b>БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС КАК ОТРАЖЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОРГАНИЗМ ИНГАЛЯЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВО-АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЫЛИ СУХИХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОКА .....</b>	<b>324</b>
<b>Шейбак В. М., Павлюковец А. Ю., Смирнов В. Ю.</b>	
<b>КОМБИНАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ И ЦИНКА АСПАРТАТА УВЕЛИЧИВАЕТ ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШКАХ..</b>	<b>329</b>
<b>Яцковская Н. М.</b>	
<b>ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ТОНУСА СОСУДОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СТРЕССА У КРЫС .....</b>	<b>332</b>



**ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ И ЛИПИДОВ  
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА И ГИПОТИРЕОЗЕ У ПАЦИЕНТОВ  
В ИРАКЕ**

*Аль Зубаиди А.Х.А.А.,  
аспирант учреждения образования «Гродненский государственный  
университет имени Я.Купалы», г. Гродно, Беларусь;  
Diwaniyah Teaching Hospital Laboratory, Diwaniyah, Iraq,  
ali605783@gmail.com;*

*Канунникова Н.П.,  
д.б.н., профессор, профессор кафедры технологии, физиологии и гигиены  
питания учреждения образования «Гродненский государственный  
университет имени Я.Купалы», г. Гродно, Беларусь;  
n.kanunnikova@grsu.by*

*Рассмотрены особенности изучения показателей обмена углеводов и  
липидов у пациентов в Ираке с сахарным диабетом 2 типа (СД2) и гипотиреозом.  
Выявлено широкое распространение дислипидемии и гипергликемии, избыточной  
массы тела, что может способствовать развитию СД2. В свою очередь,  
гипергликемия может играть роль в возникновении дисфункции щитовидной  
железы у пациентов с диабетом, особенно у женщин.*

**Ключевые слова:** *углеводы; липиды; сахарный диабет; гипотиреоз*

**PECULIARITIES OF THE EXCHANGE OF CARBOHYDRATES AND  
LIPIDS IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND HYPOTHYROIDISM IN  
PATIENTS IN IRAQ**

*Al Zubaidi A.H.A.A.,  
graduate student of the Educational Institution «Yanka Kupala's Grodno State  
University», Grodno, Belarus;  
Diwaniyah Teaching Hospital Laboratory, Diwaniyah, Iraq,  
ali605783@gmail.com;*

*Kanunnikova N.P.,  
Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of  
Technology, Physiology and Hygiene of Nutrition of the Educational Institution  
«Yanka Kupala's Grodno State University», Grodno, Belarus;  
n.kanunnikova@grsu.by*

*The features of the study of indicators of carbohydrate and lipid metabolism in  
patients in Iraq with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and hypothyroidism are  
considered. Revealed widespread dyslipidemia and hyperglycemia, overweight, which  
can contribute to the development of T2DM. In turn, hyperglycemia may play a role in  
the onset of thyroid dysfunction in diabetic patients, especially women.*

**Key words:** *carbohydrates; lipids; diabetes mellitus type 2; hypothyroidism*

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

Постоянное употребление высококалорийной пищи и малоподвижный образ жизни вылились в эпидемию сахарного диабета 2 типа (СД2), которой, по прогнозам, к 2020 году подвергнется около 300 миллионов человек во всем мире [1]. Нарушение секреции инсулина приводит к различным метаболическим aberrациям при СД2, включая гипергликемию из-за недостаточного инсулино-стимулированного поглощения глюкозы и повышенного производства глюкозы в печени, а также дислипидемии, которая включает нарушение гомеостаза жирных кислот, триглицеридов и липопротеинов [2]. Инсулинорезистентность играет важную роль в развитии гипотиреоза у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, что, в свою очередь, приводит к обострению дислипидемии, гипертонии и сердечно-сосудистых заболеваний [2- 4]. Распространенность дисфункции щитовидной железы среди пациентов с сахарным диабетом составляет от 11,2% до 17,5% в Индии, Иордании и других странах [3, 6, 7]. В связи с тем, что СД2 составляет серьезную проблему для населения многих арабских стран и стран Африки [6-9], нами были исследованы показатели обмена углеводов и липидов в крови мужчин и женщин с СД2 и гипотиреозом в Ираке, полученные в клинической лаборатории Diwaniyah Teaching Hospital Laboratory (Diwaniya, Ирак).

**Материалы и методы исследования.** Нами были проанализированы данные лабораторных исследований показателей углеводного и липидного обменов у 93 мужчин и 107 женщин с установленными диагнозами СД2, гипотиреоз, СД2 + гипотиреоз, а также пациентов без эндокринной патологии (условный контроль). Возраст обследованных был от 38 до 45 лет.

Содержание общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), уровень глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA1c) определяли с использованием наборов для химического анализа "Ruby" на модульном анализаторе Cobas 6000 («Roche Diagnostics», Швейцария) с использованием биохимического модуля (Modular P800, Cobas 501) в плазме венозной крови. Подсчитывали индекс массы тела (ИМТ) и индекс атерогенности (ИА). Статистическую обработку данных проводили с использованием бутстреппированного t-теста. Количественные показатели представлены в виде медианы, нижней и верхней квартили. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

Анализ данных лабораторных исследований липидного обмена у исследованных нами групп пациентов показал, что большинство изученных нами показателей липидного обмена соответствует референтным значениям для населения данной географической и климатической зоны (таблица 1) [1]. Обнаружены лишь более высокое содержание ЛПНП и триглицеридов у женщин, а также более высокие значения индекса атерогенности и у мужчин, и у женщин. В группе СД2 у мужчин и особенно у женщин содержание холестерина и триглицеридов было ниже, а уровень ЛПВП выше, чем в контрольной группе. Соответственно индекс атерогенности в группе СД2 был

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

ниже, чем в контрольной группе. В то же время при гипотиреозе этот индекс был практически в 2 раза выше референтных значений, но был несколько ниже при сочетании СД2+гипотиреоз. Необходимо отметить, что индекс массы тела у пациентов с гормональной патологией составлял от 27,6 до 31,6, а в группе условного контроля — 28,9 — 28,4, что свидетельствует об общей тенденции к избыточной массе тела у людей данной возрастной группы в Ираке.

**Таблица 1.** – Показатели липидного обмена у пациентов с СД2, гипертиреозом, гипотиреозом и комбинации гипотиреоз + СД2

Показатели	Пол	СД2	Гипотиреоз	СД2 + гипотиреоз	Контроль	Референтные значения
n	м	23	18	25	27	
	ж	27	32	25	23	
ИМТ	м	27,9 (24,7/32,5)	27,6 (23,2/29,8)	29,5 (25,2/32,7)	28,9 (26,3/32,4)	18 – 25
	ж	27,3 (21,6/30,1)	31,6 (25,7/33,4)	28,3 (24,2/31,6)	28,4 (24,6/33)	
ХС, мг/дл	м	164 (133/184) *	287 (192/320) *	199 (182/347)	174 (164/276)	120-250
	ж	157 (128/188) *	232 (166/300)	187 (170/336)	251 (165/373)	
ЛПВП, мг/дл	м	45 (37,5/53,5) *	36 (33/41)	31 (30/35,2)	33 (31/34)	30-85
	ж	51 (39,2/61,8) *	36,5 (30,5/39,5)	30 (24/31,8)	32 (31/36,2)	
ЛПНП, мг/дл	м	123 (102/228)	105 (68/155)	135 (116/293)	111 (99,5/210)	60-160
	ж	123 (108/199)	151 (102/199)	129 (104/268)	193 (106/286)	
ТГ, мг/дл	м	111 (84/180) *	188 (123/342)	179 (129/366)	189 (173/228)	35-200
	ж	123 (105/179)*	214 (170/307)	291 (140/466)	289 (145/320)	
ИА	м	2,51 (,85/3,03) *	6,43 (5,47/9,06) *	5,29 (4,18/11,2) *	4,23(3,95/7,73)	<3,1
	ж	2,12 (1,4/3,29)*	6,1 (3,8/8,7) *	4,73 (4,36/12,3) *	6,91 (2,94/11)	

Примечание: \* P <0,05 по сравнению с контролем (парный Bootstrap t-тест)

Несмотря на отсутствие достоверных различий содержания глюкозы и гликированного гемоглобина в крови пациентов всех исследованных групп, отмечен очень большой разброс индивидуальных значений глюкозы (таблица 2).

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Так, в контрольной группе у мужчин мин/макс значения различаются в 2,5 раза, у женщин — в 2 раза. При этом средние значения в контрольной группе превышают содержание глюкозы в норме почти в 2 раза у мужчин и на 25 % у женщин. Наиболее низкий уровень глюкозы выявлен в группе пациентов с СД2, который у женщин соответствует нормальным значениям и несколько выше нормы у мужчин.

**Таблица 2.** – Показатели углеводного обмена в крови пациентов с СД2, гипертиреозом, гипотиреозом и комбинации гипотиреоз + СД2

Показатели	пол	СД2	СД2 + гипотиреоз	Контроль	Референтные значения
Глюкоза, мг/дл	м	153 (98,5/257)	166 (114/212)	211 (126/296)	<120
	ж	121 (89/202)	197 (87,8/249)	158 (106/204)	
HbA1c, %	м	7,5 (6,5/10,5)	7,5 (6,5/9,6)	10 (7/11,4)	<6,5
	ж	7 (5,62/9)	9 (6,5/10,5)	7,5 (6,62/9,38)	

В группах с СД2+гипотиреоз содержание глюкозы чаще всего значительно выше нормы. Соответственно и процент гликированного гемоглобина оказался близок к нормальным значениям у пациентов с СД2, но был повышен в контрольной группе у мужчин.

Большую роль в распространении метаболических нарушений у населения в Ираке, как и во многих других странах [6, 7, 8, 9, 10, 11], играют особенности питания, для которого характерны избыток жиров и простых углеводов в ежедневном рационе. Анализ значений уровней глюкозы у отдельных пациентов позволяет предположить, что очень небольшое количество пациентов приходит сдавать кровь натощак.

Изучение пищевого рациона пациентов с помощью анкетирования, проведенное одним из авторов данной работы, показало значительное превышение количества простых углеводов и животных жиров в суточном рационе по сравнению с гигиеническими нормами. По-видимому, этим объясняется высокий уровень глюкозы в крови у большого процента лиц контрольной группы. Значения глюкозы, близкие к референтным, выявлены преимущественно у людей с установленным СД2, что может быть следствием успешной лекарственной коррекции гипергликемии при диабете. Интересно отметить, что именно в этой группе отмечаются более низкие значения холестерина и триглицеридов, но более высокие — ЛПВП, чем в контрольных группах мужчин и женщин, что сопровождается более низкими значениями индекса атерогенности у пациентов с СД2.

**Заключение.** Широкое распространение среди населения Ирака дислипидемии и гипергликемии, избыточной массы тела, тесно связанных с

национальными особенностями пищевого рациона, может вносить существенный вклад в провоцирование повреждений функции поджелудочной железы и развитие СД2. В свою очередь, плохой гликемический контроль может играть роль в возникновении дисфункции щитовидной железы у пациентов с диабетом, особенно у женщин [11]. Эти результаты свидетельствуют о необходимости тщательного контроля уровня глюкозы, гликированного гемоглобина и показателей обмена липидов у пациентов даже при отсутствии жалоб на эндокринную патологию, что может способствовать более раннему выявлению выявлению данных заболеваний и своевременной терапии метаболических нарушений.

### Список литературы

1. National Institute of Healthcare and Excellence. Type 2 diabetes in adults: management. 2015. <https://www.nice.org.uk/guidance/ng28/resources/type-2-diabetes-in-adults-management-pdf-1837338615493>. Accessed 14 Feb 2019.
2. Khatiwada, S. Thyroid dysfunction in metabolic syndrome patients and its relationship with components of metabolic syndrome / S. Khatiwada [et al.] / Clin Diabetes Endocrinol.— 2016.—V.2:3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5471726/>.
3. Wang, C. The relationship between type 2 diabetes mellitus and related thyroid diseases / C. Wang // J Diabetes Res.— 2013. —390534. doi: 10.1155/2013/390534 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647563/>.
4. Demitrost, L. Thyroid dysfunction in type 2 diabetes mellitus: a retrospective study / L. Demitrost, S. Ranabir // Indian J. Endocrinol. Metab.—2012.—V.16.—S334—S335.
5. Mehalingam, V. Thyroid dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and its association with diabetic complications / V. Mehalingam [et al.] // J. Family Med. Prim. Care // —2020. —V. 9(8). — P.4277–4281.
6. Elgazar, E.H. Thyroid dysfunction prevalence and relation to glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus / E. H. Elgazar [et al.] // Diabetes Metab. Syndr. —2019.—V.13.—P.2513–2517.
7. Ghazali, S.M. Thyroid dysfunction in type 2 diabetics seen at the University College Hospital, Ibadan, Nigeria / S. M. Ghazali, F. M. Abbiyesuku // Niger J. Physiol. Sci.— 2010.—V.25.—P.173–179.
8. Chen, H.S. Subclinical hypothyroidism is a risk factor for nephropathy and cardiovascular diseases in type 2 diabetic patients / H. S. Chen [et al.] Diabet Med.— 2007.—V.24.—P.1336–1344.
9. Ozair, M. Prevalence of thyroid disorders in north Indian type 2 diabetic subjects: A cross sectional study / M. Ozair [et al.] // Diabetes Metab. Syndr. —2018.—V.12.—P.301–304.
10. Jali, M.V. Prevalence of thyroid dysfunction among type 2 diabetes mellitus patients / M. V. Jali [et al.] Diabetes Metab. Syndr. —2017.—V.11(Suppl 1). —S105–8.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

11. Radaideh, A.R. Thyroid dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus in Jordan / A. R. Radaideh [et al.] Saudi Med. J.— 2004.—V.25.—P.1046–1050.

**СОСТОЯНИЕ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ТКАНЯМИ  
СЕМЕННИКОВ У КРЫС ПРИ ДОЗЕ 0,5 ГР ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО  
ВНЕШНЕГО Г- ОБЛУЧЕНИЯ**

*Аль Меселмани Моханад Али*

*к. б. н., ассистент каф. биохимии и биоинформатики,  
УО «Полесский государственный университет»,  
Беларусь, Пинск  
drtmouhand78@inbox.ru*

*В работе показано, что на 10 и 90 сутки после однократного внешнего  $\gamma$ -облучения крыс-самцов в дозе 0,5 Гр изменяются показатели потребления кислорода тканями семенников, обнаруживаются разобщение окислительного фосфорилирования и изменение энергетического метаболизма в ткани семенников. Воздействие малых доз  $\gamma$ - облучения на энергическое состояние и процесс окислительного фосфорилирования является одной из причин дисфункции семенников.*

**Ключевые слова:** *семенники; кислород; окисление; малые дозы гамма-радиации; белые крысы*

**THE STATE OF OXYGEN CONSUMPTION BY TESTICULAR  
TISSUES IN RATS AT A DOSE OF 0.5 GY AFTER A SINGLE EXTERNAL  $\gamma$ -  
IRRADIATION**

*Al Meselmani Mohanad Ali*

*Ph.D in Biochemistry, Assistant of the department of Biochemistry and  
Bioinformatics  
Polessky State University, Belarus, Pinsk  
drtmouhand78@inbox.ru*

*The work shows that on the 10th and 90th days after a single external gamma irradiation of male rats at a dose of 0.5 Gy, the oxygen consumption indicators of the testicular tissues change, the separation of oxidative phosphorylation and a change in energy metabolism in the testicular tissue are detected. The effect of low doses of gamma radiation on the energetic state and the process of oxidative phosphorylation is one of the causes of testicular dysfunction.*

**Key words:** *testis, oxygen, oxidation, low doses  $\gamma$ -radiation, albino rats.*

**Актуальность.** Последствия воздействия радиации на организм в целом и её влияние на половые железы в частности углублённо изучаются исследователями уже на протяжении нескольких десятилетий. Результаты этих изысканий нашли отражение в научных публикациях биологической и медицинской направленности. Ранее показано [13,4], что митохондрии являются одной из внутриклеточных мишеней низкодозового радиационного воздействия [1]. В связи с этим, целью данной работы послужило изучение изменения

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

потребления кислорода полярографическим методом в тканях семенников крыс после однократного  $\gamma$ -облучения в дозе 0,5 Гр.

**Материалы и методы:** Опыты проводились на 34 белых крысах-самцах весом 220-240 г. Животных однократно облучали на установке «ИГУР-1», источник  $^{137}\text{Cs}$  в дозе 0,5 Гр (мощность дозы 0,92 Гр/мин). Животных забивали на 10 и 90 сутки после облучения и извлекали семенники, продавливали через плунжер с диаметром отверстий 0.5 мм. Анализ дыхательной активности ткани семенников проводили полярографическим методом по ранее описанной методике с использованием электрода Кларка в среде Хенкса при  $t - 25^\circ \text{C}$  [1]. Определяли скорость потребления кислорода (скорость дыхания) на эндогенных ( $V_{\text{энд}}$ ), и экзогенных (сукцинит) субстратах ( $V_{\text{як}}$ ), (глутамат) ( $V_{\text{глу}}$ ) и 2,4-ДНФ ( $V_{\text{днф}}$ ), которую выражали в нМ  $\text{O}_2/\text{мин}$  мг белка [1]. Измерение содержания белка в пробе белка проводили биуретовым методом. Наряду с этим рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты –  $\text{СД}_{\text{як}} = V_{\text{як}}/V_{\text{энд}}$ ,  $\text{СД}_{\text{глу}} = V_{\text{глу}}/V_{\text{энд}}$  и 2,4-динитрофенола –  $\text{СД}_{\text{дн}} = V_{\text{днф}}/V_{\text{глу}}$ . Статистическая обработка выполнялась с помощью компьютерной программы Statistica for Windows 6.0.

**Результаты и обсуждение:** в ходе экспериментов после общего однократного внешнего низкодозового  $\gamma$ -облучения в дозе 0,5 Гр были выявлены достоверные изменения показателей потребления кислорода тканями семенников. Так, на 10-е и 90-е сутки после облучения достоверно возрастала скорость потребления кислорода препаратами ткани семенников на эндогенных субстратах с  $3,19 \pm 0,02$  нМ  $\text{O}_2/\text{мин}$  мг белка в контроле до  $5,75 \pm 0,05$  (+80,3 %) и до  $4,77 \pm 0,09$  (+49,6 %), соответственно. Сходные изменения обнаружены при использовании субстрата экзогенного сукцината, глутамата и 2,4-ДНФ. Так, достоверно возрастала  $V_{\text{як}}$  с  $6,74 \pm 0,11$  в контроле до  $7,30 \pm 0,20$  (+35,2 %) и  $8,23 \pm 0,10$  (+72,5%), и также  $V_{\text{глу}}$  с  $5,23 \pm 0,14$  в контроле до  $8,09 \pm 0,25$  (+54,7%) и  $6,81 \pm 0,08$  (+30,2 %), соответственно. Кроме того, отмечена выраженная тенденция увеличения скорости потребления кислорода препаратами в присутствии 2,4-ДНФ до  $7,29 \pm 0,17$  (+66,8%) и  $8,79 \pm 0,21$  (+101,1%) соответственно для групп животных на 10-е и 90-е сутки после облучения против  $4,37 \pm 0,08$  в контроле.

Вышеизложенное свидетельствует об общем увеличении потребления кислорода тканями семенников, что свидетельствует о высокой чувствительности семенников к внешнему радиационному воздействию.

Вместе с тем коэффициент  $\text{СД}_{\text{як}}$  и  $\text{СД}_{\text{глу}}$  достоверно снижался с  $2,11 \pm 0,10$  и  $1,54 \pm 0,07$  в контроле до  $1,27 \pm 0,02$  (-39,8%) и  $1,72 \pm 0,04$  (-18,5%) и  $1,33 \pm 0,02$  (-13,6%) и  $1,38 \pm 0,01$  (-10,4%), соответственно, для групп животных на 10-е и 90-е сутки после облучения, что может отражать увеличение эндогенных пулов этих субстратов. Описанные изменения митохондриального окисления происходили на фоне разобщения окислительного фосфорилирования в ткани семенников, на что указывает снижение показателя  $\text{СД}_{\text{днф}}$  до  $1,21 \pm 0,01$  (-11,6%) и  $1,18 \pm 0,03$  (-



13,9%) в обеих облученных группах соответственно против  $1,37 \pm 0,05$  в контроле.

Обнаруженная стимуляция дыхательной активности ткани семенников при облучении животных обусловлена, вероятно, активацией свободно-радикального окисления липидов мембран, белков митохондрий [1,2,3,4,5], образованием пероксидных продуктов, изменяющих баланс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и вызывающих разобщение окислительного фосфорилирования.

**Заключение.** Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что по прошествии 10-е и 90-е суток после радиационного воздействия в ткани семенников животных сохраняются выраженные нарушения митохондриального окисления, что, в конечном итоге, может отразиться на состоянии репродуктивного здоровья человека и животных.

### Список литературы:

1. Альжабар, А. Митохондриальное окисление селезёнки крыс в условиях инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  / А. Альжабар, А. Абдулкадер // Проблемы здоровья и экологии. – 2007. – № 14. – С.145–149.
2. Мишкина Л.Н. Регуляция окислительных процессов в тканях мышевидных грызунов отловленных в зоне Аварии на ЧАЭС/ А.Г. Кудяшева, Н.Г.Загорская, А.И.Таскаев // Радиационная биология и радиозащита – 2006. - № 2. - С. 216-232.
3. Dainiak N. Mechanism of radiation Injury: Impact of Molecular Medicine. Stem Cells- 1997.- №2.- P:1-5.
4. Gehlot P., Soyol D., Goyal P.K. Alterations in oxidative stress in testes of swiss albino Mice by aloe vera leaf extract after gamma irradiation // Pharmacologyonline. – 2007. – №1. – P. 359-370.
5. Grace J. Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability, /Kim Krish Chandrasekaran and William F.Morgan //Mutagenesis -2006.- №.6.- P: 361-367.

**СОСТОЯНИЕ ЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА У ЛИЦ ПОЖИЛОГО  
ВОЗРАСТА С НОРМАЛЬНОЙ И ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА**

**Байда А.В.**

*к. м. н., доцент кафедры общей врачебной практики  
УО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г.  
Минск, Беларусь  
alvab@tut.by;*

**Степанова Ю.И.**

*к. м. н., доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской  
лаборатории УО «Белорусская медицинская академия последипломного  
образования»,  
г. Минск, Беларусь  
st.juli@tut.by;*

**Кузнецова Н.Б.**

*к. м. н., доцент кафедры общей врачебной практики  
УО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Беларусь  
gerontby@rambler.ru;*

**Капустина Е.В.**

*врач клинико-диагностической лаборатории  
учреждения здравоохранения  
«10-я клиническая больница г.Минска», г. Минск, Беларусь  
karustinae@tut.by*

*В данной статье представлен анализ состояния липидного метаболизма у лиц пожилого возраста с нормальной и избыточной массой тела без эндокринной патологии и сахарного диабета в анамнезе. Оценивали индекс массы тела и окружность талии, а также изучали следующие клинико-лабораторные показатели сыворотки крови: лептин, общий холестерин, липопротеины высокой и низкой плотности, триглицериды, коэффициент атерогенности. У лиц пожилого возраста с избыточной массой тела выявлено нарушение состояния липидного метаболизма с развитием гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии и повышением уровня лептина, что связано с возможной лептинорезистентностью у этой категории пациентов.*

**Ключевые слова:** *пожилой возраст; избыточная масса тела; липидный метаболизм; лептин; холестерин; лептинорезистентность*

**THE STATE OF LIPID METABOLISM IN THE ELDERLY WITH  
NORMAL WEIGHT AND OVERWEIGHT**

**Baida A.V.**

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of General Medical Practice of the State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Belarus*  
alvab@tut.by;  
**Stepanova J.I.**

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Leading researcher of the research Laboratory of the State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Belarus*  
st.juli@tut.by  
**Kuznetsova N.B.**

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of General Medical Practice of the State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Belarus*  
gerontby@rambler.ru;  
**Kapustina E.V.**

*Doctor of the clinical diagnostics laboratory of the Healthcare institution "10th Clinical Hospital of Minsk", Minsk, Belarus*  
kapustinae@tut.by

*This article presents an analysis of the state of lipid metabolism in elderly people with normal and overweight without endocrine pathology and a history of diabetes mellitus. The body mass index and waist circumference were evaluated, and the following clinical and laboratory parameters of blood serum were studied: leptin, total cholesterol, high- and low-density lipoproteins, triglycerides, atherogenicity coefficient. In elderly people with excess body weight, a violation of the state of lipid metabolism was revealed with the development of hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and an increase in leptin levels, which is associated with possible leptin resistance in this category of patients.*

**Keywords:** *old age; overweight; lipid metabolism; leptin; cholesterol; leptin resistance*

**Актуальность.** Согласно эпидемиологическим прогнозам ВОЗ, к 2025 г. прирост числа пациентов с метаболическим синдромом в мире составит около 50%. Увеличение численности населения старших возрастных групп сопровождается повышением количества пациентов со сниженной двигательной активностью и наличием возраст-ассоциированных заболеваний. Известно, что к наиболее важным факторам развития метаболических нарушений относятся висцеральное ожирение и лептинорезистентность [1]. В связи с этим представляет научно-практический интерес изучение особенностей метаболизма холестерина и триглицеридов во взаимосвязи с нейрогуморальной регуляцией липидного обмена посредством лептина.

**Цель** – изучить состояние липидного метаболизма у лиц пожилого возраста с нормальной и избыточной массой тела.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования явились 52

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

пациента пожилого возраста, не имеющие эндокринных заболеваний и сахарного диабета, из отделений терапевтического профиля Республиканского клинического госпиталя инвалидов ВОВ. Из них 27 пациентов с избыточной массой тела (средний возраст  $71,2 \pm 9,6$  года) составили основную группу, в контрольную группу вошло 25 лиц с нормальной массой тела (средний возраст  $66,8 \pm 10,4$  года). Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Получено разрешение этического комитета БелМАПО на проведение исследований. Критериями включения пациентов в исследование явились следующие: пожилой возраст старше 60 лет, клинически удовлетворительное общее состояние, ясное сознание, правильная ориентировка во времени и пространстве, способность к адекватному и продуктивному контакту, отсутствие выраженных когнитивных нарушений, удовлетворительная физическая активность, способность к самообслуживанию, добровольное информированное согласие на проведение клинической и лабораторной диагностики. Критериями исключения явились тяжелая степень онкологической патологии и выраженные когнитивные нарушения, исключающие возможность коммуникации.

Оценивали клинико-фенотипические показатели (выявление жалоб и сбор анамнеза, индекс массы тела (ИМТ), окружность талии, частота пульса, частота дыхания, уровень артериального давления) и биохимические маркеры липидного метаболизма (общий холестерин, липопротеины высокой и низкой плотности, триглицериды, коэффициент атерогенности, лептин). Определение уровня маркеров липидного метаболизма в сыворотке крови, взятой натощак из кубитальной вены, проводили с помощью количественных методов лабораторного исследования (иммуноферментный анализ, спектрофотометрия) с использованием коммерческих диагностических наборов реагентов CORMAY (Польша), IMTEC (Германия). Лабораторные исследования выполнены в соответствии с инструкциями к тест-наборам реагентов.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica v10.0. Проверку числовых значений на нормальность распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. При распределении, отличном от нормального, данные представляли в виде медианы и интервала между 25 и 75 перцентилями ( $Me (25\%; 75\%)$ ), при нормальном распределении – в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ( $X \pm Sx$ ). Однородность состава сравниваемых групп пациентов по полу оценивалась по точному критерию Фишера. Для анализа различий в двух группах по количественному параметру использовали при нормальном распределении U-критерий Манна-Уитни для независимых групп, при нормальном распределении – однофакторный дисперсионный анализ. Статистически значимыми являлись результаты при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Клиническая оценка общесоматических показателей состояния здоровья по данным анамнеза, физикального осмотра и лабораторного обследования (общий анализ мочи и крови, базовые показатели биохимического

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

анализа крови) у пациентов контрольной и основной групп на момент обследования не выявила наличия острой инфекционной патологии и/или обострения хронической соматической патологии. У пациентов контрольной и основной групп были зарегистрированы следующие заболевания в процентном соотношении: мочекаменная болезнь (1,2% и 1,1%), хронический гастрит и/или гастродуоденит (32,9% и 35,4%), хронический тонзиллит (15,4% и 13,7%), хронический синусит (12,7% и 10,9%), желчекаменная болезнь (1,6% и 1,3%), аллергические состояния (5,6% и 7%) соответственно, что не имело достоверной межгрупповой разницы. В единичных случаях в обеих группах наблюдения зарегистрированы коксартроз, гонартроз, хронический ринит, остеохондроз позвоночника, аутоиммунный тиреоидит, бронхиальная астма. В основной группе была зафиксирована гипертоническая болезнь в 39,5% случаях, в то время как в контрольной группе – только в 16,8% случаев ( $p=0,001$ ). Таким образом, сформированные выборки пациентов были сопоставимы по возрастному ( $p>0,05$ ) и гендерному составу ( $p>0,05$ ), однако существенно различались по спектру сопутствующей патологии.

В основной группе ИМТ и окружность талии пациентов составили соответственно 28,4 (25,9; 30,7) кг/м<sup>2</sup> и 101,2 (95,2;107,8) см, что значимо превышало соответствующие уровни в контрольной группе – 24,5 (22,1;25,7) кг/м<sup>2</sup> ( $p=0,027$ ) и 88,7 (82,6;94,1) см ( $p=0,036$ ). Показатели липидного метаболизма пациентов двух групп исследования представлены в таблице. Установлена межгрупповая разница между параметрами липидного спектра крови – общего холестерина ( $p=0,040$ ) и триглицеридов ( $p=0,031$ ), коэффициента атерогенности ( $p=0,037$ ), тогда как уровни липопротеинов высокой и низкой плотности не отличались друг от друга в двух группах наблюдения.

**Таблица** – Уровни показателей липидного метаболизма в сыворотке крови у пациентов контрольной и основной групп, Me (25%;75%),  $X\pm Sx$

Показатель	Контрольная группа, n=25	Основная группа, n=27	P
Лептин, нг/мл	9,4 (5,1; 13,1)	15,8 (12,6; 19,2)	0,022
Общий холестерин, ммоль/л	6,2 (5,1; 7,4)	6,7 (5,8;8,1)	0,040
Триглицериды, ммоль/л	1,26 (0,74; 1,87)	1,47 (0,95; 2,6)	0,032
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,00 (0,82;1,21)	0,93 (0,72; 1,29)	НЗ
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,10 (2,28;3,86)	3, 24 (2,35; 4,17)	НЗ
Коэффициент атерогенности, ед.	3,93±0,88	4,49±0,97	0,037

Примечания. ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности, p – достоверность различий между группами, НЗ – различия между группами незначимы.

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

Содержание лептина в венозной крови пациентов с избыточной массой тела составило 15,8 (12,6; 19,2) нг/мл, что значимо превышало контрольный уровень 9,4 (5,2; 13,1) нг/мл ( $p=0,022$ ). У пациентов основной группы избыток лептина может быть связан с невосприимчивостью к его действию в результате развития лептинорезистентности, при которой отсутствует контроль гипоталамуса за частотой и количеством принятия пищи. Невосприимчивость к лептину может развиваться в результате структурных и функциональных дефектов на уровне его рецептора ObRb, избыточной продукции ингибиторов лептина, а также при нарушении транспорта молекулы лептина через гематоэнцефалический барьер, что требует пристального внимания клиницистов и дальнейшего изучения проблемы в виду её высокой медико-социальной значимости.

Жировая ткань, особенно у пациентов с ожирением, является источником ряда адипокинов, одним из которых является лептин – ключевой регулятор энергетического баланса в организме, передающий информацию об энергетических запасах от жировой ткани в мозг. Головной мозг, и прежде всего гипоталамус, поддерживает энергетический гомеостаз и нормальную массу тела путем регуляции потребления пищи и расходования энергии [2]. Нами продемонстрировано, что содержание лептина в крови возрастает при увеличении массы жировой ткани, причем его секреция в подкожной жировой клетчатке выше, чем в висцеральных жировых депо. При этом уровень лептина отражает не только количество накопленного жира, но и нарушение энергетического обмена. Известно, что к наиболее важным факторам, приводящим к метаболическому синдрому (МС), относится ожирение, причем тип отложения жировой ткани в организме определяет риск развития метаболических нарушений. Поскольку МС является обратимым состоянием, при правильной тактике ведения таких пациентов можно добиться исчезновения или уменьшения выраженности основных его проявлений [3].

Следовательно, избыточная масса тела и ожирение, часто встречающееся у людей старших возрастных групп, являются важнейшими модифицируемыми факторами риска развития и поддержания многих социально значимых заболеваний, особенно патологии сердечно-сосудистой системы [4, 5]. Их профилактика будет способствовать снижению заболеваемости, улучшению качества жизни и увеличению продолжительности жизни у пациентов данной возрастной категории.

**Заключение.** У лиц пожилого возраста с избыточной массой тела выявлено нарушение состояния липидного метаболизма с развитием гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии и повышением уровня лептина, что связано с возможной лептинорезистентностью у этой категории пациентов. Установленные нарушения липидного гомеостаза сопряжены с ускорением процессов атерогенеза и высоким риском развития метаболического синдрома, что обуславливает необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

**Список литературы**

1. Чумакова Г.А., Отт А.В., Веселовская Н.Г. Патогенетические механизмы лептинорезистентности // Российский кардиологический журнал. – 2015. – №4. – С.107-110.
2. Zhou Y., Rui L. Leptin signaling and leptin resistance// Front Med. – 2013. – Vol. 7(2). – P. 207-222.
3. Lovell M. *Caring for the elderly: Changing perceptions and attitudes* // J. Vasc. Nurs. Med. Dir. Assoc. – 2015. – Vol. 24 (1). – P. 22-26.
4. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes / Eds. Neale Ridgway, Roger McLeod. – Elsevier, 2015. – 612 p.
5. Чумакова Г.А., Кузнецова Т.Ю., Дружилов М.А., Веселовская Н.Г. Висцеральное ожирение как глобальный фактор сердечно-сосудистого риска// Российский кардиологический журнал. – 2018.– №5. – С.7-14.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

**НОВЫЙ СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ,  
ПОЗВОЛЯЮЩИЙ ИЗУЧИТЬ АДАПТАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**Бонь Е.И.**

*к.б.н., доцент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова  
УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно,  
Беларусью  
asphodela@list.ru*

**Максимович Н.Е.**

*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии  
имени Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный университет», г.  
Гродно, Беларусь.  
mne@grsmu.by*

**Лычковская М.А.**

*студентка 4 курса 7 группы педиатрического факультета Гродненского  
государственного медицинского университета, г. Гродно, Беларусь.  
lychkovskaya.m@gmail.com*

*В данной статье рассматривалась разработка способа моделирования  
ишемии, позволяющая изучать динамику повреждений и адаптационные  
механизмы головного мозга и не вызывающая быстрой гибели животных. До  
настоящего времени в литературе отсутствуют стандартные, эталонные  
модели ишемии головного мозга и исследователи применяют различные подходы  
в моделировании данной патологии. Для детального изучения механизмов  
развития повреждений и адаптации в головном мозге необходима разработка  
адекватной модели ишемии, которая бы позволяла увеличить  
продолжительность их жизни после операции.*

**Ключевые слова:** ишемия головного мозга; эффективность

**A NEW METHOD FOR MODELING CEREBRAL ISCHEMIA,  
ALLOWING TO STUDY THE ADAPTIVE MECHANISMS OF THE BRAIN**

**Bon E.I.**

*candidate of biological sciences, associate professor, associate professor of the  
department of pathological physiology  
of the name of D.A. Maslakov  
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus  
asphodela@list.ru*

**Maksimovich N.E.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of  
Pathological Physiology of the name of D.A. Maslakov Education Establishment  
"Grodno State University", Grodno, Belarus.  
mne@grsmu.by*

**Lychkovskaya M.A.**



*4th year student of the 7th group of the pediatric faculty of Grodno State  
Medical University, Grodno, Belarus.  
lychkovskaya.m@gmail.com*

*This article considered the development of a method for modeling ischemia, which allows to study the dynamics of damage and adaptive mechanisms of the brain and does not cause rapid death of animals. Until now, there are no standard reference models of cerebral ischemia in the literature, and researchers use various approaches in modeling this pathology. For a detailed study of the mechanisms of development of damage and adaptation in the brain, it is necessary to develop an adequate model of ischemia, which would make it possible to increase their life expectancy after surgery.*

**Key words:** *cerebral ischemia; efficiency*

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах (n=28) массой 220-240 г. На первом этапе моделировали частичную ишемию головного мозга (ИГМ) путем перевязки одной общей сонной артерии (ОСА), а через 7 суток – второй (правой) ОСА.

Для оценки тяжести ишемического повреждения головного мозга использовался ряд поведенческих методик – тест «мышечная сила» и «плавательная проба», а также изучали эмоциональное состояние и двигательную активность в тесте «открытое поле».

Время удержания на сетке животных со ступенчатой ИГМ составляло 1(0,45;1,2) минуту, ( $p<0,05$ ), а у животных контрольной группы – 20 (15; 24) мин. При проведении плавательной пробы время удержания крыс со ступенчатой субтотальной ИГМ составило 5,3 (4,5; 5,7) минут ( $p<0,05$ ). Время плавания животных контрольной группы – 21 (18;23) мин. При проведении теста «открытое поле» было установлено следующее: у крыс со ступенчатой субтотальной ИГМ число пересеченных квадратов составило 24 (22;28), умываний 2 (1,6;2,4), стоек 3 (2,6;3,2), число актов дефекации и мочеиспускания 2 (1,2;2,3). У животных контрольной группы число пересеченных квадратов составило 67 (64;72), умываний 6 (5,1;7,2), стоек 9 (8;9,4), число актов дефекации и мочеиспускания 5 (4,6;6,5), ( $p<0,05$ ).

Таким образом, способ моделирования субтотальной ИГМ путем ступенчатой перевязки обеих общих сонных артерий не приводит к гибели экспериментальных животных, способствует удлинению их жизни после операции, что позволяет проводить изучение последствий тяжелой ишемии головного мозга и патогенеза ишемических повреждений на головной мозг в динамике, осуществлять разработку корригирующих мероприятий.

### **Список литературы**

1. Bon, L.I. Methods of estimation of neurological disturbances in experimental cerebral ischemia / L.I. Bon, N.Ye. Maksimovich // Биомедицина. – 2019. – №2. – С. 69-74.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

**ИЗМЕНЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК  
ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА И ГИППОКАМПА КРЫС  
ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ В СРАВНИТЕЛЬНОМ АСПЕКТЕ**

**Бонь Е.И.**

*к. б. н., доцент, доцент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Беларусь  
asphodela@list.ru*

**Максимович Н.Е.**

*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии имени Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный университет», г. Гродно, Беларусь.  
mne@grsmu.by*

**Лычковская М.А.**

*студентка 4 курса 7 группы педиатрического факультета Гродненского государственного медицинского университета, г. Гродно, Беларусь.  
lychkovskaya.m@gmail.com*

*В данной статье изучались гистологические нарушения нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных моделях церебральной ишемии в сравнительном аспекте. Изучение головного мозга в норме и патологии является актуальным и перспективным направлением современной науки. Ведущими звеньями патогенеза ишемической гипоксии головного мозга является энергодефицит, а также избыток продуктов метаболизма, накапливающихся в зоне ишемии. Нарушения нейронов влекут за собой тяжелые неврологические последствия, затрагивающие и весь организм в целом.*

**Ключевые слова:** *ишемия головного мозга; нейроны; теменная кора; гиппокамп*

**CHANGES IN HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE  
PYRAMID NEURONS OF THE NEOCORTEX AND THE HIPPOCAMPA OF  
RATS IN CEREBRAL ISCHEMIA IN A COMPARATIVE ASPECT**

**Bon E.I.**

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology of the name of D.A. Maslakov Education Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus  
asphodela@list.ru*

**Maksimovich N.E.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pathological Physiology of the name of D.A. Maslakov Education Establishment "Grodno State University", Grodno, Belarus.  
mne@grsmu.by*

***Lychkovskaya M.A.***

*4th year student of the pediatric faculty  
of Grodno State Medical University, Grodno, Belarus.  
lychkovskaya.m@gmail.com*

*This article studied histological disorders of neurons in the parietal cortex and hippocampus of rats in various models of cerebral ischemia in a comparative aspect. The study of the brain in health and disease is a relevant and promising area of modern science. The leading links in the pathogenesis of ischemic hypoxia of the brain are energy deficiency, as well as an excess of metabolic products accumulating in the ischemic zone. Neuronal disorders entail severe neurological consequences that affect the entire body as a whole.*

***Key words:*** *cerebral ischemia; neurons; parietal cortex; hippocampus*

Исследование было проведено на беспородных белых крысах (84 самца, масса  $240 \pm 20$  г). При моделировании частичной ишемии головного мозга перевязывали одну общую сонную артерию. При моделировании субтотальной ишемии головного мозга перевязывали обе общие сонные артерии. При моделировании ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга перевязывали две общие сонные артерии. Подгруппа 1 – с интервалом 7 суток, Подгруппа 2 – 3-е суток, Подгруппа 3 – 1 сутки. При моделировании тотальной ишемии головного мозга производили декапитацию. Во время забора материала извлекался головной мозг для фиксации в растворе Карнуа. Изготавливались парафиновые срезы и окрашивались по методу Ниссля. Для установления расположения структур коры головного мозга на изготовленных гистологических препаратах применяли стереотаксический атлас. Изменение размеров и формы нейронов оценивали с помощью программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). В гистологических препаратах определяли различные виды нейронов в зависимости от окрашивания их цитоплазмы (хроматофилии). Так, в исследовании все нейроны подразделили на 5 групп: нормохромные, клетки с перицеллюлярным отеком, клетки-тени, гиперхромные и гиперхромные сморщенные. Полученные результаты обрабатывали, используя непараметрическую статистику, Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США).

По сравнению с контролем, при частичной ишемии головного мозга через 1 час изменений размеров и формы перикарионов нейронов не отмечалось ( $p > 0,05$ ). Однако в этой группе, как в теменной коре, так и в гиппокампе отмечено уменьшение количества нормохромных нейронов на 18% ( $p < 0,05$ ) и на 16% ( $p < 0,05$ ), а также увеличение количества гиперхромных нейронов на 65% ( $p < 0,05$ ) и на 69% ( $p < 0,05$ ), соответственно. У животных с 1-часовой субтотальной ишемией головного мозга нейроны теменной коры и гиппокампа были меньше в размере, чем в контрольной группе, на 52% ( $p < 0,05$ ) и 48% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Фактор элонгации был больше на 20% ( $p < 0,05$ ) в обоих

изучаемых отделах, а форм-фактор уменьшился на 11% в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 22% – в гиппокампе ( $p < 0,05$ ). К 1 суткам субтотальная ишемия головного мозга в обеих изучаемых структурах появились нейроны с перичеселлюлярным отеком 536(536;636,5) на 1 мм<sup>2</sup>. При этом, в теменной коре их количество, было больше, чем в гиппокампе на 25% ( $p < 0,05$ ). У крыс со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга морфологические изменения имели большую выраженность, чем при частичной ишемии головного мозга, но меньшую, чем при субтотальной ишемии головного мозга. Наименее выраженные изменения размеров и формы нейронов отмечались в 1-й подгруппе (интервал между перевязками общей сонной артерии 7 суток). Площадь нейронов, по сравнению с контролем, уменьшилась в теменной коре на 39% ( $p < 0,05$ ), в гиппокампе – на 28% ( $p < 0,05$ ), фактор элонгации увеличился на 8% ( $p < 0,05$ ), форм-фактор уменьшился на 11% ( $p < 0,05$ ). При сравнении группы с частичной ишемией головного мозга и 1-й подгруппы со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга установлено, что форма перикарионов нейронов в обоих изучаемых отделах не отличалась ( $p > 0,05$ ). Спустя 1 сутки размеры нейронов в этой подгруппе были больше на 36% ( $p < 0,05$ ) в теменной коре и на 60% ( $p < 0,05$ ) – в гиппокампе, чем при субтотальной ишемией головного мозга, а по сравнению с частичной ишемией головного мозга – меньше на 27% ( $p < 0,05$ ) в теменной коре.

В 3-й подгруппе изменения размеров и формы нейронов спустя 1 час не отличались от таковых при субтотальной ишемии головного мозга ( $p > 0,05$ ), но при продолжительности ишемического периода 1 сутки площадь нейронов была больше на 15%, чем при субтотальной ишемии головного мозга, в теменной коре ( $p < 0,05$ ) и на 39% – в гиппокампе ( $p < 0,05$ ) [1].

По мере сокращения промежутка между перевязками общей сонной артерии от 7 суток в первой подгруппе до 1 суток – в третьей подгруппы отмечались более выраженные изменения размеров нейронов (их уменьшение),  $p < 0,05$  и формы (увеличение фактора элонгации и уменьшение форм-фактора),  $p < 0,05$ , а также отмечалось усугубление изменений хроматофилии их цитоплазмы.

При ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга по мере сокращения временного интервала между перевязками общей сонной артерии происходило уменьшение количества нормохромных нейронов ( $p < 0,05$ ) и увеличение количества гиперхромных сморщенных нейронов ( $p < 0,05$ ). У крыс с 1-часовой тотальной ишемией головного мозга появлялись отечные набухшие нейроны ( $p < 0,05$ ). Количество гиперхромных сморщенных нейронов в группе с тотальной ишемией головного мозга было на 80% больше ( $p < 0,05$ ), а клеточ-теней – на 30% меньше ( $p < 0,05$ ), чем в группе с субтотальной ишемией головного мозга. Спустя 1 сутки ишемического периода в популяции нейронов стали преобладать клетки с перичеселлюлярным отеком ( $p < 0,05$ ). Нормохромные нейроны при этом отсутствовали ( $p < 0,05$ ), гиперхромные нейроны в единичном

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

количестве наблюдались только при 1-часовой тотальной ишемии головного мозга ( $p < 0,05$ ). По сравнению с группой с субтотальной ишемией головного мозга, при суточной тотальной ишемии головного мозга количество гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней было меньше на 70% ( $p < 0,05$ ). Большую долю клеточной популяции составили нейроны с перичеселлюлярным отеком ( $2680(2479;3082)/\text{мм}^2$ ), тогда как в группе с субтотальной ишемией головного мозга такие клетки составили только 16% от общего количества нейронов.

Согласно данным литературы, при ишемии часто наблюдается более интенсивная окраска цитоплазмы нейрона, так называемая гиперхромия. Существует мнение, что сама по себе гиперхромия без нарушения конфигурации тела нейрона не может свидетельствовать о патологии клетки и говорит лишь о функциональной напряженности [1, 2, 3].

В настоящей работе нами получены данные об изменениях морфологии нейронов, согласующиеся с вышеизложенными данными литературы. Вместе с тем, проведен и сравнительный анализ изменений при ишемии разной степени тяжести и оценка возможности адаптации нейронов к недостатку кислорода.

В целом, наименьшие морфологические изменения нейронов отмечены в группах с частичной ишемией головного мозга и 1-й подгруппе со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга, с интервалом между перевязками общей сонной артерии 7 суток. Так, например, при частичной ишемии головного мозга отсутствие выраженных морфологических изменений крыс объясняется компенсацией кровообращения по виллизиевому кругу. При ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга, когда временной интервал (7 суток между перевязками) достаточен для развития адаптивных процессов, повышается продуктивность митохондриального дыхания, а также, возможно, происходит активация продукции монооксида азота и гипоксией индуцированного фактора.

Моделирование более тяжелых видов ишемического повреждения приводит к выраженным морфологическим изменениям нейронов теменной коры и гиппокампа головного мозга крыс – уменьшению их размеров, деформации перикарионов, увеличению степени хроматофилии нейронов с одновременным их сморщиванием и последующей гибелью. В наибольшей степени данные нарушения были выражены в 3-ей подгруппе со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга с самым коротким интервалом между перевязками, составившим 1 сутки и в группе с тотальной ишемией головного мозга.

При анализе изменения морфологии нейронов в теменной коре и гиппокампе головного мозга крыс видно, что, при усугублении степени тяжести церебральной ишемии происходит прогрессирующее увеличение количества гиперхромных сморщенных нейронов и нейронов с перичеселлюлярным отеком. Наиболее явные морфологические изменения (уменьшение размеров и

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

деформация перикарионов нейронов) наблюдались в условиях тотальной ишемии головного мозга спустя 1 сутки. Схожие с тотальной ишемией головного мозга, однако менее грубые нарушения выявлены при суточной субтотальной ишемии головного мозга и в подгруппе со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга с интервалом между перевязками общей сонной артерии 1 сутки. Изменения в теменной коре и гиппокампе носили однонаправленный характер, но в теменной коре, наиболее чувствительной к недостатку кислорода, они были более выраженными. Полученные данные создают фундаментальную базу для последующей детализации патогенеза ишемического повреждения головного мозга и поисков эффективной коррекции данной патологии.

### Список литературы

1. Бонь Е.И. Морфологические нарушения нейронов гиппокампа крыс с субтотальной и тотальной ишемией / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович, С.М. Зиматкин // Оренбургский медицинский вестник. – 2020. – № 2. – С. 41-46.
2. Мартынова О.В. Морфологические изменения нейронов головного мозга крыс при двух-, четырёхсосудистой моделях ишемического повреждения головного мозга крыс и их коррекция тадалафилом в эксперименте / О.В. Мартынова // Журнал современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 56-61.
3. Руқан Т.А. Морфофункциональные изменения нейронов фронтальной коры головного мозга в условиях его ишемии-реперфузии / Т.А. Руқан // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2012. – № 4. — С. 35-38.

**ЭФФЕКТЫ ВВЕДЕНИЯ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ  
КИСЛОТ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ У КРЫС**

**Бонь Е.И.**

*к. б. н., доцент, доцент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Беларусь  
asphodela@list.ru*

**Максимович Н.Е.**

*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии имени Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный университет», г. Гродно, Беларусь.  
mne@grsmu.by*

**Лычковская М.А.**

*студентка 4 курса 7 группы педиатрического факультета Гродненского государственного медицинского университета, г. Гродно, Беларусь.  
lychkovskaya.m@gmail.com*

*В данной статье оценивалась степень неврологического дефицита у крыс с ишемией головного мозга и введением омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. Острые нарушения мозгового кровообращения – одна из наиболее актуальных проблем в современной медицине. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты обеспечивают функционирование клеточных мембран, трансмембранных ионных каналов, участвуют в регуляции физиологических процессов и реализации основных функций нейронов – передаче импульсов и работе рецепторов.*

**Ключевые слова:** *церебральная ишемия; нейроны; омега-3 полиненасыщенная жирная кислота*

**EFFECTS OF OMEGA-3 INTRODUCTION OF POLYUNSATURATED  
FATTY ACIDS IN CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS**

**Bon E.I.**

*Candidate of Biological Sciences, associate professor, associate professor of the department of pathological physiology of the name of D.A. Maslakov  
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus  
asphodela@list.ru*

**Maksimovich N.E.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pathological Physiology of the name of D.A. Maslakov  
Grodno State University, Grodno, Belarus.  
mne@grsmu.by*

**Lychkovskaya M.A.**

*4th year student of the pediatric faculty of Grodno State Medical University, Grodno, Belarus.*

*lychkovskaya.m@gmail.com*

*This article evaluated the degree of neurological deficit in rats with cerebral ischemia and administration of omega-3 polyunsaturated fatty acids. Acute disorders of cerebral circulation are one of the most pressing problems in modern medicine. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ensure the functioning of cell membranes, transmembrane ion channels, participate in the regulation of physiological processes and the implementation of the main functions of neurons - the transmission of impulses and the work of receptors.*

**Key words:** *cerebral ischemia; neurons; omega-3 polyunsaturated fatty acid*

Эксперименты выполнены на 42 самцах беспородных белых крыс массой  $260 \pm 20$  г. Субтотальную ишемию головного мозга моделировали путем одномоментной перевязки обеих общих сонных артерий. Частичную ишемию головного мозга моделировали путем перевязки одной общей сонной артерии справа. Ступенчатую субтотальную ишемию головного мозга осуществляли путем последовательной перевязки обеих общих сонных артерий с интервалом 1 сутки (подгруппа 1), 3-е суток (подгруппа 2) или 7 суток (подгруппа 3) [2]. Для изучения эффектов омега-3 полиненасыщенных жирных кислот животным с ишемией головного мозга в течение недели внутрижелудочно вводили препарат «Омегамед» в дозе 5 г/кг массы тела. Контрольную группу составили ложно оперированные крысы аналогичных пола и веса. Оценку неврологического дефицита осуществляли с помощью тестов «мышечная сила», «плавательная проба» и «открытое поле» спустя 5-6 часов ишемического периода. Тесты «мышечная сила» и «плавательная проба» используются для изучения двигательной активности. Тест «мышечная сила» оценивается путем помещения крысы на горизонтально расположенную металлическую сетку длиной 60 см с нанесенной сантиметровой шкалой делений и определения времени удержания животного после поворота сетки в вертикальное положение. Для проведения «плавательной пробы» животное помещается в стеклянный резервуар с водой ( $21^\circ\text{C}$ ) и определяется время удержания животного на поверхности воды. Тест «открытое поле» проводится на протяжении 5 минут на плоской поверхности, расчерченной на 36 квадратов, загороженной по периметру. В «открытом поле» оценивается количество пересеченных квадратов, активность в плоскостях (вертикальной и горизонтальной), груминг (умывание), количество актов дефекации, поиск углублений и дыр. Исследование проводилось спустя 6 часов после моделирования ишемии головного мозга [4]. Анализ проводили методами непараметрической статистики. Данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$  (тест Крускаллы-Уоллиса с поправкой Бонферони).

При оценке неврологического дефицита у животных с субтотальной ишемией головного мозга отмечалось уменьшение «мышечной силы» на 95 %



( $p < 0,05$ ), продолжительность удержания на воде в «плавательной пробе» сократилась на 76 % ( $p < 0,05$ ). Оценка двигательной активности в тесте «открытое поле» также подтвердила развитие неврологического дефицита. При проведении данного исследования по сравнению с показателями у животных контрольной группы количество пересеченных квадратов уменьшилось на 64 % ( $p < 0,05$ ), количество коротких умываний – на 67 % ( $p < 0,05$ ), количество стоек – на 62,5 % ( $p < 0,05$ ), количество актов дефекации – на 60 % ( $p < 0,05$ ). По сравнению с показателями у крыс контрольной группы, у животных с частичной ишемией головного мозга отмечалось уменьшение показателя «мышечная сила» и продолжительности плавания на 75% ( $p < 0,05$ ) и на 41% ( $p < 0,05$ ), соответственно. В тесте «открытое поле» количество пересеченных квадратов уменьшилось на 26% ( $p < 0,05$ ), количество коротких умываний – на 33% ( $p < 0,05$ ), количество стоек типа «climbing» – на 25 % ( $p < 0,05$ ), количество актов дефекации – на 40% ( $p < 0,05$ ). Длительные умывания и стойки типа «rearing» наблюдались только у интактных животных ( $p > 0,05$ ). Результаты поведенческих тестов указывает на развитие незначительного неврологического дефицита у крыс с частичной ишемией головного мозга. По сравнению с группой «контроль» в 3-й подгруппе ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга (интервал 7 суток) показатель «мышечной силы» уменьшился на 81 % ( $p < 0,05$ ), продолжительность плавания – на 45% ( $p < 0,05$ ), количество пересеченных квадратов в тесте «открытое поле» – на 40% ( $p < 0,05$ ), количество умываний – на 54% ( $p < 0,05$ ), количество стоек «climbing» – на 50% ( $p < 0,05$ ), количество актов дефекации – на 40% ( $p < 0,05$ ). Во 2-й и 1-й подгруппах изменения были более выражены. Так, показатель «мышечной силы» уменьшился на 86 ( $p < 0,05$ ) и на 95% ( $p < 0,05$ ), продолжительность плавания – на 63% ( $p < 0,05$ ) и на 77% ( $p < 0,05$ ), количество пересеченных квадратов – на 55% ( $p < 0,05$ ) и на 68% ( $p < 0,05$ ), количество умываний – на 54% ( $p < 0,05$ ) и на 69% ( $p < 0,05$ ), количество стоек «climbing» – на 57% ( $p < 0,05$ ) и на 62,5% ( $p < 0,05$ ), количество актов дефекации – на 50% ( $p < 0,05$ ) и на 60% ( $p < 0,05$ ), соответственно. По сравнению с 3-й подгруппой ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга, во второй подгруппе показатель «мышечной силы» уменьшился на 24 % ( $p < 0,05$ ), продолжительность плавания – на 33% ( $p < 0,05$ ), количество пересеченных квадратов в тесте «открытое поле» – на 24% ( $p < 0,05$ ), а в 1-й подгруппе данные показатели уменьшились в наибольшей степени – на 75% ( $p < 0,05$ ), на 58% ( $p < 0,05$ ), на 47% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Кроме того, в 1-й подгруппе отмечено уменьшение количества умываний – на 33% ( $p < 0,05$ ), количество стоек «climbing» – на 25% ( $p < 0,05$ ) и количество актов дефекации – на 33% ( $p < 0,05$ ), а по сравнению со 2-й подгруппой, отмечалось уменьшение мышечной силы на 67% ( $p < 0,05$ ), продолжительности плавания – на 37,5% ( $p < 0,05$ ) и количества пересеченных квадратов в тесте «открытое поле» – на 29% ( $p < 0,05$ ). В 3-й подгруппе ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга показатель мышечной силы и продолжительность плавания, по сравнению с группой «частичная ишемия

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

головного мозга» не изменились ( $p > 0,05$ ), но при проведении теста «открытое поле» наблюдалось уменьшение количества пересеченных квадратов – на 19% ( $p < 0,05$ ) и количества стоек – на 33% ( $p < 0,05$ ). По сравнению с субтотальной ишемией головного мозга, в третьей подгруппе ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга с промежутком между перевязками обеих общих сонных артерий 7 суток, показатель мышечной силы был больше на 75% ( $p < 0,05$ ), продолжительность плавания – на 58% ( $p < 0,05$ ), количество пересеченных квадратов – на 48% ( $p < 0,05$ ), количество умываний и стоек «climbing» – на 33% ( $p < 0,05$ ). В первой и во второй подгруппах ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга проявления неврологического дефицита были более выражены, чем у крыс с частичной ишемией головного мозга: показатель мышечной силы – на 40% ( $p < 0,05$ ) и на 80% ( $p < 0,05$ ), продолжительность плавания – на 39% ( $p < 0,05$ ) и на 62% ( $p < 0,05$ ), количество пересеченных квадратов – на 39% ( $p < 0,05$ ) и на 57% ( $p < 0,05$ ), количество стоек «climbing» – на 42% ( $p < 0,05$ ) и на 50% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Количество умываний и дефекаций во 2-й подгруппе не отличалось от значений показателей в группе «частичная ишемия головного мозга» ( $p > 0,05$ ), но в 1-й подгруппе их количество было на 50% меньше ( $p < 0,05$ ). Во 2-й подгруппе ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга, по сравнению с группой «субтотальная ишемия головного мозга», показатель мышечной силы был на 67% больше ( $p < 0,05$ ), продолжительности плавания – на 37,5% ( $p < 0,05$ ), количество пересеченных квадратов – на 31% ( $p < 0,05$ ) и умываний – на 33% ( $p < 0,05$ ). Итак, различия в степени неврологического дефицита между одномоментной субтотальной ишемией головного мозга и 1-й подгруппой со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга с промежутком между перевязками 1 сутки отсутствовали ( $p > 0,05$ ). При ступенчатой двухсторонней перевязке обеих общих сонных артерий с интервалом 1 сутки неврологические нарушения были наиболее выражены, что свидетельствует об усугублении неврологического дефицита при сокращении времени между перевязками общих сонных артерий. У крыс со ступенчатой субтотальной ишемией головного мозга изменения имели большую выраженность, чем при частичной ишемии головного мозга, но меньшую, чем при субтотальной ишемии головного мозга. Наименее выраженные изменения отмечались в 3-й подгруппе (интервал между перевязками общих сонных артерий 7 суток). Проведенные исследования показали зависимость тяжести повреждения головного мозга при ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга от интервала между прекращением кровотока по обеим общим сонным артериям. При 7-суточном интервале между перевязками общих сонных артерий происходило включение компенсаторных механизмов, которые препятствовали развитию морфологических изменений и неврологического дефицита. При перевязке общих сонных артерий с интервалом 1 сутки степень неврологического дефицита была максимальна, что указывает на недостаточность реализации компенсаторных механизмов. По сравнению с

контрольной группой у крыс группы «субтотальная ишемия головного мозга+ $\omega$ 3- полиненасыщенные жирные кислоты» сохранялся неврологический дефицит, показатель мышечной силы был меньше на 86% ( $p<0,05$ ), продолжительность плавания – на 63% ( $p<0,05$ ), количество пересеченных квадратов – на 55% ( $p<0,05$ ), количество умываний – на 62% ( $p<0,05$ ), количество стоек – на 62,5% ( $p<0,05$ ) и количество дефекаций – на 60% ( $p<0,05$ ). Наблюдалось увеличение показателя «мышечной силы» на 67% ( $p<0,05$ ), продолжительности плавания – на 37,5% ( $p<0,05$ ) и количества пересеченных квадратов в тесте «открытое поле» – на 31% ( $p<0,05$ ), что указывает на наличие у препарата  $\omega$ 3- полиненасыщенных жирных кислот корригирующего действия.

Итак, крысы с экспериментальной ишемией головного мозга обладали меньшей мышечной силой, проявляли меньшую двигательную активность, у них отмечены поведенческие нарушения. У животных с субтотальной ишемией головного мозга и в 1-й подгруппе «ступенчатая субтотальная ишемия головного мозга» наблюдались более выраженные нарушения по сравнению с 3-й подгруппой «ступенчатая субтотальная ишемия головного мозга» и группой «частичная ишемия головного мозга». Корригирующее воздействие полиненасыщенных жирных кислот на состояние нейронов при субтотальной церебральной ишемии может быть обусловлено улучшением реологических свойств крови вследствие выработки меньшего количества тромбосана А тромбоцитами и повышения уровня тканевого активатора плазминогена, и кроме того улучшением текучести мембраны нейронов, уменьшением вязкости крови [3].

Таким образом, введение препарата  $\omega$ -3 полиненасыщенных жирных кислот оказывает корригирующий эффект в условиях субтотальной ишемии головного мозга, способствует меньшему проявлению неврологического дефицита (продолжительности плавания и количества пересеченных квадратов в тесте «открытое поле», увеличению показателя мышечной силы).

### **Список литературы**

1. Бонь Е.И. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 59-71.
2. Бонь Е.И. Морфологические особенности нейронов теменной коры и гиппокампа крыс после субтотальной церебральной ишемии на фоне введения омега-3 полиненасыщенных жирных кислот / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович, С.М. Зиматкин // Сибирский медицинский журнал. – 2020. – № 3. – С. 34-40.
3. Бонь Е.И. Морфологические особенности нейронов теменной коры и гиппокампа крыс после субтотальной церебральной ишемии на фоне введения омега-3 полиненасыщенных жирных кислот / Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович, С.М. Зиматкин // Сибирский медицинский журнал. – 2020. – № 3. – С. 34-40.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

4. Bon L.I. Methods of estimation of neurological disturbances in experimental cerebral ischemia / L.I. Bon, N.Ye. Maksimovich // Биомедицина. – 2019. – V. 2. – P. 69-74.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

**РАДИКАЛЫ КИСЛОРОДА ОПУХОЛЕВОЙ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ,  
НЕЙТРОФИЛОВ И ТРОБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ  
РАКОМ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

**Бурлака А.П.**

д.б.н.,

*ведущий научный сотрудник лаборатории проблем метастатического микроокружения Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины  
arburlaka@gmail.com*

**Бурлака А.А.**

д.м.н.,

*старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела опухолей органов брюшной полости Национального института рака МЗ Украины  
nir.burlaka@gmail.com*

**Ганусевич И.И.**

д.б.н.,

*заведующая лабораторией проблем метастатического микроокружения Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины  
iganus2000@yahoo.com*

*В работе представлены данные исследований особенностей генерирования супероксидных радикалов, активности матриксных металлопротеиназ-2 и -9 клетками опухолевой и жировой тканей (ЖТ), нейтрофилами и тромбоцитами крови больных колоректальным раком. Выявлено, что накопление дисфункциональной ЖТ в организме больного способствует росту скорости генерирования супероксидных радикалов в опухоли, супероксид-генерирующей активности нейтрофилов и тромбоцитов, активности матриксных металлопротеиназ (ММП). Нарушение равновесия в редокс-состоянии нейтрофилов и тромбоцитов, гиперлипидемия и активация ММП, модифицируя микроокружение опухолевых клеток побуждает их приобретать фенотип с высокой инвазивностью и агрессивностью, способствует метастазированию путем накопления нейтрофилов и тромбоцитов с фенотипом к нерегулируемому генерированию СР и ММП.*

**Ключевые слова:** колоректальный рак; опухоли; жировая ткань; нейтрофилы; тромбоциты, супероксидные радикалы; матриксные металлопротеиназы

**OXYGEN RADICALS IN TUMOR AND ADIPOSE TISSUE,  
NEUTROPHILS AND PLATELETES IN PATIENTS WITH COLORECTAL  
CANCER: CLINICAL SIGNIFICANCE**

**Burlaka A.P.**

*Doctor of Biological Sciences,*

*Leading Researcher, Laboratory for Problems of Metastatic Microenvironment  
RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS  
of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
apburlaka@gmail.com*

**Burlaka A.A.**

*Doctor of Medical Sciences,  
Senior Researcher, Research Department of Abdominal Tumors, National  
Cancer Institute, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
nir.burlaka@gmail.com*

**Ganusevich I.I.**

*Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Metastatic  
Microenvironment Problems RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology,  
Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
iganus2000@yahoo.com*

*The data on the features of the generation of superoxide radicals, the activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in tumor cells and adipose tissues, neutrophils and blood platelets of patients with colorectal cancer have been presented. It was revealed that the accumulation of dysfunctional adipose tissues in the body promotes an increase in the rate of generation of superoxide radicals in the tumor, superoxide-generating activity of neutrophils and platelets, and the activity of matrix metalloproteinases (MMPs). Imbalance in the redox state of neutrophils and platelets as well as hyperlipidemia and activation of MMP could modify tumor microenvironment that in turn promotes the formation of a phenotype of high invasiveness and aggressiveness in tumor cells and facilitates metastasizing through the accumulation of neutrophils and platelets with a phenotype of unregulated generation of superoxide radicals and MMP.*

*Key words: Colorectal cancer; tumors; adipose tissue; neutrophils; platelets; superoxide radicals; matrix metalloproteinases*

Колоректальный рак (КРР) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний в мире, что может быть связано с различными факторами окружающей среды и образа жизни, такими как ожирение и низкая физическая активность [1,2]. Существует тесная связь между хроническим воспалением, вызываемым РФК, и неоплазией толстой кишки, причем степень, длительность и активность влияния РФК являются основными определяющими факторами. Опухолевые клетки при гематогенном метастазировании взаимодействуют с нейтрофилами и тромбоцитами, обеспечивая программу метастатического фенотипа, так как обладают множеством механизмов их активации. Ожирение вызывает нейтрофилию тканей, что связывают с усилением метастазирования в эти органы. Нейтрофилы в микроокружении опухоли подвергаются перепрограммированию в клетки с проопухолевым фенотипом и способностью продуцировать широкий спектр медиаторов, в

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

частности супероксидные радикалы, оксид азота и ММП [3-5]. Мы пытаемся найти подтверждение того, что, выведенные из равновесия вследствие нарушения их редокс-состояния, жировая ткань (ЖТ), нейтрофилы и тромбоциты могут представлять терапевтическую цель при гипо- или гиперактивации. Нарушение равновесия в редокс-состоянии может привести к нерегулируемой гипер- или гипоактивации тромбоцитов и тромбоэмболическим осложнениям, которые являются общим для большинства заболеваний. Контроль над этими процессами может стать стратегией управления минимизации смертности после резекции печени в условиях метастатического поражения.

Проведено исследование опухолевой, жировой ткани и крови 83 больных КРР (40 больных I - II-ой и 43 – III - IV-ой). У всех пациентов диагноз, стадию заболевания и наличие метастазов верифицированы в соответствии с требованиями доказательной медицины (в ходе соответствующих клинико-инструментальных обследований, морфологически), а также установлен уровень тромбоцитов, при этом у 22 % больных их количество составило  $220 \times 10^9/\text{л}$ , а у остальных определялся тромбоцитоз -  $410 \times 10^9/\text{л}$ . Исследовались 83 образца ткани аденокарцином, 83 образца ЖТ, отпрепарированной на расстоянии 5 см от опухоли, у больных КРР с ИМТ < 25 кг/м<sup>2</sup> (n=37) и ИМТ ≥ 25 (n= 46) кг/м<sup>2</sup>, которым выполнили хирургическое лечение в Национальном институте рака. Кровь отбирали при операции в центрифужные пробирки с раствором трилона Б (3%). Больных проинформировали о проведении диагностических процедур и получили согласие на использование тканей и крови в исследовательских целях. Исследования выполняли в соответствии с принципами проведения биомедицинских исследований с согласия пациентов, изложенных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Группой сравнения были 18 больных язвенной болезнью. Из ткани опухоли и ЖТ готовили образцы для исследования редокс-состояния методом ЭПР. 250 мкл очищенной фракции тромбоцитов или нейтрофилов использовали для определения уровней скорости генерирования СР. Нейтрофилы выделяли из крови по стандартной методике на градиенте плотности фикол/верографин, а тромбоциты по методике, описанной в работе [7]. Свободные жирные кислоты (СЖК) определяли спектрофотометрически. Уровни скорости генерирования СР клетками опухоли, ЖТ, нейтрофилами и тромбоцитами определяли методом ЭПР при применении технологии SpinTraps (спиновые ловушки TEMPONE-H, ДЕТК) (Sigma, USA). Активность ММП-2 и ММП-9 определяли методом зоографии [8-11]. Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием t-критерия Стьюдента и программы Origin7.0. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). Разницу считали достоверной при  $p < 0,05$ . Выживаемость анализировали по методу Каплана - Мейера, используя  $\chi^2$  и log-rank критерии.

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что увеличение в организме больного массы ЖТ усиливает генерирование СР в клетках опухоли внутриклеточными источниками, в частности митохондриями. Так, при норме скорости генерирования СР  $0,18 \pm 0,03$  нМоль/г ткани мин. у больных с ИМТ  $< 25$  кг/м<sup>2</sup> этот показатель равнялся  $0,68 \pm 0,05$  нМоль/г ткани мин, а при увеличении ИМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup> возрастает и скорость генерирования СР ( $0,84 \pm 0,07$  нМоль/г ткани мин.). Избыток энергетических субстратов при ожирении приводит к усилению митохондриальной дисфункции и модификации окислительного сигналинга. ЖТ создает условия для усиленной утилизации липидов и углеводов для синтеза энергии в форме АТФ в опухоли. То есть, избыток этих веществ в клетках активизирует цепь транспорта электронов митохондрий, утилизацию кислорода и генерирование СР, что модифицирует редокс-состояние микроокружения опухолей [12-16]. У этих же больных растет и супероксид-генерирующая активность нейтрофилов ( $1,42 \pm 0,02$  нМоль/10<sup>3</sup> клеток) по сравнению с больными КРР с нормальным весом ( $1,38 \pm 0,04$  нМоль/10<sup>3</sup> клеток мин.), которая превышает контрольные значения в 7 раз (контрольные значения  $0,18 \pm 0,02$  нМоль/10<sup>3</sup> клеток мин.). Дисфункциональная ЖТ вызывает нейтрофилию легких и печени, которая ассоциируется с усилением метастазирования КРР в эти органы. Усиленное генерирование СР полиморфно-ядерными нейтрофилами в месте воспаления вызывает эндотелиальную дисфункцию и повреждение тканей. Ожирение приводит к нейтрофил-зависимому нарушению целостности сосудов из-за потери адгезии эндотелиоцитами, что способствует экстравазации опухолевых клеток в органы. Разнообразие клонов нейтрофилов и их пластичность лежат в основе потенциала опухоль-ассоциированных нейтрофилов в микроокружении опухоли. На ранних стадиях опухолевого процесса нейтрофилы обнаруживаются преимущественно на периферии опухоли и проявляют цитотоксичность к опухолевым клеткам, генерируя высокие уровни СР. В зрелых опухолях у опухоль-ассоциированных нейтрофилов эти функции понижены до уровней, обеспечивающих их проопухолевые эффекты [17-19]. Больные КРР с избыточным весом по показателю скорости генерирования СР тромбоцитами разделились на три подгруппы. Первая подгруппа (n=8) -  $\leq 1,70$  нМоль/10<sup>3</sup> клеток мин, вторая - (n=16) -  $\leq 1,90$  нМоль/10<sup>3</sup> клеток мин, а третья (n=22) -  $\leq 2,10$  нМоль/10<sup>3</sup> клеток мин. Как видно, наличие опухоли и дисфункциональной ЖТ способствует росту супероксид-генерирующей активности тромбоцитов. В тромбоцитах NOX является основным продуцентом СР, уровни которых определяют степень активации тромбоцитов. Активированные тромбоциты взаимодействуют с эндотелиальными клетками и секретируют про- и антиангиогенные факторы. СР, синтезированные тромбоцитами, в свою очередь запускают цепь образования РФК, адгезию и дифференцировку тромбоцитов в автономном аутоусиливающемся контуре. Этот порочный круг приводит к формированию у тромбоцитов фенотипа с прокоагулянтными свойствами и высокому риску



тромбоза. Для определения 5-летней выживаемости больных в зависимости от скорости генерирования СР тромбоцитами проводили анализ Каплана-Мейера. Из полученных данных видно, что супероксид генерирующая активность тромбоцитов у больных с избыточным весом в 17 раз выше, чем у здоровых людей ( $p < 0,001$ ). Пятилетняя общая выживаемость для подгруппы 1 с высокой активностью составляла 39%; для подгрупп 2 и 3 - 56% и 62%, соответственно. То есть, высокая активность тромбоцитов оказывают существенное влияние на выживаемость больных КРР с ожирением. Выявленные нами изменения в редокс-состоянии опухолей, ЖТ, нейтрофилов и тромбоцитов вызывают рост уровня свободных жирных кислот (СЖК) в крови больных. Содержание СЖК в плазме крови больных КРР с ИМТ  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup> определялось на уровне 0.53 (0.38–0.63) мМоль/л по сравнению с больными КРР, у которых ИМТ  $< 25$  кг/м<sup>2</sup> (0.34 (0.30–0.37) мМоль) и больными язвенной болезнью 0.21 (0.14–0.26) мМоль). Жирные кислоты становятся основным источником энергии для опухоли, катаболизируясь путем окисления в электронтранспортной цепи митохондрий, что является общей чертой опухолей, так же как их способность перепрограммировать метаболизм для поддержки синтеза АТФ и других макромолекул, необходимых для роста и выживания. Существует положительная корреляция между уровнем СЖК в плазме крови и ИМТ, при этом каждой дополнительной единицы роста ИМТ уровень СЖК увеличивается на 1,2% у здоровых доноров и на 3,6% у больных КРР. Нами выявлена связь между количеством тромбоцитов и активностью ММП тромбоцитов, с одной стороны, и количеством как микрометастазов, так и клинически выявленных метастазов, - с другой. Ранее нами было обнаружено, что и при отсутствии, и при наличии диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге низкие показатели активности ММП-9 тромбоцитов ассоциированы с большей трехлетней общей выживаемостью больных раком желудка категории M<sub>0</sub>. Показано, что активность обоих желатиназ тромбоцитов крови больных мКРР как с нормальным, так и с избыточным весом, значительно превышает таковую у пациентов с язвой (в 2,3-5 раз,  $p < 0,05$ ), которые служили группой контроля. При этом у больных КРР с ожирением активность ММП-2 и ММП-9 в 1,7 и 2,4 раза, соответственно, достоверно выше, чем такие показатели у пациентов с нормальным весом. Таким образом, высокий протеолитический потенциал тромбоцитов, обусловленный желатиназами, ассоциирован как с опухолью, так и с избыточным весом пациента. Учитывая функции желатиназ тромбоцитов, связанные с сопровождением циркулирующих диссеминированных опухолевых клеток, можно предположить их роль в усилении метастазирования и неблагоприятном течении мКРР [20-22]. У онкологических больных адипоциты претерпевают значительные морфологические и функциональные изменения, приобретая фибробластоподобный фенотип. Изменения фенотипа адипоцитов включают: 1) утрату способности синтезировать адипонектин и лептин - маркеры конечной дифференциации адипоцитов 2) митохондриальную дисфункцию

3) изменение размеров 4) перепрограммирование метаболизма на гликолиз и активацию генерирования СР. Модифицируя микроокружение опухолевых клеток, гиперлипидемия увеличивает эффективность метастазирования с помощью различных механизмов, включая накопление опухоль-ассоциированных нейтрофилов в органах и усиление генерирования СР. А снижение уровня СР в микроокружении опухолей угнетает их дифференциацию в миофибробласты. Опухоли КРР развиваются в непосредственной близости от адипоцитов и метастазируют в среде, где преимущественно преобладают адипоциты. Рост и метастазирование этих опухолей отражают важную роль адипоцитов, которые присутствуют в их микроокружении и поддерживают прогрессирование опухолей, а микроокружение клеток жировых отложений однозначно обеспечивает опухоли нишу для трансформированных клеток.

#### **Список литературы.**

1. Nicolas Golse & Petru O. Bucur & René Adam, Denis Castaing & Antonio Saunha, Eric Vibe New Paradigms in Post-hepatectomy Liver Failure. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2020, ISSN 1091-255X.- *J Gastrointest Surg*. DOI 10.1007/s11605-012-2048-6.
2. Sreevalsan S, Safe S. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2019 December; 9(4): 350– 357. doi:10.1007/s11888-013-0190-5.
3. Qureshi A, Karpen ch, Qureshi N, et al. Tocotrienols induced inhibition of platelet thrombus formation and platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 58–71.
4. Burlaka, A A Burlaka, S V Virko, I I Ganusevich Molecular mechanisms of oxidation damage and liver cell dysfunction in patients with metastatic colorectal cancer. *Exp Oncol*. 2019 Dec;41(4): 328-334. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-4.13796.
5. McMurray, David A. Patten, Mary-Ellen Harper Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity—Recent Findings and Empirical Approaches/ Fiona. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Nov;24(11):2301-2310. doi: 10.1002/oby.2165.
6. Ковальчук ЛВ, Игнатъева ГА, Ганковская ЛВ. *Иммунология. Практикум: Учеб. пособ. М: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 194 с.*
7. С Matsubara, Y Nishikawa, Y Yoshida, K Takamura A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase, *Anal Biochem*. 1983 Apr 1;130(1): 128-33. doi:10.1016/0003-2697(83)90659-0.
8. С.П. Корочанская, П.Г. Сторожук, И.М. Быков Учебно-методическое пособие по биологической химии. Ч. 2- Учебно-методическое для студентов медицинских вузов.- 2015 г.
9. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К: Наукова думка, 2006. 227 с.

10. Бурлака АП, Сидорик ЄП, Ганусевич ІІ Вплив антикоагулянтів на показники окисного стресу та виживаність хворих на рак прямої кишки після радикального лікування. Український журнал гематології та трансфузіології.- 2008; 2: 38–44.
11. Cooper CE, Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292:C1993–2003. [PubMed: 17329402].
12. Burlaka A.P., Burlaka A.A., Virko S.V., Ganusevich I.I Molecular mechanisms of oxidation damage and liver cell dysfunction in patients with metastatic colorectal cancer.- *Exp.Oncol.*, 2019, 41, 4, 328-334.
13. Burlaka A.P., Ganusevich I.I, Burlaka A.A., Virko S.V., Kolesnik O.O. Tumor – associated redox state in metastatic colorectal cancer. *Exp. Oncol.*.-2019, 41, 2, 148-152.
14. Burlaka AP, Ganusevich II, Vovk AV, Burlaka AA, Gafurov MR, Lukin SN Redox state of adipose tissue for patients with gastric cancer and its connection with the body mass index and distance from the tumor.- *Obesity Research & Clinical Practice*, 09 Nov 2019, 14(1):34-3
15. A. P. Burlaka, A. V. Vovk, A.A. Burlaka, M. R. Gafurov, K. B. Iskhakova, S. N. Lukin Rectal cancer: redox state of venous blood and tissues of blood vessels from electron paramagnetic resonance and its correlation with the five year survival.- *BioMed Research International* 2018; Volume 2018: Article ID 4848652
16. A. Burlaka, A. Vovk, A. Burlaka, M. Gafurov, K. Iskhakova, I. Ganusevich, S. Virko, S. Lukin Redox status of a metastatic microenvironment in the liver of patients with colorectal cancer from EPR.- *Applied Magnetic Resonance*, 50(1-3), 391-402 - March 2019. <https://doi.org/10.1007/s00723-018-1093-z>
17. *Thrombosis Research*, Elsevier, 2016, 139, pp.65-76. [ff10.1016/j.thromres.2016.01.006](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.01.006) ff.fhal-01455290
18. Palacios-Acedo, A.L. Mège, D. Crescence, L. Dignat-George, F.Dubois, C.Panicot-Dubois, Laurence. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Frontiers in Immunology*, 2019; 10; 1805 DOI={10.3389/fimmu.2019.01805.
19. Ганусевич І.І., Мамонтова Л.А., Ковельська А.В., Гуменюк Л.Д., Меренцев С.П. Желатинази тромбоцитів у метастазуванні та прогнозі перебігу раку шлунка. *Онкологія*, 2016; 18(2);130-136.
20. By Nicole Bona, Katie DeCicco-Skinner Obesity as a Promoter of Cancer Development and Progression Submitted:May10th2018Reviewed: July 26th 2018Published: November 5th 2018. DOI: 10.5772/intechopen.80516.
21. Takuya Sakurai, Junetsu Ogasawara, Ken Shirato, Tetsuya Izawa, Shuji Oh-ishi, Yoshinaga Ishibashi, Zsolt Radák, Hideki Ohno, Takako Kizaki, "Exercise Training Attenuates the Dysregulated Expression of Adipokines and Oxidative Stress in White Adipose Tissue", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 9410954, 12 pages, 2017.

**РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ  
ПРИ ГЕМОЛИЗЕ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА**

**Войнаровский В.В.**

*аспирант кафедры биофизики  
Белорусского государственного университета,  
г. Минск, Беларусь  
voynarovskiy@bsu.by*

**Вчерашняя А.В.**

*старший преподаватель кафедры биофизики  
Белорусского государственного университета,  
г. Минск, Беларусь  
tuata\_de\_danann@mail.ru*

**Мартинович Г.Г.**

*д.б.н.,  
заведующий кафедрой биофизики  
Белорусского государственного университета,  
г. Минск, Беларусь  
martinovichgg@bsu.by*

*В представленной работе рассмотрена регуляция структурной устойчивости эритроцитов пероксидом водорода при гемолизе наночастицами серебра. Обнаружено повышение структурной стабильности мембраны эритроцитов при гемолизе вызванном наночастицами серебра и нитратом серебра при предварительном инкубировании с пероксидом водорода в течение 10 минут при концентрации 100 – 800 мкМ. Область действия эффекта установлена с применением многофакторной математической модели, учитывающей ключевые пути утилизации пероксида водорода в эритроцитах.*

**Ключевые слова:** эритроциты; наночастицы серебра; структурная стабильность; пероксид водорода

**REDOX REGULATION OF THE STRUCTURAL PROPERTIES OF  
ERYTHROCYTES IN HEMOLYSIS BY SILVER NANOPARTICLES**

**Voinarovski V.V.**

*Postgraduate student of the Department of Biophysics of  
Belarusian State University, Minsk, Belarus,  
voynarovskiy@bsu.by*

**Vcherashniaya A.V.**

*Senior Lecturer of the Department of Biophysics of  
Belarusian State University, Minsk, Belarus,  
tuata\_de\_danann@mail.ru*

**Martinovich G.G.**

*Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Biophysics of  
Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*martinovichgg@bsu.by*

*In this work the regulation of the structural stability of erythrocytes by hydrogen peroxide during hemolysis by silver nanoparticles were investigated. An increase in the structural stability of the erythrocyte membrane was found during hemolysis caused by silver nanoparticles and silver nitrate upon preliminary incubation with hydrogen peroxide for 10 minutes at a concentration of 100–800  $\mu\text{M}$ . The area of effect was established using a multivariate mathematical model, suitable key pathways for the utilization of hydrogen peroxide in erythrocytes.*

**Key words:** *erythrocytes; silver nanoparticles; structural stability; hydrogen peroxide*

Важным явлением при клеточном дыхании является образование активных форм кислорода (АФК), обладающих широким спектром физиологического и патофизиологического действия. Умеренное повышение концентрации окислителей активирует защитные механизмы, благодаря которым поддерживается баланс образования и утилизации АФК, а нарушение этого баланса приводит к повреждению клеток и развитию заболеваний. Наночастицы металлов, способные катализировать окислительно-восстановительные процессы, изменяют баланс образования и утилизации АФК в клетках и, тем самым, могут регулировать биологические процессы. С другой стороны, механизм действия наночастиц зависит от внешних редокс-условий. В представленной работе в экспериментах *in vitro* и *in silico* исследованы механизмы действия экзогенного пероксида водорода на структурную стабильность эритроцитов при гемолизе, индуцированном наночастицами серебра.

**Материалы и методы:** В эксперименте использовали кровь здоровых доноров, полученную в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». Эритроциты выделяли путём центрифугирования при 1500 об/мин в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ  $\text{NaCl}$ , 2,7 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ D-глюкозы (рН 7,4).

Наночастицы серебра получали из нитрата серебра, с применением методов зелёной химии. Раствор нитрата серебра в концентрации 1 мМ смешивали с водным экстрактом растений в соотношении 9:1 при рН 8.0 и оставляли на 1 час при комнатной температуре. Окончание синтеза устанавливали по появлению пика локализованного поверхностного плазмонного резонанса при 400 нм.

Кинетики гемолиза эритроцитов измеряли с использованием спектрофлуориметра Solar CM-2203 (SOLAR, Беларусь) путём регистрации оптической плотности клеточной суспензии ( $3 \cdot 10^7$  клеток/мл) на длине волны 680 нм. Концентрацию эритроцитов выбирали таким образом, чтобы начальная оптическая плотность составляла 0.5. В измерительную кювету добавляли 1 мл суспензии отмытых эритроцитов и термостатировали в течение 3-4 минут при

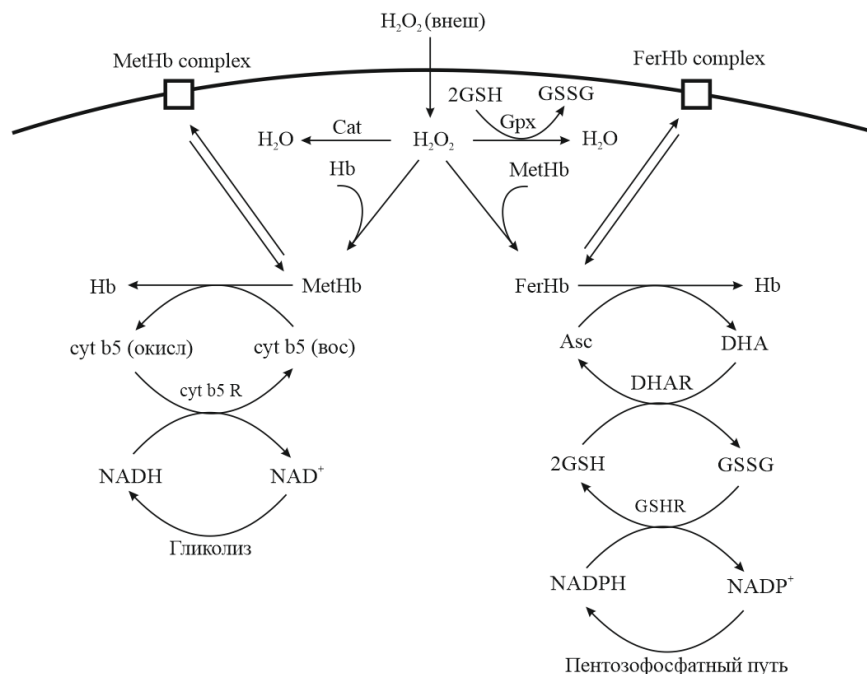
температуре 37°C при постоянном перемешивании. Гемолиз инициировали путём добавления нитрата серебра при концентрации 100 мкМ или наночастиц серебра, полученных из нитрата серебра, при концентрации 250 мкМ к суспензии эритроцитов при предварительном инкубировании с пероксидом водорода в течение 10 минут при концентрациях 100 – 800 мкМ.

Оценка эффекта (I) определялась как относительная разность оптической плотности после 25 минут инкубирования с наночастицами серебра или нитратом серебра в присутствии пероксида водорода и оптической плотности после 25 минут инкубирования с наночастицами серебра или нитратом серебра без пероксида водорода.

**Результаты и обсуждение.** Ранее, нами в [1] было показано, что предварительное инкубирование эритроцитов с пероксидом водорода в микромолярных концентрациях индуцирует адаптацию клеток к окислительному стрессу. В данной работе показано, что пероксид водорода повышает структурную стабильность эритроцитов в условиях воздействия наночастиц серебра.

Передача редокс-сигнала на внутриклеточные мишени с учетом редокс-свойств наночастиц представляет собой сложную цепочку взаимосвязанных событий, теоретическое описание которых возможно с использованием многофакторных моделей. В результате исследований разработана математическая модель, связывающая транспорт и метаболизм пероксида водорода, состояние антиокислительной системы эритроцитов, метаболическую активность клеток, редокс-состояние гемоглобина и структурную стабильность мембран. Модель учитывает процессы диффузии пероксида водорода в клетку, утилизацию ферментами каталазой и глутатионпероксидазой, а также взаимодействие с гемоглобином и метгемоглобином. При низких концентрациях пероксида водорода все процессы являются обратимыми. Восстановление метгемоглобина и феррилгемоглобина происходит с участием ферментов и неферментативных восстановителей с расходом энергии, образующейся в процессах гликолиза и пентозофосфатного пути. Взаимодействие белков с мембраной промоделировано кинетикой лиганд-рецепторного взаимодействия. Общая схема процессов представлена на рисунке 1. Диффузия пероксида водорода в клетку и утилизация с участием ферментов каталазы и глутатионпероксидазы приводит к расходу его общего количества во внеклеточной и внутриклеточной среде. Время протекания данных процессов при концентрации пероксида водорода 500 мкМ и количестве клеток 30 млн. не превышает 5 минут. Таким образом, прямое взаимодействие наночастиц и пероксида водорода исключается. Конкурирующими процессами с участием пероксида водорода в клетке являются взаимодействия с основным белком клетки гемоглобином, с образованием его окисленных форм: метгемоглобина или, при высокой концентрации пероксида водорода, феррилгемоглобина. Оба белка имеют высокие константы связывания с мембраной, однако при

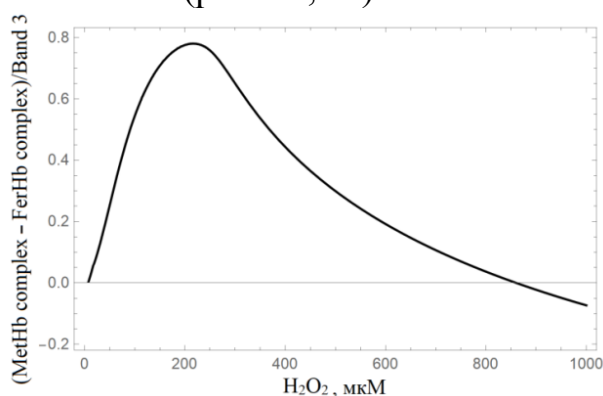
связывании метгемоглобина происходит увеличение структурной стабильности мембраны, а образование феррилгемоглобинов и их взаимодействие с мембраной под действием окислительного стресса приводит к уменьшению структурной стабильности.



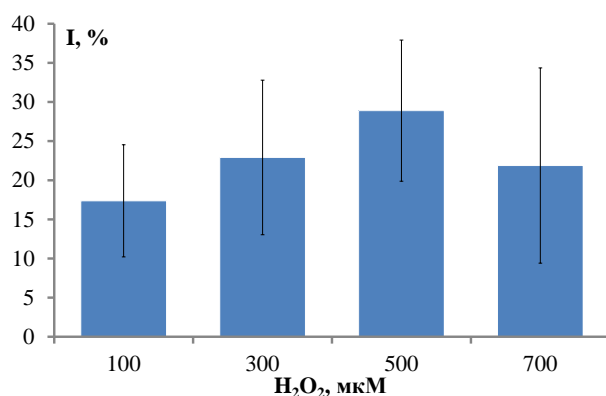
**Рисунок. 1.** Процессы метаболизма эритроцитов с участием пероксида водорода, рассмотренные в модели. Hb гемоглобин; MetHb метгемоглобин; FerHb феррилгемоглобин;  $H_2O_2$  пероксид водорода;  $H_2O_2$  (внеш) внеклеточный пероксид водорода; Cat каталаза; Gpx глутатионпероксидаза; GSH глутатион; GSSG глутатион дисульфид; cyt b5 (окисл) окисленная форма цитохрома b5; cyt b5 (вос) восстановленная форма цитохрома b5; cyt b5 R цитохром b5 редуктаза; NAD<sup>+</sup>/NADH окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида; Asc аскорбиновая кислота; DHA дегидроаскорбат; DHAR дегидроаскорбатредуктаза; GSHR глутатионредуктаза; NADP<sup>+</sup>/NADPH окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата; MetHb complex мембранный комплекс с метгемоглобином; FerHb complex мембранный комплекс с феррилгемоглобином

На рисунке 2а представлена теоретически рассчитанная зависимость разности количества образованных мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина от количества внеклеточного пероксида водорода, при числе клеток 30 млн. и времени предварительного инкубирования равном 10 минутам. На основе численного моделирования процессов взаимодействия окисленных форм гемоглобина с мембраной эритроцитов была установлена область концентраций внеклеточного пероксида водорода, при которых возможна активация адаптационных процессов, что позволило проведение экспериментальной проверки.

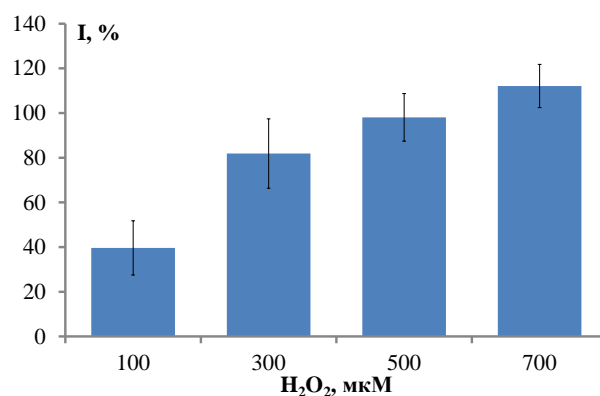
В ходе эксперимента выявлено, что предварительное инкубирование эритроцитов с пероксидом водорода приводит к уменьшению числа гемолизированных клеток в условиях воздействия наночастиц серебра и нитрата серебра. Наблюдается различие в величине эффекта и положении максимума для наночастиц серебра и нитрата серебра. Максимальный протекторный эффект при разрушении нитратом серебра наблюдается при внеклеточной концентрации пероксида водорода 700 мкМ, при этом наблюдается полное отсутствие гемолизированных клеток в сравнении с контролем. В свою очередь, при разрушении наночастицами серебра эффект достигает максимума при 500 мкМ внеклеточного пероксида водорода, при этом в культуре остаётся треть от первоначального количества клеток (рис. 2б, 2в).



а



б



в

**Рисунок. 2.** Теоретически рассчитанная разность количества мембранных комплексов метгемоглобина и феррилгемоглобина (а); доля негемолизированных эритроцитов в зависимости от концентрации внеклеточного пероксида водорода (б – гемолиз наночастицами серебра, в – гемолиз нитратом серебра)

**Заключение:** В результате теоретических и экспериментальных исследований показано, что пероксид водорода в концентрациях 100 – 700 мкМ активирует адаптационный механизм эритроцитов, обусловленный ростом числа связанного с мембраной метгемоглобина, что повышает структурную



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

стабильность мембраны и снижает число разрушенных наночастицами серебра и нитратом серебра клеток.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б20У-1).

**Список литературы**

1. Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г. Структурная устойчивость эритроцитов в условиях окислительного стресса: математическая модель и эксперимент; Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 2. / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2021. – 490 с.

**ПЕРВИЧНАЯ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА КРИВЫХ  
ПЛАВЛЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ  
ПРЕПАРАТОМ ЦИСПЛАТИН И ЕГО НЕАКТИВНЫМ АНАЛОГОМ  
ТРАНСПЛАТИНОМ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ  
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ**

**Галюк Е.Н.**

*к. х. н., ведущий лаборант кафедры биоорганической химии учреждения  
образования «Белорусский государственный университет»,  
г. Минск, Беларусь  
elenagalyuk5@gmail.com*

**Ринейская О.Н.**

*к. м. н., доцент, заведующий кафедрой биоорганической химии  
учреждения образования «Белорусский государственный университет», г.  
Минск, Беларусь  
ryneiskaya@mail.ru*

*В данной статье предлагается метод первичной математической обработки кривых плавления ДНК, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии, для которых, в отличие от олигонуклеотидных дуплексов, характерны такие искажения, как отклонение от линейности до и после перехода спираль-клубок. Использование метода облегчает интерпретацию результатов исследования комплексов ДНК с противоопухолевыми соединениями платины и определение их термодинамических параметров.*

**Ключевые слова:** *дифференциальные кривые плавления; первичная математическая обработка; ДНК; противоопухолевые соединения платины*

**PRIMARY MATHEMATICAL PROCESSING OF MELTING CURVES  
OF DNA-ANTITUMOR DRUG CISPLATIN AND THEIR INACTIVE  
ANALOG TRANSPLATIN OBTAINED BY DIFFERENTIAL SCANNING  
CALORIMETRY METHOD**

**Galyuk E.N.**

*Candidate of Chemistry, leading laboratory assistant of the Department of  
Bioorganic Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State University",  
Minsk, Belarus  
elenagalyuk5@gmail.com*

**Ryneiskaya O.N.**

*Candidate of Medical sciences, Associated Professor, the Head of the  
Department of Bioorganic Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State  
University", Minsk, Belarus  
ryneiskaya@mail.ru*

*The article deals with primary mathematical processing of DNAs melting curves obtained by differential scanning calorimetry method. In contrast of oligonucleotide duplexes these curves have such distortions as deviations from linearity before and after helix-coil transition. This method facilitates results interpretation of DNA antitumor platinum complexes and determination of their thermodynamic parameters.*

**Key words:** *differential melting curves; primary mathematical processing; DNA; antitumor platinum drugs*

Цисплатин — это эффективный противоопухолевый препарат, который осуществляет свое фармакологическое действие путем сильного координационного связывания с ДНК. Он широко используется для лечения рака яичка, яичников, шейки матки, мочевого пузыря, легких, а также опухолей головы и шеи [1]. Для выяснения деталей механизма действия препарата и было предпринято настоящее исследование.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) широко используется для исследования комплексов противоопухолевых соединений платины и их неактивных аналогов с олигонуклеотидными дуплексами (короткими ДНК) [2]. Однако для платинированных ДНК млекопитающих при использовании ДСК выявляется ряд трудностей, что затрудняют интерпретацию полученных результатов и определение термодинамических параметров комплексов. Поэтому целью исследования была разработка метода первичной математической обработки ДСК кривых для устранения искажений и получения при его использовании неискаженных термограмм, а также вычисления термодинамических параметров комплексов ДНК с противоопухолевым препаратом цисплатин и его неактивным аналогом трансплатином.

Материалы и методы исследования. В данной работе использовался дифференциальный сканирующий нано-калориметр CSC 6300 (Nano-Differential Scanning Calorimeter III (model CSC 6300)). Платинирование ДНК из тимуса теленка (Sigma-Aldrich) проводили инкубацией с цисплатином или трансплатином в 0.01 М NaClO<sub>4</sub> в течение 48 часов при 37°C в темноте, молярное отношение платина / нуклеотид составляло 0.01 и 0.05. Плавление проводили в 0.02М (или 0.1М) NaCl, 0.001М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.01М NaClO<sub>4</sub>, 5·10<sup>-5</sup>М EDTA, pH ~7. Концентрация платинированной ДНК составляла 0.7 мг/мл. Переход спираль-клубок ДНК вызывает появление пика в области 63-90°C.

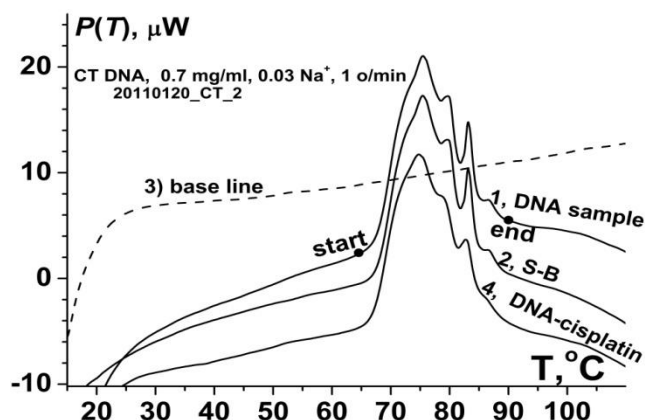
Первичными данными для калориметров подобного типа является тепловой поток (термограмма), т.е. температурная зависимость дополнительной мощности нагревателя ячейки с образцом относительно нагревателя ячейки сравнения  $P_s(T)$ . Обычно ДСК эксперимент и его первичную математическую обработку проводят по следующей общей схеме: калориметрические измерения начинают с определения инструментальной базовой линии ( $P_b(T)$ ). Для этого первое сканирование проводится для ячеек образца и сравнения, заполненных растворителем. Затем ячейку образца заполняют исследуемым раствором ДНК и

проводят повторное сканирование, которое дает термограмму ДНК ( $P_s(T)$ ). Плавление (переход спираль-клубок) ДНК проявляется в виде ярко выраженного пика теплопоглощения (рисунок 1). Вычитая инструментальную базовую линию из термограммы образца, получают температурную зависимость теплопоглощения  $P_s(T)-P_b(T)$ . Области до ( $T < T_s$ ) и после ( $T > T_e$ ) пика соответствуют спиральному и денатурированному состояниям ДНК. Они описываются функциями  $\varphi_1(T)$  и  $\varphi_2(T)$ , которые используются для определения базовой линии:

$$b(T) = (1 - \vartheta) \cdot \varphi_1(T) + \vartheta \cdot \varphi_2(T),$$

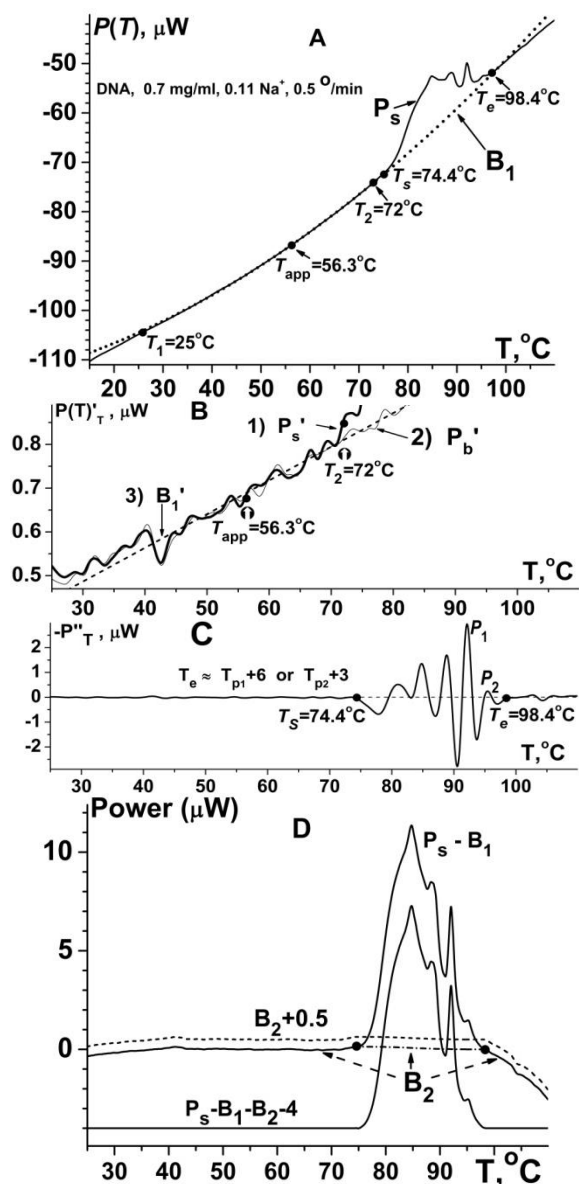
где  $\vartheta(T)$  - доля пар оснований ДНК в расплавленном состоянии. Разность теплопоглощения и базовой линии является избыточным теплопоглощением, обусловленным переходом спираль-клубок ДНК:

$$P_{h-c}(T) = P_s(T) - P_b(T) - b(T).$$



**Рисунок 1.** Исходная термограмма немодифицированной ДНК до (1) и после (2) вычитания инструментальной базовой линии (3). Термограмма ДНК, химически модифицированной противоопухолевым препаратом цисплатин при ( $P_t / \text{нуклеотид} = 0.01$ ) (4). Скорость нагревания  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ .

На рисунке 1 представлены результаты сканирования комплекса ДНК тимуса телят с препаратом цисплатин (кривая 1) и приборная базовая линия (кривая 3), наиболее близкая по форме к температурным областям, расположенным до и после температурной области перехода спираль-клубок. В данном случае вычитание приборной базовой линии не приближает исходную кривую  $P_s(T)$  (рисунок 1, кривая 1) к кривой перехода спираль-клубок ( $P_{h-c}(T)$ ) (рисунок 1, кривая 2). Из рисунка 1 видно, что температуру начала и особенно завершения перехода спираль-клубок платинированной ДНК невозможно определить однозначно. Поэтому мы разработали процедуру, основанную на использовании первых и вторых производных исходной термограммы. Результаты представлены на рисунке 2.



**Рисунок 2.** Математическая обработка термограммы раствора ДНК  $P_s(T)$ . **А)** Исходная термограмма  $P_s(T)$  и рассчитанная первая базовая линия ( $B_1$ ), заменяющая инструментальную базу. **В)** Первые производные по температуре исходной термограммы  $P'_s(T)$ , инструментальной базовой линии  $P'_b(T)$  и рассчитанной первой базовой линии  $B'_1(T)$ . **С)** Вторая отрицательная производная термограммы  $[-P''_s(T)]$ . **Д)** Разность между исходной кривой и первой базовой линией ( $P_s - B_1$ ), вторая базовая линия до ( $B_2$ ) и после ( $B_2 + 0.5 \mu\text{W}$ ) ее смещения на  $0.5 \mu\text{W}$ . Кривая теплопоглощения перехода спираль-клубок ( $P_{h-c} = P_s - B_1 - B_2$ ), смещенная на  $-4 \mu\text{W}$ .  $T_1=25^{\circ}\text{C}$  и  $T_2=72^{\circ}\text{C}$  начало и конец температурного интервала перехода, предшествующего переходу спираль-клубок;  $T_s=74.4^{\circ}\text{C}$  и  $T_e=98.4^{\circ}\text{C}$  – начало и конец температурного интервала перехода спираль-клубок ДНК;  $T_{app}=56.3^{\circ}\text{C}$  – температура, используемая для вычисления первой базовой линии  $B_1(T)$ .

Нами были обнаружены три особенности используемого калориметра:

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

1) Первые производные термограммы на участке от температуры, превышающей начало регистрации на  $150^{\circ}\text{C}$ , до температуры, соответствующей началу перехода спираль-клубок, являются линейными функциями, на которые накладываются незначительные быстрые шумы и значительно более сильные медленные шумы. Линейность выполняется даже для самых плохих кривых теплопоглощения, полученных в условиях сильной разбалансировки ячеек (рисунок 2В).

2) Аппроксимирующая линейная функция для производных термограммы и приборной базы параллельны и близки по величине. Параллельность сохраняется почти до конца области перехода спираль-клубок. Только в самом конце перехода производная базовой линии отклоняется от аппроксимирующей прямой.

3) Начало ( $T_s$ ) и конец ( $T_e$ ) кривых плавления ДНК хорошо определяются на их вторых производных (рисунок 2С).

Изложенные выше данные предполагают возможность замены инструментальной базовой линии неким рассчитанным ее аналогом, который определяется линейной аппроксимацией первой производной термограммы. Из линейной аппроксимации определяется полином второй степени, описывающий функцию  $B_1$ , заменяющую приборную базу  $P_b(T)$ . Однако предварительные расчеты показали, что первая производная  $P_s'(T)$  характеризуется довольно сильными медленными шумами, которые не удаляются даже при сильном сглаживании (расстояние между точками  $h=0.1^{\circ}\text{C}$ , степень полинома  $n=2$ , число точек, по которым проводится аппроксимация,  $n_p=21$ ) (рисунок 2В,  $P_s'(T)$ ). Такое сглаживание является настолько сильным, что уменьшает самый высокий пик отрицательной второй производной в десять раз по сравнению с его реально высотой (пик  $P_1$ , рисунок 2С). Как показывают расчеты, быстрые шумы практически полностью подавляются при гораздо более слабом сглаживании (фильтрации) ( $h=0.1^{\circ}\text{C}$ ,  $n=3$ ,  $n_p=9$ ). Для подавления медленных шумов разработана отдельная специальная процедура.

Используя разработанный алгоритм, мы обнаружили, что связывание противоопухолевого препарата цисплатин и его неактивного аналога трансплатина вызывает совсем небольшое изменение температуры плавления ДНК, но приводит к очень сильному уменьшению энтальпии и энтропии перехода спираль-клубок в составе комплексов ДНК с соединениями платины. Для препарата цисплатин уменьшение энтальпии на одну модификацию составляет  $\sim 23$  ккал на моль модификаций. Для его неэффективного аналога трансплатина эта величина еще выше ( $\sim 38$  ккал). Однако, несмотря на малое изменение температуры плавления, оба соединения сильно изменяют тонкую структуру дифференциальной кривой плавления.

**Список литературы**

1. Wang, D. Cellular processing of platinum anticancer drugs/ D. Wang, S.J. Lippard // Nat. Rev. Drug. Discov. -2005. -V. 4. -P. 307-320.
2. Nunomura, K. The interaction of platinum complexes with DNA studied by differential scanning calorimetry/ K. Nunomura, Y. Maeda, E. Ohtsubo. // J. Gen. Appl. Microbiol. -1991. -V. 37, N2. -P. 207-214.

**ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ  
ПИЯВКИ *HIRUDO MEDICINALIS* НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ  
АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ**

**Горудко И.В.**

*к. б. н., доцент, доцент кафедры биофизики физического факультета  
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь  
irinagorudko@gmail.com;*

**Григорьева Д.В.**

*к. б. н., доцент кафедры биофизики физического факультета  
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь  
dargr@tut.by;*

**Живолковская А.Д.**

*студент кафедры биофизики физического факультета Белорусского  
государственного университета, г. Минск, Беларусь  
anzh2204@gmail.com;*

**Реут В.Е.**

*аспирант кафедры биофизики физического факультета Белорусского  
государственного университета, г. Минск, Беларусь  
nika.lutsenko@tut.by;*

**Графская Е.Н.**

*лаборант лаборатории генной инженерии ФГБУ ФНКЦ физико-  
химической медицины ФМБА, г. Москва, Россия  
grafskayacath@gmail.com*

**Лацис И.А.**

*младший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ  
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, г. Москва, Россия  
lakis.ivan@gmail.com;*

**Горбунов Н.П.**

*научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт  
экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия  
niko\_laygo@mail.ru;*

**Костевич В.А.**

*к. б. н., старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург,  
Россия*

*hfa-2005@yandex.ru;*

**Соколов А.В.**

*д.б.н.,  
заведующий лабораторией  
биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ  
«Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия*



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*biochemsokolov@gmail.com;*

**Панасенко О.М.**

*д.б.н.,*

*профессор, заведующий отделом биофизики ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, г. Москва, Россия*

*o-panas@mail.ru;*

**Лазарев В.Н.**

*д.б.н., доцент, заведующий отделом клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, г. Москва, Россия*

*lazar0@mail.ru*

*Рассмотрены особенности действия новых антимикробных пептидов (АМП) медицинской пиявки на основные функциональные ответы нейтрофилов. Среди исследуемых АМП RWRVCFLCRRKKV (536\_1) и FRIMRILRVLK (3967\_1) обладали наибольшей способностью активировать респираторный взрыв нейтрофилов и усиливать дегрануляцию нейтрофилов, регистрируемую по экзоцитозу миелопероксидазы и лактоферрина.*

**Ключевые слова:** *антимикробные пептиды; нейтрофилы; респираторный взрыв; дегрануляция*

**INFLUENCE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF THE MEDICINAL LEECH *HIRUDO MEDICINALIS* ON NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY**

**Gorudko I.V.**

*PhD in Biology, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*irinagorudko@gmail.com;*

**Grigorieva D.V.**

*PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*dargr@tut.by;*

**Zhivolkovskaya A.D.**

*Student of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*anzh2204@gmail.com;*

**Reut V.E.**

*Post-graduate student of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*nika.lutsenko@tut.by;*

**Grafskaia E.N.**

*Laboratory Assistant of the Genetic Engineering Laboratory, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*grafskayacath@gmail.com;*

**Latsis I.A.**

*Junior Researcher Fellow of the Laboratory of Genetic Engineering, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,*  
*latis.ivan@gmail.com*

**Gorbunov N.P.**

*Junior Researcher Fellow of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia,*  
*niko\_laygo@mail.ru;*

**Kostevich V.A.**

*PhD in Biology, Senior Researcher of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia,*  
*hfa-2005@yandex.ru;*

**Sokolov A.V.**

*Doctor of Science in Biology, Head of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia,*  
*biochemsokolov@gmail.com;*

**Panasenko O.M.**

*Doctor of Science in Biology, Professor, Head of the Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,*  
*o-panas@mail.ru;*

**Lazarev V.N.**

*Doctor of Science in Biology, Associate Professor, Head of the Department of Cell Biology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,*  
*lazar0@mail.ru*

*The features of the action of new antimicrobial peptides (AMPs) of the medicinal leech on the main functional responses of neutrophils are considered. Among the studied AMPs RWRVCFLCRRKKV (536\_1) and FRIMRILRVLK (3967\_1) had the greatest ability to activate the respiratory burst of neutrophils and enhance neutrophil degranulation, recorded by exocytosis of myeloperoxidase and lactoferrin.*

**Key words:** *antimicrobial peptides; neutrophils; respiratory burst; degranulation*

В последние годы актуальной задачей является синтез пептидов, которые обладают не только антимикробным эффектом, но также способных оказывать иммуномодулирующее действие на клетки крови. Ранее на основе биоинформатического анализа генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* были идентифицированы и синтезированы катионные антимикробные пептиды

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

(АМП), обладающие антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, низкой гемолитической активностью и не проявляющие цитотоксического эффекта по отношению к клеткам млекопитающих [1]. Кроме того, ранее нами было показано, что данные АМП способны избирательно модулировать (усиливать или ингибировать) биологическую активность собственных эндогенных антимикробных белков и пептидов (миелопероксидазы, эластазы, лизоцима) [2].

Целью настоящей работы явилось исследование эффектов новых синтезированных АМП медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов, которые являются важнейшими эффекторными клетками системы врожденного иммунитета [3] и обеспечивают первичную линию защиты организма от инфекционных агентов.

В работе использовали следующие АМП: FRIMRILRVLK (3967\_1), KFKKVIWKSFL (12530), RWRVCFLCRRKKV (536\_1) и RPIRVRRIRVI (19347\_2). Максимальное значение среди минимальных концентраций АМП, необходимых для достижения 100 %-ого ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* и *Bacillus subtilis* (МИК<sub>max</sub>), составило 17 мкМ для 536\_1, 90 мкМ для 12530, 10 мкМ для 3967\_1 и 77 мкМ для 19347\_2.

Жизнеспособность нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии по регистрации пропидиум йодид (PI)-положительных клеток. Изменение мембранного потенциала нейтрофилов регистрировали флуоресцентным методом с применением diO-C3-(5). Респираторный взрыв нейтрофилов оценивали флуоресцентным методом с применением различных хемосенсоров. Для сравнения результатов, полученных при использовании традиционных хемосенсоров (Амплекс Ред, дигидроэтидин и диацетат 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин), также применили предложенные нами новые зонды типа «turn-on»: галлоцианин (GC) [4] и целестиновый синий В(СВ) [5], которые реагируют соответственно с супероксидным анион-радикалом и хлорноватистой кислотой (НОСl) с образованием флуоресцирующих продуктов с максимумом возбуждения/регистрации флуоресценции при 360/490 нм для GC и при 490/580 нм для СВ.

Было установлено, что после инкубации нейтрофилов с исследуемыми АМП медицинской пиявки в концентрациях, соответствующих МИК<sub>max</sub>, количество PI-положительных нейтрофилов практически не изменялось. Внесение в суспензию нейтрофилов синтезированных АМП сопровождалось быстрой гиперполяризацией клеток (в течение 3 мин), сопоставимой с действием валиномицина (калиевый ионофор), что указывает на связывание АМП с плазматической мембраной клеток.

АМП 536\_1 и 3967\_1 дозо-зависимым образом стимулировали респираторный взрыв нейтрофилов. Продукция активных форм кислорода (АФК) при активации клеток АМП ингибировалась в присутствии DPI – ингибитора сборки НАДФН-оксидазы; в среде без кальция; а также в

присутствии генистеина – ингибитора тирозинкиназ. Вышеупомянутые АМП также усиливали агонист-индуцированную дегрануляцию азурофильных и специфических гранул, регистрируемую по секреции во внеклеточную среду миелопероксидазы и лактоферрина соответственно. АМП 12530 и 19347\_2 проявляли менее выраженную способность активировать респираторный взрыв нейтрофилов, однако усиливали агонист-индуцированную продукцию АФК клетками. АМП 536\_1 увеличивал долю жизнеспособных нейтрофилов, в том числе после стимуляции апоптоза фактором некроза опухоли-альфа. Ни один из исследуемых АМП не влиял на секрецию нейтрофилами интерлейкина-8, в том числе после стимуляции клеток фторболовым эфиром.

На основании полученных данных можно заключить, что новые синтетические АМП медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* способны взаимодействовать с мембраной нейтрофилов и активировать респираторный взрыв клеток, что представляется перспективным для разработки на их основе новых лекарственных средств с бифункциональными свойствами.

Работа поддержана грантами БРФФИ (Б20Р-215), РФФИ (20-515-00006) и МД-1901.2020.4.

### Список литературы

1. Grafiskaia, E. N. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens / E. N. Grafiskaia, K. D. Nadezhdin, I. A. Talyzina, N. F. Polina, O. V. Podgorny, E. R. Pavlova, P. V. Bashkirov, D. D. Kharlampieva, P. A. Bobrovsky, I. A. Latsis, V. A. Manuvera, V. V. Babenko, V. M. Trukhan, A. S. Arseniev, D. V. Klinov, V. N. Lazarev // Eur. J. Med. Chem. – 2019. – Vol. 180. – P. 143–153.
2. Григорьева, Д. В. Влияние новых антимикробных пептидов медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на функциональную активность белков гранул нейтрофилов / Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, Е. Н. Графская, И. А. Лацис, А. В. Соколов, О. М. Панасенко, В. Н. Лазарев // Медицинский академический журнал. – 2021. – Т. 21, № 3. – С. 49–62.
3. Selders, G. S. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration / G. S. Selders, A. E. Fetz, M. Z. Radic, G. L. Bowlin // Regen. Biomater. – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 55–68.
4. Панасенко, О. М. Галлоцианин как флуороген для выявления НАДФН-зависимой продукции супероксидного анион-радикала клетками крови / О. М. Панасенко, В. Е. Реут, И. В. Бородина, Д. С. Матюшкина, В. А. Иванов, Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, А. В. Соколов, С. Н. Черенкевич // Биоорганическая химия. – 2021. – Т. 47, № 1. – С. 153–161.
5. Луценко, В. Е. Целестиновый синий В – зонд для регистрации продукции хлорноватистой кислоты и НОС1-модифицированных белков /

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

В. Е. Луценко, Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, С. Н. Черенкевич,  
Н. П. Горбунов, В. А. Костевич, О. М. Панасенко, А. В. Соколов // Медицинский  
академический журнал. – 2019. – Т. 19, вып. 2. – С. 63–72.

## **РОЛЬ БИОМАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

**Гришенкова Л.Н.**

*к. м. н., доцент, заведующий лабораторией клинической морфологии,  
молекулярной генетики и канцерогенеза государственного учреждения «РНПЦ  
онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова»  
lgrish@gmail.com;*

**Борисевич С.Н.**

*кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры биоорганической химии  
учреждения образования «Белорусский государственный медицинский  
университет», г. Минск, Беларусь  
Svetlana-2308@yandex.by;*

*В статье рассмотрены современные возможности лабораторной диагностики злоупотребления алкоголем. Приводится характеристика традиционных непрямых биомаркеров с узким временным диагностическим окном действия, уровень которых может повышаться при различных патологических процессах; прямых биомаркеров, реагирующих только на поступление этанола в организм; и ряда относительно новых кандидатов в биомаркеры или компоненты панелей биомаркеров. Среди всех таких биомаркеров наиболее перспективным представляется определение фосфатидилэтанола ввиду его высокой диагностической чувствительности и специфичности, а также возможности включаться в компоненты клеточных мембран, характерно изменяя их структурно-функциональные свойства.*

**Ключевые слова:** *хроническая алкогольная интоксикация; биомаркеры; диагностика*

## **ROLE OF THE BIOMARKERS IN DIAGNOSTICS OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION**

**Grishenkova L.N.**

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Laboratory of  
Clinical Morphology, Molecular Genetics and Carcinogenesis of the State  
Institution «Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical  
Radiology»*

*lgrish@gmail.com;*

**Borisevitch S.N.**

*Candidate of Pharmacy, Associate Professor of the Department of Bioorganic  
Chemistry of the Educational Institution «Belarusian State Medical University»,  
Minsk, Belarus*

*Svetlana-2308@yandex.by;*

*In the article, there are discussed the modern possibilities of laboratory diagnostics of alcohol abuse. There is given the characteristics of traditional indirect biomarkers with a narrow time window of detection, the level of which can increase in*

*various pathological processes; direct biomarkers that react only to the intake of ethanol; a number of relatively new "candidates" for biomarkers or components of biomarker panels. Among all the used biomarkers, the most promising is the determination of phosphatidylethanol due to its high diagnostic sensitivity and specificity, as well as the ability to be included in the components of cell membranes, changing their structural and functional properties.*

**Keywords:** *chronic alcohol intoxication; biomarkers; diagnostic*

Расстройства здоровья, связанные с употреблением алкоголя, представляют собой одну из важных проблем современной практической медицины вследствие критического характера влияния изучаемой патологии на демографическую безопасность нации [1-3]. Несмотря на определенные позитивные тенденции в развитии алкогольной ситуации в последние годы, Республика Беларусь относится к странам с высоким уровнем потребления алкоголя, заболеваемости наркологическими расстройствами алкогольного спектра и алкоголь-ассоциированной смертности [4,5]. В докладе экспертов ВОЗ хроническая алкогольная интоксикация, наряду с острой алкогольной интоксикацией и алкогольной зависимостью, рассматривается как один из трех основных механизмов нанесения вреда в результате употребления алкогольных напитков [6].

Демографический резерв в снижении алкогольных потерь заключается в целенаправленном воздействии на их предотвратимые причины. Для оценки реального вклада алкогольного фактора в социально-демографическую ситуацию и выработки мер по преодолению негативных последствий для здоровья населения важна своевременная и достоверная информация о масштабах и тенденциях явления. Однако выявление расстройств здоровья, связанных с систематическим злоупотреблением алкоголем, до возникновения соматических осложнений алкоголизма и его социальных последствий представляет определенные трудности. Алкоголь-ассоциированная патология внутренних органов характеризуется нозологической гетерогенностью и может иметь различные клинические варианты – от бессимптомных и латентных форм, до прогностически неблагоприятных и тяжелых [7]. Постановка диагноза алкоголь-ассоциированных заболеваний, как прижизненного, так и постмортального, нередко осложняется и полным отсутствием сведений о количестве и частоте употреблявшегося индивидуумом алкоголя. Следовательно, для выявления злоупотребляющих алкоголем лиц очень важно располагать объективными и надежными лабораторными диагностическими методами, основывающимися на комплексной оценке показателей метаболизма этанола.

Лабораторные тесты, используемые для обнаружения вызванных употреблением спиртных напитков изменений в организме и регистрируемые объективными методами исследования, принято называть биологическими маркерами (биомаркерами) алкоголизации. В клинической и лабораторной

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

практике биомаркерами чаще всего называют биохимические маркеры. Биомаркеры употребления этанола подразделяют на *прямые* и *непрямые* [8,9].

*Непрямыми* маркерами считаются различные ферменты, активность которых меняется в ответ на хроническую алкогольную интоксикацию.

Около 92-95% потребленного этанола подвергается биотрансформации путем окисления в печени. Небольшая доля (около 1,5 %) потребленного этанола подвергается неокислительному метаболизму путем конъюгации с глюкуроновой и серной кислотами. Неметабилизованный этанол выводится в незначительных количествах (около 7 %) почками, легкими и кожей [10].

В настоящее время в клинической и судебно-биохимической экспертной практике с диагностической целью широко используется определение активности ряда ферментов. Спектр биохимических тестов, показатели которых отражают изменения в организме, традиционно связанные с опасным употреблением этанола, включает в себя определение активности  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТП), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), среднего корпускулярного объема эритроцитов (СКОЭ) и углеводов (карбогидрат-) дефицитного трансферрина (УДТ) [10-13]. Однако полезность их использования в качестве инструментов диагностики злоупотребления алкоголем оказалась значительно ограниченной из-за получения различных результатов в разных популяциях, а также отчасти вследствие относительно низкой чувствительности и специфичности используемых лабораторных тестов (таблица 1).

**Таблица 1.** - Характеристика традиционно используемых непрямых биомаркеров употребления алкоголя [13]

Параметры	Биомаркеры				
	ГГТП	АСТ	АЛТ	СКОЭ	УДТ
Дозозависимый эффект алкоголя	80-200 г/сутки	$\geq 40$ г/сутки	$\geq 40$ г/сутки	$\geq 60$ г/сутки	$\geq 50$ г/сутки
Временное окно детекции	24 ч – 2 недели	3-7 сут	3-7 сут	> 4-6 недель	1-2 недели
Время снижения до нормального уровня	2-6 недель воздержания ( $T_{1/2}$ = 14-26 сут)	2-4 недели воздержания ( $T_{1/2}$ = 12-24 часа)	2-4 недели воздержания ( $T_{1/2}$ = 37-57 часов)	2-4 месяца воздержания	2-3 недели воздержания ( $T_{1/2}$ = 15 сут)



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Чувствительность для обнаружения чрезмерного употребления алкоголя	37-95%	25-60%	15-40%	40-50%	55-90%
Специфичность	18-93%	47-68%	50-57%	80-90%	92-97%

Традиционно используемые непрямые маркеры употребления алкоголя обладают рядом существенных ограничений, отражая подчас не столько собственно злоупотребление алкоголем, сколько нарушения функции печени и других органов, им обусловленные. Специфичность и чувствительность доступных в настоящее время непрямых биомаркеров употребления алкоголя колеблется в широких пределах – в зависимости от пола, возраста и значительного ряда факторов, изменяющих уровень основного обмена веществ, поэтому при изолированном применении эти тесты не отвечают критериям “идеального маркера”.

*Прямые* маркеры являются метаболитами этанола (ацетальдегид, ацетат) либо продуктами его взаимодействия с различными биологическими молекулами. Концентрация алкоголя в крови также рассматривается как прямой биомаркер его употребления. Прямые биомаркеры не подвержены изменениям при наличии заболеваний печени неалкогольной этиологии. Неокисленные метаболиты этанола, такие как парные соединения – этилглюкуронид (ЭГ), этилсульфат (ЭС), фосфатидилэтанол (ФЭ) и этерифицированные жирные кислоты, позволяют выявлять однократное потребление этанола в течение достаточно длительного времени, при этом окно обнаружения этих метаболитов в значительной степени является дозозависимым. Период их детекции в различных биологических жидкостях может варьировать от 8-12 часов до 28 суток [10]. Краткая характеристика прямых биомаркеров представлена в таблице 2.

**Таблица 2.** - Характеристика прямых биохимических маркеров, используемых в диагностике однократного и хронического употребления алкоголя [8, 14, 15]

Биомаркер / биологическая среда	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Характер употребления алкоголя
Этилглюкуронид / моча	76–89	93–99	Однократное употребление алкоголя в больших дозах
Этилглюкуронид / волосы	81–100	83–98	Хроническое злоупотребление алкоголем
Этилсульфат / моча	82	86	Хроническое злоупотребление алкоголем
Антитела против аддуктов ацетальдегида / плазма крови	65–73	88–94	Хроническое злоупотребление алкоголем
Эстерифицированные жирные кислоты / волосы	100	90	Недавнее употребление алкоголя
Фосфатидилэтанол / плазма крови	97–100	66–100	Хроническое злоупотребление алкоголем

В настоящее время наиболее перспективным прямым маркером алкоголя был признан ФЭ. ФЭ представляет собой аномальный фосфолипид клеточной мембраны, образующийся из фосфатидилхолина при участии фосфолипазы D только в присутствии этанола: в норме фосфатидилхолин превращается в фосфатидную кислоту [16]. По сравнению с другими маркерами он обеспечивает длительное окно детекции благодаря его аккумуляции в крови. В клинических исследованиях это соединение обнаруживалось в крови хронических алкоголиков в срок до 28 суток после употребления алкоголя [17].

В отличие от традиционных непрямых биомаркеров, используемых для диагностики хронического чрезмерного употребления алкоголя, концентрация ФЭ в крови не зависит от возраста, пола, употребления лекарственных препаратов, сопутствующих заболеваний. В отличие от ЭГ или ЭС, концентрация ФЭ не изменяется при случайном воздействии этанола, содержащегося, например, в жидкости для полоскания рта или антибактериальном средстве для очистки рук [17].

Оптимальным методом для анализа ФЭ в настоящее время является высокоэффективная жидкостная хроматография – тандемная масс-

спектрометрия в различных модификациях [9,18]. Таким образом, к настоящему времени определение уровня ФЭ, способного включаться в компоненты клеточных мембран, характерно изменяя их структурно-функциональные свойства, представляется наиболее точным и объективным методом диагностики злоупотребления алкоголем.

В качестве биомаркеров потребления этанола изучаются также β-гексозаминидаза, индекс сиаловые кислоты / аполипопротеин J в плазме, общее содержание сиаловых кислот в сыворотке крови, сальсолинол, долихол, циркулирующие цитокины [13]. Мощным инструментом в открытии и валидации сложных новых панелей биомаркеров злоупотребления алкоголем могут стать протеомные методы исследования.

Следует ожидать, что наибольшая информативность исследования может быть достигнута с использованием панели (комбинации) биомаркеров различной молекулярной природы, обладающих высокой диагностической чувствительностью, специфичностью и прогностической ценностью. Одновременное использование нескольких биохимических показателей, составляющих метаболический профиль хронической алкогольной интоксикации, будет являться надежным вспомогательным критерием для ее объективной диагностики.

### Список литературы

1. Мониторинг ситуации и общественного ущерба, связанных с употреблением алкогольных напитков: методическое руководство/ А.С. Медведев [и др.] // Минск: Ковчег, 2013 – 222с.
2. Клиническая патоморфология и танатогенез различных форм алкогольной интоксикации /А.Л.Павлов [ и др.] // Судебно-медицинская экспертиза.– 2018. — Т. 61, № 3. – С. 11-14.
3. Опыт российских регионов в выявлении проблем алкогольного спектра в первичном звене здравоохранения и взаимодействие с психиатрами-наркологами / Т.В. Клименко [и др.] // Профилактическая медицина. – 2019.– Т.22, № 4.–С.85-90.
4. Потребление алкоголя в Республике Беларусь: медико-социальные и социально-экономические аспекты /А.А.Кралько [и др.] // Минск:Колорград, 2018.– 180с.
5. Разводовский, Ю.Е. Вклад алкоголя в гендерные различия уровня общей смертности в России и Беларуси / Ю.Е.Разводовский, А.В.Немцов // Вопросы наркологии. – 2020.– Т.189, №6.– С. 60-69.
6. WHO Global status report on alcohol and health 2018 [Electronic resource]. – Geneva: World Health Organization. – 2018. – 472 p. – Mode of access:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf?ua=1> – Date of access: 29.11.2021.

7. Иванец, Н.Н. Наркология: национальное руководство / Н.Н.Иванец, М.А.Винникова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 704 с.
8. Разводовский, Ю.Е. Биохимические маркеры алкогольной зависимости / Ю.Е. Разводовский // Наркология. – 2020. – №1. – С. 85-92.
9. Фосфатидилэтанол как биомаркер злоупотребления алкоголем / А.Е. Петухов [и др.] // Наркология. – 2017. – № 2 – С. 42–47.
10. Maenhout, T.M., De Buyzere M.L., Delanghe J.R. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake/ Т.М.Маenhout, М.Л.Де Buyzere, J.R. Delanghe // Clinica Chimica Acta.– 2013.– Vol. 415.–P. 322-329.
11. Чернобровкина, Т.В. Энзимопатии при алкоголизме / Т.В. Чернобровкина // Киев. Здоровья, 1992. – 309 с.
12. Peterson, K. Biomarkers for alcohol use and abuse - a summary / K. Peterson // Alcohol Res Health. – 2004. – Vol. 28. – P. 30-37.
13. Biomarkers of alcohol misuse: recent advances and future prospects / I. Jastrzebska [et al.] // Gastroenterology Review. – 2016. – Vol.11, №2 – P.78-89.
14. Diagnosis and treatment of alcohol-associated liver diseases: 2019 practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases / D.W. Crabb [et al.] // Hepatology – 2020 –Vol.71, № 1– P.306-333.
15. Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers/ Н.Кharbouche [et. al.] //International journal of legal medicine.2012.– Vol. 126, №2.– P. 243-250.
16. Aradottir, S. Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood / S. Aradottir, K. Moller, C. Alling // Alcohol Alcohol. – 2004. – Vol. 39. – P. 8-13.
17. Phosphatidylethanol: normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other biomarkers and self-reports / F.M. Wurst [et al.] // Addict Biol. – 2010. – Vol. 15. – P. 88-95.
18. Determination of phosphatidylethanol 16: 0/18: 1 in whole blood by 96-well supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS /T.Berg [et al.] //Journal of clinical laboratory analysis.– 2019. – Vol. 33, № 1. – P.e22631.
19. Gorini, G. Proteomic approaches and identification of novel therapeutic targets for alcoholism / G. Gorini, RA. Harris, RD. Mayfield // Neuropsychopharmacology. – 2014. – Vol. 39. – P. 104-130.

**ВЛИЯНИЕ АСПАЛАТУСА ЛИНЕЙНОГО (*ASPALATHUS LINEARIS*) НА  
БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО  
ОБМЕНА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
ГИПЕРФАГИЕЙ**

**Губич О.И.**

*к. б. н., доцент, доцент кафедры биохимии  
учреждения образования “Белорусский государственный  
университет”, г. Минск, Беларусь  
Hubich\_Oksana@tut.by*

**Павловский С.В.**

*студент 3 курса учреждения образования “Белорусский  
государственный  
университет”, г. Минск, Беларусь  
pavlovsksv@gmail.com*

**Федькович Д.И.**

*студент 3 курса учреждения образования “Белорусский  
государственный  
университет”, г. Минск, Беларусь  
daryafedkovich16@yandex.by*

*Данная работа посвящена изучению влияния отвара аспалатуса линейного (*Aspalathus linearis*) на показатели углеводного и липидного обмена в экспериментальной модели гиперфагии. Установлено, что отвар аспалатуса оказывает стабилизирующий эффект на углеводный и липидный обмен крыс при индуцированной гиперфагии, превосходящий таковой аптечного фитосбора для снижения веса “Тайфун”, что может быть обусловлено наличием в составе данного растения дитерпенов и гликозидов, в том числе аспалатина, способствующих повышению проницаемости клеточных мембран для глюкозы.*

**Ключевые слова:** гиперфагия; ожирение; аспалатус линейный; углеводный обмен; липидный обмен

**THE EFFECT OF *ASPALATHUS LINEARIS* ON BIOCHEMICAL  
BLOOD PARAMETERS OF CARBOHYDRATE AND LIPID METABOLISM  
IN RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERPHAGIA**

**Hubich A.I.**

*Candidate of Biology, Associate Professor of the Department of Biochemistry  
of the Education Institution “Belarusian State University”, Minsk, Belarus  
Hubich\_Oksana@tut.by*

**Pavlovskiy S.V.**

*3<sup>th</sup> year student of the Education Institution  
“Belarusian State University”, Minsk, Belarus  
pavlovsksv@gmail.com*

**Fedkovich D.I.**

*3<sup>th</sup> year student of the Education Institution  
“Belarusian State University”, Minsk, Belarus  
daryafedkovich16@yandex.by*

*This work is devoted to the study of *Aspalathus linearis* decoction effect on the indicators of carbohydrate and lipid metabolism in an experimental model of hyperphagia. It was found that a decoction tested has a stabilizing effect on the carbohydrate and lipid metabolism of rats with induced hyperphagia, comparable to the pharmacy Phyto preparation for weight loss “Typhoon”, which may be due to the presence of diterpenes and glycosides, including aspalatin, in the composition of this plant, contributing to increased permeability of cell membranes for glucose.*

**Key words:** *hyperphagia; obesity; *Aspalathus linearis*; carbohydrate metabolism; lipid metabolism*

В последние десятилетия в мире наблюдается увеличение числа пациентов, страдающих ожирением, возникновение которого можно объяснить повышением употребления высококалорийных и богатых жирами продуктов [1]. Одной из причин избыточного употребления калорийной пищи служит гиперфагия, сопровождающаяся серьезными перестройками нейротрансмиттерной системы головного мозга [2]. Связь гиперфагии с первичным алиментарным ожирением и риск развития сопутствующих заболеваний требуют ее детального изучения и изыскания безопасных и эффективных средств терапии. Одним из перспективных растительных средств представляется аспалатус линейный, отвары которого демонстрировали цитопротекторное, сахароснижающее, антиатерогенное действие, а также способность предотвращать в эксперименте стеатоз печени, индуцированный диетой [3, 4].

Таким образом, целью данной работы явилась оценка способности отвара аспалатуса линейного стабилизировать параметры углеводного и липидного обмена лабораторных крыс с экспериментальной гиперфагией.

Работа выполнена на белых крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г. Все эксперименты выполняли в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях, составленным на основании рекомендаций и требований «Всемирного общества защиты животных» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Во всех экспериментальных сериях использовали коммерческий препарат листьев аспалатуса линейного (ООО “TeaShop”, Республика Беларусь), отвар которого готовили из расчета 50 мг растительного сырья/200 мл воды и предоставляли для питья соответствующим группам экспериментальных животных вместо питьевой воды.

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

Для создания экспериментальной модели гиперфагии использовалась «ресторанная диета», рекомендованная Институтом фармации (г. Санкт-Петербург, РФ). Состав диеты включал на 1 крысу/день: белый хлеб – 5 г, шоколадное печенье – 5 г, картофельные чипсы – 5 г, сырны крекеры – 5 г. Вышеперечисленные продукты в измельченном виде были предоставлены животным как постоянный выбор. Продолжительность рациона - 7 дней. Среднее энергопотребление у крыс, находящихся на данной диете, составляло 220 ккал/сутки. Содержание белков на 1 крысу составляло 7,2 г, жиров – 10,2 г, углеводов – 25,4 г.

В качестве препарата сравнения нами использовался аптечный растительный фиточай, рекомендуемый для снижения массы тела, “Тайфун” (ООО “ФитоБиотехнологии”, Украина) следующего состава: цветки мальвы суданской (30%), александрийского листа (40%), падуба парагвайского (20%), листья лимонграсса (5%), плоды шиповника (5%). Продолжительность приема растительных отваров в нашем эксперименте составляла 7 суток.

По истечении указанного времени животных выводили из опыта путем декапитации и проводили измерение величин основных биохимических маркеров углеводного (активность  $\alpha$ -амилазы, концентрация глюкозы) и липидного обмена (содержание триацилглицеринов и общего холестерина) в сыворотке крови. Определение активности  $\alpha$ -амилазы проводили по методу Каравея [5], измерение прочих параметров осуществлялось с помощью коммерческих наборов реагентов. Для статистических расчетов использовали лицензионный пакет программ Stadia 6.0.

В соответствии с полученными результатами, содержание животных на «ресторанной диете» в течение 7 суток привело к заметным изменениям важнейших биохимических маркеров углеводного и липидного обмена. Так, концентрация глюкозы в крови животных возросла на 27,3%, активность  $\alpha$ -амилазы – на 57,9%, триацилглицеринов – на 390%, наблюдалась тенденция к увеличению уровня холестерина.

Несбалансированное питание при ежедневном употреблении отвара аспалатуса в течение 7 суток (среднее потребление – 12-15 мл на крысу) характеризовалось снижением нежелательного изменения анализируемых биохимических маркеров. Так, снижение содержания триацилглицеринов в данной серии эксперимента оказалось ниже показателей крыс, употреблявших высококалорийную пищу, на 216%, уменьшение активности  $\alpha$ -амилазы происходило до уровня, характерного для интактных животных, концентрации глюкозы – ниже этого уровня.

Необходимо отметить, что действие изучаемого отвара на содержание триацилглицеринов и активность  $\alpha$ -амилазы достоверно превосходило эффект использованного в работе препарата сравнения и не проявлялось при употреблении препарата аспалантуса интактными животными, то есть реализовалось исключительно на функционально измененном фоне, что

является характерной чертой фитопрепаратов фармакологической группы “адаптогены” [6].

Таким образом, отвар аспалатуса оказывает стабилизирующий эффект на углеводный и липидный обмен крыс при индуцированной гиперфагии, превосходящий таковой аптечного фитосбора “Тайфун”. Указанные эффекты могут быть обусловлены наличием в составе данного растения дитерпенов и гликозидов, способствующих повышению проницаемости клеточных мембран для глюкозы, а также весьма специфического гликозида дигидрохалькона – аспалатина, обладающего уникальными сахароснижающими и антиоксидантными свойствами [7].

### Список литературы

1. Красильникова, Е.И. Особенности строения и функционирования жировой ткани в норме и при развитии ожирения / Е.И. Красильникова, А.В. Симоненкова, Н.Л. Карабицкая, Е.А. Шапкина // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2012. – Том. 19, № 3. – с. 99 – 106.
2. Berthoud, H. R. Food reward, hyperphagia and obesity / H. R. Berthoud, N. R. Lenard, A.C. Shin // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2011. – Vol. 300, № 6. – P. 1266 – 1277.
3. Van Wyk, B. E. The potential of South African plants in the development of new medical products / B. E. Van Wyk // South African J. Botany. – 2011. – Vol. 77. – P. 812 – 828.
4. Joubert, E. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical / E. Joubert, D. de Beer // South African J. Botany. – 2011. – Vol. 77. – P. 869 – 886.
5. Камышников, В.С. Справочник по клинической химии / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – 366 с.
6. Яременко, К. В. Учение Н. В. Лазарева О СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины / К. В. Яременко // Психофармакология и биологическая наркология. – 2005. – Т. 5, № 4. – с. 1089-1092.
7. Erlwanger, K.H. Aspalathin a unique phytochemical from the South African rooibos plant (*Aspalathus linearis*): a mini review / K.H. Erlwanger, K.G. Ibrahim // J. Afr. Ass. Physiol. Sci. – 2017. – Vol. 5, №1. – P. 1 – 6.



**ИЗУЧЕНИЕ АДАПТОГЕННЫХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ  
ГИНОСТЕММЫ ПЯТИЛИСТНОЙ (*GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM*) И  
АСПАЛАТУСА ЛИНЕЙНОГО (*ASPALATHUS LINEARIS*) НА  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИНТЕНСИВНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ  
НАГРУЗКИ**

**Губич О.И.**

*к. б. н., доцент, доцент кафедры биохимии  
учреждения образования “Белорусский государственный  
университет”, г. Минск, Беларусь  
Hubich\_Oksana@tut.by*

**Игнацкая А.Ю.**

*студент 4 курса учреждения образования “Белорусский  
государственный  
университет”, г. Минск, Беларусь  
nastyia.ignatskaya@mail.ru*

**Станкевич И.В.**

*студент 4 курса учреждения образования “Белорусский  
государственный  
университет”, г. Минск, Беларусь  
irinastankevich0211@gmail.com*

*Данная работа посвящена изучению влияния препаратов гиностеммы пятилистной (*Gynostemma pentaphyllum*) и аспалатуса линейного (*Aspalathus linearis*) на показатели углеводного обмена в условиях повышенной физической нагрузки, а также анализу их антиоксидантной активности в указанной модели. Установлен адаптогенный эффект исследованных препаратов, сопоставимый с действием энергетического напитка “Coca-Cola Energy”. Продемонстрировано антиоксидантное действие гиностеммы и аспалатуса, обусловленное наличием в их составе биофлавоноидов и ненасыщенных жирных кислот.*

**Ключевые слова:** *адаптогены; антиоксиданты; гиностемма пятилистная; аспалатус линейный; физическая нагрузка; энергетики*

**THE INVESTIGATION OF ADAPTOGENIC AND ANTIOXIDANT  
PROPERTIES OF GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM AND ASPALATHUS  
LINEAR ON AN EXPERIMENTAL MODEL OF INTENSE PHYSICAL  
ACTIVITY**

**Hubich A.I.**

*Candidate of Biology, Associate Professor of the Department of Biochemistry  
of the Education Institution “Belarusian State University”, Minsk, Belarus  
Hubich\_Oksana@tut.by*

**Ihnatskaya N.Y.**

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*4<sup>th</sup> year student of the Education Institution  
“Belarusian State University”, Minsk, Belarus  
nastyia.ignatskaya@mail.ru  
Stankevich I.V.*

*4<sup>th</sup> year student of the Education Institution  
“Belarusian State University”, Minsk, Belarus  
nastyia.ignatskaya@mail.ru  
irinastankevich0211@gmail.com*

*This work is devoted to the study of *Gynostemma pentaphyllum* and *Aspalathus linearis* preparations' effect on carbohydrate metabolism in conditions of increased physical activity, as well as the analysis of their antioxidant activity in this model.*

*The adaptogenic effect of the plants studied has been established, comparable to that of the energetic drink “Coca-Cola Energy”. The antioxidant effect of *Gynostemma* and *Aspalathus* has been demonstrated due to the presence of bioflavonoids and unsaturated fatty acids in their composition.*

**Key words:** *adaptogens; antioxidants; *Gynostemma pentaphyllum*; *Aspalathus linearis*; physical activity; energetic drinks*

В современной фармакотерапевтической практике не менее 25% средств приходится на препараты растительного происхождения, причем, несмотря на постоянную работу по химическому синтезу новых лекарственных субстанций, тенденция использования натуральных препаратов остается четко выраженной [1]. Вместе с тем, широкое распространение и длительная история применения фитопрепаратов в народной медицине не может служить гарантией их безопасности и эффективности. В связи с растущей в нашей стране популярностью отваров гиностеммы пятилистной (часто именуемой южным женьшенем) и аспалатуса линейного (более известного как “ройбуш” или “ройбос”) в качестве общеукрепляющих и тонизирующих средств, перед нами была поставлена задача экспериментально определить наличие у них адаптогенных и антиоксидантных свойств.

Работа выполнена на беспородных белых мышках-самцах массой 40-50 г. Все эксперименты выполняли в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях, составленными на основании рекомендаций и требований «Всемирного общества защиты животных» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Во всех экспериментальных сериях использовали коммерческие препараты листьев гиностеммы пятилистной (*Gynostemma pentaphyllum*) и аспалатуса линейного (*Aspalathus linearis*) (ООО “TeaShop”, Беларусь), отвар которых готовили из расчета 50 мг растительного сырья/200 мл воды и вводили в экспериментально подобранной, максимально эффективной дозе 2 мл/кг

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

однократно перорально с помощью пипетки за 15 минут перед проведением последующих экспериментальных процедур.

Изучение адаптогенных свойств в условиях физической нагрузки предполагало 10-иминутное плавание животных в воде при 24,5 °С. В качестве препарата сравнения использовали энергетический напиток «Coca-Cola Energy» (ООО «Coca-Cola Energy», Республика Беларусь), который вводили животным по аналогичной схеме.

По истечении указанного времени животных выводили из эксперимента путем декапитации и измеряли величины биохимических маркеров углеводного обмена (концентрация глюкозы и пирувата в цельной крови) и показателей перекисного окисления липидов (уровень ТБК-активных продуктов в печени). Определение содержания пирувата проводили методом Умбрайта [2], глюкозы – глюкозооксидазным методом с помощью коммерческого набора реагентов, концентрации ТБК-активных продуктов – спектрофотометрическим методом [3]. Для статистических расчетов использовали лицензионный пакет программ Stadia 6.0.

Установлено, что физическая нагрузка приводила к наступлению состояния утомления, проявляющегося в неспособности животных совершать дальнейшие активные плавательные движения, что являлось проявлением почти полного исчерпания концентрации глюкозы в крови (26,1% к контролю) и снижением содержания пирувата (-13,2 %), служащего предшественником для образования в мышцах молочной кислоты. Фиксировалось нарастание уровня ТБК-активных продуктов (+79% к контролю), что отражает усиление в стрессовых для подопытных животных условий перекисных процессов.

При аналогичной физической нагрузке, но после 1-кратного приема животными отваров гиностеммы и аспалантуса снижение уровня глюкозы в крови было соответственно в 2,0 и 3,4 раза менее выраженным. При этом мыши по-прежнему находились в состоянии активного плавания, попыток использования ими энергосберегающих приемов поведения, как и попыток выпрыгнуть из воды не наблюдалось.

Необходимо отметить, что пероральное введение исследуемого отвара интактным мышам в отсутствие физической нагрузки не сопровождалось достоверными изменениями анализируемых показателей, что соответствует первому требованию, предъявляемому к препаратам адаптогенного действия, указывающему на возможность действия адаптогена только на соответствующем фоне, с минимальными сдвигами в нормальных условиях или без них [4].

Примечательно, что наблюдаемый эффект реализовался уже после первого приема отвара, что характерно для немногих растительных адаптогенов (например, для железницы крымской, рододендрона Адамса) [5]. Интересно, что оба растительных препарата демонстрировали и антиоксидантный эффект: их введение обеспечивало поддержание концентрации ТБК-активных продуктов на

уровне, статистически неотличимом от такового, характерного для интактных животных.

Полученные данные могут быть обусловлены высоким содержанием в составе аспалантуса линейного фенольных соединений: уникальных дигидрохальконов (аспалатин, нотофагин), флавонов, флавонолов, аскорбиновой кислоты и ненасыщенных жирных кислот, способных проявлять антиоксидантный эффект [6, 7]. Что касается гиностеммы, то ее адаптогенный эффект может быть вызван сапонинами (гипенозидами), 180 представителей которых в разные годы были установлены в ее составе, в то время как антиоксидантный эффект определяется 8 идентифицированными флавоноидами, в том числе кверцетином и рутином [8]. Определенную роль играет и наличие в листьях обоих тестируемых растений простых углеводов, облегчающих, в отсутствие кофеина, физическую активность.

Необходимо отметить, что наблюдаемые при использовании исследуемых отваров антиоксидантные эффекты превосходили, а адаптогенные лишь незначительно (в среднем – на 20%) уступали действию препарата сравнения – витаминизированного кофеин- и сахарозо-содержащего энергетика “Coca-Cola Energy” в аналогичной серии эксперимента.

Таким образом, в условиях повышенной физической нагрузки отвары гиностеммы пятилистной и аспалантуса линейного проявляют антиоксидантный эффект и обеспечивают адаптацию путем более экономного расходования энергетического субстрата.

### Список литературы

1. Булаев, В.М., Ших, Е.В., Сычев, Д.А. Современная фитотерапия / В.М. Булаев, Е.В. Ших, Д.А. Сычев. – М.: Медпресс-информ, 2011. – 148 с.
2. Камышников, В.С. Справочник по клинической химии / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – 366 с.
3. Северин, С.Е., Соловьев, Г.А. Практикум по биохимии / С.Е. Северин, Г.А. Соловьев. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1989. – 333 с.
4. Яременко, К. В. Учение Н. В. Лазарева О СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины / К. В. Яременко // Психофармакология и биологическая наркология. – 2005. – Т. 5, № 4. – с. 1089-1092.
5. Губич, О.И. Исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса (*Rhododendron Adamsii Rehder.*) на экспериментальных моделях *in vivo* / О.И. Губич, К.В. Пучкова, Н.А. Залесская // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2018. – № 1. – с. 60 – 68.
6. Van Wyk, B. E. The potential of South African plants in the development of new medical products / B. E. Van Wyk // South African J. Botany. – 2011. – Vol. 77. – P. 812 – 828.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

7. Joubert, E. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical / E. Joubert, D. de Beer // South African J. Botany. – 2011. – Vol. 77. – P. 869 – 886.

8. Li, Y. Anti – cancer effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (Jiaogulan) / Y. Li, W. Lin, J. Huang // Chin. Med. – 2016. – Vol. 11. – P. 43-59.

## УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВАЯ КИСЛОТА И РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ

**Данченко Е.О.**

д.м.н.,

*профессор кафедры химии и естественнонаучного образования  
учреждения образования «Витебский государственный университет имени*

*П.М. Машерова»*

*elena.danch@gmail.com*

*Двадцатикратное интрагастральное введение УДХК крысам приводит к незначительным повреждениям печени, сопровождаемым активацией митотического и амитотического деления клеток. Сделано предположение, что УДХК в дозе 200 мг/кг способствует стимуляции физиологической регенерации печени. В поздние сроки репаративной регенерации печени (10-20 сутки) предварительное введение УДХК способствует более быстрому восстановлению морфологических и биохимических показателей печени и крови.*

**Ключевые слова:** *регенерация печени; крысы; урсодезоксихолевая кислота*

## URSODEOXYCHOLIC ACID AND LIVER REGENERATION

**Danchenko E.O.**

*Doctor of Medical Sciences, professor of the Department of Chemistry and  
Natural Science Education of the educational institution "Vitebsk State University  
named after P.M. Masherov"*

*elena.danch@gmail.com*

*Twenty-fold intragastric administration of UDCA to rats leads to minor liver damage, accompanied by activation of mitotic and amitotic cell division. It has been suggested that UDCA at a dose of 200 mg / kg stimulates physiological liver regeneration. In the late periods of reparative liver regeneration (10-20 days), preliminary administration of UDCA promotes a more rapid restoration of morphological and biochemical parameters of the liver and blood.*

**Key words:** *liver regeneration; rats; ursodeoxycholic acid*

Печень – это единственный висцеральный орган, который может восстанавливаться после хирургического удаления его части или химического повреждения. Процесс регенерации у млекопитающих представляет собой компенсаторный рост (деление клеток) для восстановления массы органа. После частичной гепатэктомии процесс регенерации проходит в три этапа. Первая фаза — это фаза прайминга, во время которой активируются сотни генов, которые обеспечивают входение гепатоцитов в клеточный цикл. Вторая фаза связана с активацией различных факторов роста (EGFR, c-Met и др.). Сразу после гепатэктомии происходит активация множества сигнальных путей, запускающих процесс регенерации. Сначала - повышение активности

урокиназы, активирующей ремоделирование матрикса. Это вызывает высвобождение HGF (фактора роста печени). Существует связь между  $\beta$ -катенином (внутри гепатоцита) и факторами роста EGFR и c-Met (вне гепатоцита). Белки Notch-1 и  $\beta$ -катенин увеличивают регенеративный ответ, а HGF и EGFR действуют как прямые митогены для пролиферации гепатоцитов. После завершения процесса регенерации TGF- $\beta$  останавливает пролиферацию, вызывая апоптоз [1,2]. При поражениях печени многие десятилетия применяется урсодезоксихолевая кислота (УДХК) с высокой эффективностью (степень доказательности А—В) [3].

Целью работы было выявление стимулирующего эффекта УДХК на регенераторные процессы в печени, сопряженного с первичным микроповреждающим действием препарата, стимулирующим физиологическую регенерацию гепатоцитов.

**Материал и методы.** Опыты поставлены на 300 беспородных белых крысах-самцах средней массой 160-180 г. Животным интрагастрально утром вводили раствор метилцеллюлозы (МЦЛ, контроль) или взвесь УДХК в МЦЛ (200 мг/кг массы тела) в течение 20 дней. Через 24 ч после заключительного введения препаратов у части животных исследовали ткань печени и сыворотку крови. Оставшихся животных подвергали операции 70% частичной гепатэктомии (ЧГЭ). Ткань печени и сыворотку крови исследовали через 24 ч, 4, 10 и 20 суток после ЧГЭ. В гистологических срезах печени, окрашенных гематоксилин-эозином, оценивали гистологическую картину и анализировали клеточный состав органа. При электронномикроскопических исследованиях оценивали ультраструктурные изменения в гепатоцитах при регенерации печени. Биохимические исследования включали оценку содержания и биосинтеза нуклеиновых кислот, состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы, а также рутинные биохимические показатели сыворотки крови для оценки функционального состояния печени. Полученный цифровой материал подвергнут статистической обработке параметрическими методами по Стьюденту-Фишеру.

**результаты и их обсуждение.** Двадцатикратное интрагастральное введение УДХК вызвало слабовыраженные признаки воспалительной реакции. Но репаративная регенерация печени у крыс, предварительно получавших УДХК, протекала на фоне более слабого воспаления по сравнению с контролем. Введение УДХК вызвало появление единичных клеток с вакуольной дистрофией, лизисом и пикнозом ядер, а также - единичных микрокрывов. В то же время морфологические изменения в регенерирующих гепатоцитах были выражены в меньшей степени у животных, которым предварительно вводили УДХК. По количеству митозов и двуядерных клеток в ткани печени митогенный эффект УДХК был достоверно выше, чем МЦЛ. В митотическую фазу репаративной регенерации печени (1-4 сутки после ЧГЭ) у крыс, предварительно получавших УДХК,

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

митотическая активность гепатоцитов была достоверно выше, чем у крыс, получавших МЦЛ. В гипертрофическую фазу репаративной регенерации печени (6-10 сутки после ЧГЭ) у крыс, которым вводили УДХК, митотический индекс был достоверно ниже, чем у контрольных животных, что свидетельствует о более интенсивном протекании регенерационных процессов.

Полученные методом светооптической морфометрии данные можно интерпретировать так, что предварительное двадцатикратное введение УДХК оказывало микроповреждающее действие. С помощью электронной микроскопии это предположение удалось подтвердить. При сравнении ультраструктуры гепатоцитов интактных, контрольных (введение МЦЛ) и подопытных (введение УДХК) крыс не выявлено изменений ядер и ядрышек; митохондрии многочисленны, гранулярная эндоплазматическая сеть хорошо развита. Однако количество крист в митохондриях, число свободных рибосом в гепатоцитах крыс, получавших УДХК, было сниженным, а количество связанных рибосом, гантелеобразных (делящихся) и мелких (новообразованных) митохондрий было увеличено. У подопытных животных снижено количество пероксисом и выявлены признаки микровакуолизации цитоплазмы. Это доказывает, что внутриклеточное микроальтерационное действие УДХК стимулировало процессы физиологической регенерации печени, которые после удаления 70% ткани органа привели к более выраженной репаративной регенерацией печени.

Для подтверждения морфологических данных была оценена динамика некоторых биохимических процессов при регенерации печени у крыс, предварительно получавших 20 интрагастральных введений УДХК.

1. Нуклеиновые кислоты. Двадцатикратное введение УДХК не оказало влияния на содержание нуклеиновых кислот в печени интактных крыс. Однако, через 24 ч после 70% ЧГЭ содержание ДНК и РНК оказалось ниже в регенерирующей печени подопытных крыс (введение УДХК) по сравнению с контролем (введение МЦЛ). Через 96 ч у подопытных крыс было снижено содержание ДНК в ядрах гепатоцитов. Спустя 10 суток уровни РНК и ДНК ядер гепатоцитов подопытных крыс превысили контрольные значения и через 20 суток нормализовались. Включение <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК гепатоцитов подопытных крыс через 24 ч после 70% ЧГЭ было ниже, чем у контрольных животных. Следовательно, выявлены признаки цитотоксического эффекта УДХК в митотическую фазу репаративной регенерации печени, сопряженного с ускорением восстановления содержания нуклеиновых кислот в пролиферативную фазу регенерации органа.

2. Липиды печени. Препарат УДХК не оказал существенного влияния на содержание триглицеридов и холестерина в печени интактных крыс. Через 96 ч после операции ЧГЭ в печени подопытных крыс оказалось больше триглицеридов и меньше холестерина (признаки функционального



повреждения печени). Однако, спустя 10 суток у этих крыс содержание липидов в печени полностью нормализовалось, хотя у контрольных животных уровень холестерина оставался сниженным.

3. Липидтранспортная система крови. Препарат УДХК при введении интактным крысам оказал слабый гепатотоксический эффект, проявившийся в уменьшении в сыворотке крови концентрации холестерина ЛПОНП и увеличении - холестерина ЛПНП. Через 96 ч после ЧГЭ у подопытных крыс обнаружено по сравнению с контролем более высокое содержание общего холестерина за счет фракции холестерина ЛПНП. Спустя 10 суток, у подопытных крыс основные параметры транспорта липидов полностью нормализовались, тогда как у контрольных животных оставалось сниженным содержание общего холестерина за счет холестерина ЛПВП и ЛПНП (признак протекания интенсивных восстановительных процессов).

4. Перекисное окисление липидов. У интактных крыс препарат УДХК не оказал влияния на содержание малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК) и антиокислительную активность сыворотки (АОА) крови, но вызвал накопление МДА в ткани печени. При репаративной регенерации печени крыс контрольной группы обнаружено увеличение содержания МДА и ДК в сыворотке крови и печени, а величина АОА была снижена. Предварительное введение УДХК до операции препятствовало стимуляции перекисного окисления и снижению АОА через 4 и 10 суток после 70% ЧГЭ.

5. Рутинные биохимические показатели метаболизма в сыворотке крови. Двадцатикратное введение УДХК интактным крысам не оказало влияния на содержание глюкозы, мочевины, активности  $\gamma$ -глутаминилтрансферазы и щелочной фосфатазы. По сравнению с контролем через 96 ч после ЧГЭ найдено повышенное содержание глюкозы и мочевины у крыс, получавших УДХК. Спустя 10 суток у подопытных крыс достигнута более быстрая нормализация уровня глюкозы и активности ферментов.

**Заключение.** Двадцатикратное интрагастральное введение УДХК интактным крысам приводит к незначительным морфологически регистрируемым повреждениям печени, сопровождаемым активацией митотического и амитотического деления клеток. Сделано предположение, что УДХК в дозе 200 мг/кг способствует стимуляции физиологической регенерации печени. Предварительное введение УДХК ингибирует включение <sup>3</sup>Н-тимидина в ДНК гепатоцитов в митотическую фазу регенерации печени, что следует рассматривать как проявление скрытого цитотоксического эффекта препарата. В поздние сроки репаративной регенерации печени (10-20 сутки) предварительное введение УДХК способствует более быстрому восстановлению морфологических и биохимических показателей печени и крови.

## Список литературы

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

1. Michalopoulos, G.K. Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis / G.K. Michalopoulos // *Comprehensive Physiology*. – 2013. - Vol. 3 (1). - P. 485–513.
2. Fausto, N. Liver regeneration / N. Fausto, J.S. Campbell, K.J. Riehle // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 43 (2 Suppl 1). – P. S45-S53.
3. Uzun, M.A. The effect of ursodeoxycholic acid on liver regeneration after partial hepatectomy in rats with non-alcoholic fatty liver disease / M.A. Uzun // *Hepatol. Res.* – 2009. – Vol. 39 (8). – P. 814-821.

**ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГЕМОКОАГУЛЯЦИИ ПРИ  
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ СО  
СПОРТИВНЫМ АНАМНЕЗОМ**

*Девина Е. А., Ванда А.С., Малькевич Л.А.*

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»,  
Беларусь, Минск  
medreab@bsmu.by*

*В данной статье проанализированы показатели гемостоагуляции и содержание С-реактивного белка у пациентов с COVID-19 в динамике. Установлено, что в крови у пациентов с коронавирусной инфекцией увеличена концентрация фибриногена, D-димеров, С-реактивного белка по сравнению с клинически здоровыми людьми. Представлены сравнения этих показателей у пациентов со спортивным анамнезом и без него. Выявлены особенности течения коронавирусной инфекции у людей с высоким уровнем адаптации к физическим нагрузкам.*

**Ключевые слова:** COVID-19; фибриноген; D-димеры; спортивный анамнез

**INDICATORS OF THE HEMOCOAGULATION SYSTEM IN  
CORONAVIRAL INFECTION IN PATIENTS WITH SPORTS  
ANAMNESIS**

*Devina E.A., Banda E.S., Malkevich L.A.*

*Belarusian State Medical University  
Minsk, Belarus  
medreab@bsmu.by*

*This article analyzes the indicators of hemocoagulation and the content of C - reactive protein in patients with COVID-19 over time. It was found that in patients with coronavirus infection in the blood, the concentration of fibrinogen, D-dimers, C - reactive protein is increased compared to clinically healthy people. A comparison of these indicators was carried out in patients with and without a sports history. The features of the course of coronavirus infection in people with a high level of adaptation to physical activity have been revealed.*

**Key words:** COVID-19; fibrinogen; D-dimers; sports history

COVID-19 - острое респираторное заболевание, вызванное SARS-CoV-2, затронуло более 260 миллионов человек и стало причиной более 5,2 миллионов смертей. Течение коронавирусной инфекции может протекать бессимптомно, в легкой форме или вызывать серьезные осложнения, такие как острый респираторный дистресс-синдром, ДВС-синдром, полиорганную недостаточность [1]. Одной из характерных проявлений COVID-19 являются нарушения в системе гемостоагуляции, приводящие к тромбозу [2].

Фибриноген - белок плазмы крови, известный как фактор свертывания крови I, участвующий сначала в образовании геля, а затем нерастворимого фибрина на заключительной фазе процесса коагуляции. При активации системы свертывания крови фибриноген подвергается ферментативному расщеплению тромбином с образованием нитей фибрина, которые формируют сеть волокон, образуя тромб. В настоящее время доказательства роли фибриногена в случаях коронавирусной инфекции отсутствуют. Полагаем, что изучение причин и факторов, связанных с нарушением свертывания крови при коронавирусной инфекции весьма актуально. Особенно если это касается различий в течении COVID-19 у людей, имеющих разный уровень тренированности и адаптационных возможностей. Это в дальнейшем требует детального изучения и дифференцированного подбора средств медицинской реабилитации.

Целью нашего исследования явилась оценка состояния системы гемокоагуляции при коронавирусной инфекции. В связи с этим, была поставлена задача выявить отличия в показателях свертывания крови у пациентов с высоким уровнем адаптации к физическим нагрузкам.

**Результаты и их обсуждение.** Проведен анализ результатов клинических обследований, данных наблюдений и анамнестических сведений 91 пациента с коронавирусной инфекцией, находившихся на лечении в инфекционных отделениях (1-го кардиологического, инфарктного и реабилитационного кардиологического) УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н.Е. Савченко». Все пациенты были распределены на 2 группы: одну группу составили пациенты со спортивным анамнезом (возраст: 53 года: 40–56 лет), закончившие спортивные тренировки (квалификация 1 взрослый разряд, КМС, МС), но продолжавшие активные занятия физическими упражнениями; вторую группу составили пациенты без спортивного анамнеза (возраст: 61 лет: 57–68 лет).

Для оценки состояния свертывающей системы крови в обеих группах анализировали динамические изменения содержания фибриногена, D-димеров, протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и С-реактивного белка (СРБ), как индикатора воспалительного процесса. Измерения проводились на анализаторе ACL TOP 300. В качестве контроля использовали референтные значения для каждой возрастной группы. Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica10.0. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи U-теста Манна – Уитни для непараметрических выборок. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ .

В клинической картине у пациентов, которые имели спортивный анамнез отмечено отсутствие хронической патологии, длительный период

лихорадки более 7 дней, высокая степень поражения легочной паренхимы (50%), ассоциированной с covid-инфекцией (КТ II, III). Высокий уровень физической активности до болезни может являться, косвенно, свидетельством высокого функционального состояния кардио-респираторной системы [3].

Мы обнаружили, что у пациентов с COVID-19 уровень фибриногена и продукта его деградации — D-димера, повышается в два раза по сравнению со здоровым контролем. Содержание фибриногена в крови у лиц без спортивного анамнеза составило 5,87(4,9-6,8г/л); D-димеры – 352,6(155,0-425,0 нг/мл),  $p < 0,05$ . У пациентов со спортивным анамнезом эти изменения были более выражены: содержание фибриногена в крови было превышено в 3 раза относительно нормы и составило 6,72 (5,7-8,1 г/л); D-димеров в 2,5 раза превышало референтную величину. Следует отметить, что у пациентов со спортивным анамнезом содержание D-димера было выше на 36% чем у пациентов II группы.

Ранее, в исследованиях Loupos D., Tsalis G. было описано, что у спортсменов при физических нагрузках и в период соревнований наблюдается повышение уровня фибриногена и тканевого активатора пламиногена (t-PA) в плазме [4].

Фибриноген – фактор свертывания крови I, вырабатываемый в печени. Благодаря действию коагуляционного каскада и активных ферментов плазмы он превращается в фибрин, который формирует тромб. С другой стороны, при тромбообразовании запускаются механизмы активации плазминовой системы, приводящие к разрушению фибриновых тромбов. В процессе фибринолиза под действием пламина фибрин начинает разрушаться, и образуются D-димеры, которые представляет собой растворимые продукты деградации фибрина. Таким образом, повышенный уровень D-димеров в крови свидетельствует о протекающих процессах фибринолиза, а также позволяет судить об активности тромбообразования.

Повышение содержания фибриногена в крови и состояние гиперкоагуляции, приводящее к коагулопатиям во время инфекции COVID-19 можно объяснить:

1) прямым влиянием вируса на пути свертывания. Так на модели *in vitro*, содержащей мононуклеарные клетки периферической крови было исследовано влияние SARS-CoV-1 на каскад свертывания крови [5]. В мононуклеарных клетках, инфицированных SARS-CoV-1, высоко экспрессируются некоторые белки, включая фибриноген, факторы II, III и X [5]. Кроме того, ген тромбосансинтазы и Toll-подобный рецептор 9 (TLR9) также были идентифицированы как мишени для SARS-CoV-1. Рецептор TLR9 экспрессируется в тромбоцитах и при связывании лиганда способствует активации, дегрануляции и агрегации тромбоцитов через пути киназы 1 и протеинкиназы B, ассоциированных с рецептором интерлейкина-1;

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

2) синтез фибриногена в печени может быть активирован интерлейкином-1 и интерлейкином-6, таким образом, содержание фибриногена увеличивается в ответ на воспаление и повреждение тканей. Как известно, при коронавирусной инфекции наблюдается повышение провоспалительных цитокинов (интерлейкин-6, интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли- $\alpha$ ), приводящие к повреждению микрососудов и дисфункции эндотелия в легких, вызывая нарушения гемостаза и образование тромбов в микроциркуляторном русле.

Есть сведения о том, что повышение уровня фибриногена и D-димеров в крови в значительной степени связаны с тяжестью заболевания COVID-19 [6].

У пациентов с COVID-19 нами не было выявлено статистически значимых различий при сравнении таких лабораторных показателей как протромбиновое время и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). В обеих исследуемых группах эти показатели, характеризующие как внешний, так и внутренний путь свёртывания крови, не выходят за границы референтных значений. У пациентов со спортивным анамнезом протромбиновое время – 12,6 сек (12,0-13,1), АЧТВ – 32,9 сек (30,0 – 36,1), у пациентов II группы – 12,4 сек (11,7-14,0) и 32,7 сек (29,2- 36,1), соответственно. Известно, что продолжительность АЧТВ зависит от уровня высокомолекулярного кининогена, прекалликреина и факторов свертывания XII, XI, VIII и менее чувствительно при изменениях уровней факторов X, V, протромбина и фибриногена.

Нельзя не учитывать тот факт, что пациенты обеих групп, находясь на стационарном лечении, получали медикаментозное лечение по протоколу, в том числе антикоагулянтную терапию.

У заболевших, у которых был обнаружен коронавирус COVID-19, в крови значимо повышается концентрация С-реактивного белка. При проникновении вируса SARS-CoV-2 в организм запускается иммунный ответ для борьбы с этим патогеном, что и приводит к повышению уровня С - реактивного белка.

Мы определили, что в сравнении с другими, пациенты со спортивным анамнезом имели более высокую концентрацию С-реактивного белка в плазме крови – 85,1 мг/л против 50,6 мг/л.

С-реактивный белок является белком острой фазы и неспецифическим маркером активного воспаления и повреждения тканей [7]. Известно, что С-реактивный белок – это гликопротеин, который синтезируется в печени под действием провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухолей – альфа, интерлейкина-1 и интерлейкина-6). С-реактивный белок участвует в активации комплемента (группы белков, являющихся частью иммунитета), моноцитов, стимулировании экспрессии молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1, E-селектина на поверхности эндотелия.

Надо отметить, что повышение СРБ в плазме крови коррелируется с объемом поражения легочной ткани. Так, согласно данным КТ исследований, процент поражения легочной ткани у лиц со спортивным анамнезом составил 50% (медиана), в то время как процент поражения легочной ткани у второй группы 25% (медиана).

С каждым из пациентов проводились реабилитационные мероприятия: постуральная коррекция, регламентированное дыхание, локомоторная дыхательная гимнастика.

Нами выявлены различия в динамике снижения показателей гемокоагуляции и С-реактивного белка в исследуемых группах. На 17-18 день заболевания у пациентов со спортивным анамнезом уровень СРБ и содержание D-димеров возвращается к нормальным значениям – 7,9 мг/л и 231 нг/мл, соответственно. Что может свидетельствовать о благоприятном исходе заболевания.

У пациентов группы II отмечается достоверное снижение СРБ с 50,6 мг/л до 17,6 мг/л и фибриногена, однако, данные показатели не достигают норм. Содержание фибриногена и D-димеров остается повышенным.

#### **Выводы.**

1. При коронавирусной инфекции в крови увеличивается содержание фибриногена, D-димеров, С-реактивного белка, и достоверно не изменяются такие лабораторные показатели как, протромбиновое время и АЧТВ.

2. Спортивный анамнез пациентов с covid-ассоциированным поражением легких сокращает период восстановления, но может служить дополнительным фактором, влияющим на риск развития нежелательных событий, связанных с нарушением равновесия в системе гемокоагуляции.

#### **Список литературы**

1. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. – 2020;395(10229):1054-62.
2. Miesbach W, Makris M. COVID-19: Coagulopathy, Risk of Thrombosis, and the Rationale for Anticoagulation. *Clin Appl Thromb Hemost*. – 2020. doi: 10.1177/1076029620938149
3. Баранова Е.А., Капилевич Л.В. Влияние физической нагрузки на показатели легочной вентиляции у спортсменов. *Вестник Томского государственного университета*. – 2013. – № 374. С. 152–155.
4. Loupos D., Tsalis G. Alexiou S., Gounaris I. Changes of plasma fibrinogen and fibrinolysis in response to competition stress in swimming coaches. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. – 2005;45(3):424-7
5. L. F. Ng, M.L.Hibberd et al. A human in vitro model system for investigating genome-wide host responses to SARS coronavirus infection. *BMC Infectious Diseases*. – 2004, 4 (34). doi:10.1186/1471-2334-4-34

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

6. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* – 2020; 18 (04). 844-847.

7. D. Stringer, P. Braude, P. K Myint et al. The role of C-reactive protein as a prognostic marker in COVID-19. *International Journal of Epidemiology*, Vol. 50 (2). – 2021, P. 420–429.



**ИЗМЕНЕНИЕ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ ПОД  
ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОЗОНА ПРИ ГИПЕРКАПНЕМИИ**

**Зинчук В.В.**

*д.м.н.,*

*профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии  
Гродненского государственного  
медицинского университета, г. Гродно, Беларусь  
zinchuk@grsmu.by;*

**Билецкая Е.С.**

*ассистент кафедры нормальной  
физиологии Гродненского государственного  
медицинского университета, г. Гродно, Беларусь  
biletskaya.e@inbox.ru;*

*Озон способен активировать метаболизм кислорода и улучшить оксигенацию. Цель данного исследования – изучить изменения сродства гемоглобина к кислороду под воздействием озона при гиперкапнемии. Использовался озон в концентрации 6 мг/л, доноры газотрансмиттеров (нитроглицерин и гидросульфид натрия). Гиперкапнемия усиливала влияние озона на кислородтранспортную функцию крови, уменьшала сродство гемоглобина к кислороду. Добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия не вызывало значимых изменений данных параметров.*

**Ключевые слова:** *озон; газотрансмиттер; нитроглицерин; гидросульфид натрия; гиперкапния*

**CHANGES IN THE AFFINITY OF HEMOGLOBIN FOR OXYGEN  
UNDER OZONE EFFECT IN HYPERCAPNEMIA**

**Zinchuk V.V.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Normal  
Physiology, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus  
zinchuk@grsmu.by;*

**Biletskaya E.S.**

*Assistant, Department of Normal physiology, Grodno State Medical  
University, Grodno, Belarus  
biletskaya.e@inbox.ru;*

*Ozone is able to activate oxygen metabolism and improve oxygenation. The purpose of our investigation is to study the change in the affinity of hemoglobin for oxygen under ozone effect in hypercapnemia. We used ozone at a concentration of 6 mg/l, donors of gas transmitters (nitroglycerin and sodium hydrosulfide). Hypercapnemia enhanced the effect of ozone on the oxygen transport function of the blood, reduced the affinity of hemoglobin for oxygen. The addition of nitroglycerin and sodium hydrosulfide did not cause changes parameters.*

**Key words:** *ozone; gaseous transmitter; nitroglycerine; sodium hydrosulfide; hypercapnia*

Озон стимулирует метаболические процессы в эритроцитах [1], которые в свою очередь оказывают непосредственное влияние на кислородзависимые процессы [2]. Ранее проведённые нами исследования демонстрируют уменьшение под воздействием озона сродства гемоглобина к кислороду и смещение кривой диссоциации оксигемоглобина вправо [3]. Гиперкапния стимулирует выработку монооксида азота, оказывает влияние на метаболизм лёгких, может приводить к изменению положения кривой диссоциации оксигемоглобина [4]. В связи с чем особый интерес представляет изучение влияния озона на сродство гемоглобина к кислороду при гиперкапнемии.

**Цель** – оценить изменение сродства гемоглобина к кислороду под воздействием озона при гиперкапнемии.

**Материалы и методы исследования.** Образцы крови разделялись на 6 групп по 3 мл. Первая группа являлась контрольной. В группах 2, 4, 5, 6 осуществляли достижения необходимого уровня гиперкапнемии путём обработки крови газовой смесью (9,5% CO<sub>2</sub>; 3,5% O<sub>2</sub>, 87,0% N<sub>2</sub>) в термостатируемом сатураторе на протяжении 30 минут. К 3, 4, 5, 6 группе добавляли озонированный изотонический раствор хлорида натрия с концентрацией озона 6 мг/л в объёме 1 мл (в 1-ю и 2-ю без озонирования) и 0,1 мл растворов, содержащих газотрансмиттеры в 5-ю – нитроглицерин в конечной концентрации 0,05 ммоль/л, 6-ю – гидросульфид натрия в конечной концентрации 0,38 ммоль/л; в 1-ю, 2-ю, 3-ю, 4-ю – 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия, после чего пробы перемешивались. Время инкубации составляло 60 мин. Показатели кислородтранспортной функции крови определяли на газоанализаторе Stat Profile pHox plus L (США) при 37°C. Сродство гемоглобина к кислороду оценивали спектрофотометрическим методом по показателю p50<sub>реал</sub> (pO<sub>2</sub> крови при 50% насыщении ее кислородом). По формулам Severinghaus рассчитывали значение p50<sub>станд</sub> и положение кривой диссоциации оксигемоглобина. Изотонический раствор барбатировался озono-кислородной смесью при помощи озонотерапевтической установки УОТА-60-01-Медозон (Россия), в которой предусмотрено измерение концентрации озона оптическим методом в ультрафиолетовом диапазоне.

Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого была использована непараметрическая статистика с применением программы “Statistica 10.0”. Сравнение трех и более независимых групп проводили с помощью рангового дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивалась с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

внутри групп при повторных измерениях, использовали критерий Вилкоксона. Результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартильный размах. Уровень статистической значимости принимали за  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Инкубация крови с озоном приводит к росту основных параметров, отражающих транспорт кислорода кровью: парциального давления кислорода, степени оксигенации, показателя сродства гемоглобина к кислороду  $p50_{\text{реал}}$  и  $p50_{\text{станд}}$ . Предварительная гиперкапния усиливает эффект озона, что подтверждает рост парциального давления кислорода на 40,25% ( $p < 0,05$ ), степени оксигенации на 50,08% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с группой в которой выполнялось только озонирование. Параметр сродства гемоглобина к кислороду  $p50_{\text{реал}}$  при этом увеличивается на 18,27% ( $p < 0,05$ ), отражая сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо. Показатель  $p50_{\text{станд}}$  также растёт. Добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия в этих условиях не влияет на эффект озона на кислородтранспортную функцию крови.

Сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо при снижении парциального давления кислорода в крови можно расценивать как попытку организма компенсировать кислородную недостаточность, но в условиях окислительного стресса, когда нарушена утилизация кислорода тканями и значительная его часть используется в оксигеназных реакциях, ведущих к образованию активных форм кислорода, это приводит к активации процессов свободнорадикального окисления, увеличение  $p50$  способствует росту потока кислорода в ткани в условиях нормоксии или умеренной гипоксии, в тоже время его уменьшение может иметь благоприятное значение, обладая антиоксидантным эффектом в условиях нарушенной утилизации кислорода тканями.

Возможно эффекты озона осуществляются за счёт взаимодействия газотрансмиттеров сероводорода и монооксида азота, которые участвуют в модификации сродства гемоглобина к кислороду, что достигается через следующие механизмы: образование различных дериватов гемоглобина (сульфгемоглобин, метгемоглобин), модулирование внутриэритроцитарной системы формирования кислородсвязывающих свойств крови, L-аргинин-NO системы, а также опосредовано через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина. Нарушения кислородтранспортной функции крови может способствовать потере согласованности функционирования антиоксидантной системы, вызывая прооксидантно-антиоксидантный дисбаланс и развитие окислительного стресса.

Таким образом в этом аспекте стоит рассматривать и представленные нами данные, отражающие эффект озона на кислородтранспортную функцию крови в гиперкапнических условиях.

**Заключение.** Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови усиливается при гиперкапнемии, что проявляется в росте парциального давления кислорода, степени оксигенации, показателя сродства гемоглобина к

кислороду  $p50_{\text{реал}}$  и  $p50_{\text{станд}}$ , характеризуемый сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо. Добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия в этих условиях не вызывает значимых изменений данных параметров.

Финансирование осуществляется в рамках международного научного проекта № M20P-428 – БРФФИ и № 20-515-00019- РФФИ.

**Список литературы:**

1. Therapy in Treatment of COVID-19 Pneumonia. Potential Role of Oxygen-Ozone / Hernández A., Viñals M., Isidoro T., Vilás F. // American Journal of Case Reports. - 2020. № 2: e925849.

2. Gupta A. Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules // Shock. - 2019. Vol. 52, № 1. - P. 70–83.

3. Зинчук В.В., Билецкая Е.С., Гуляй И.Э. Эффект озона на кислородтранспортную функцию и прооксидантно-антиоксидантный баланс крови в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro* // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. -2021. – Т.107, №1. - С. 16–27.

4. Kryvenko V., Vadász I. Mechanisms of Hypercapnia-Induced Endoplasmic Reticulum Dysfunction // Frontiers in Physiology. -2021. №12:735580.

**ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ  
АМИНОПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА E<sub>6</sub> И ИХ  
ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

**Зорина Т.Е.**

*к. б. н., доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики, БГУ, г. Минск, Беларусь  
zorinate@mail.ru*

**Кравченко И.Е.**

*старший научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики, БГУ, г. Минск, Беларусь  
krav-irina@mail.ru*

**Ермилова Т.И.**

*младший научный сотрудник ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь  
tatyana.ig21@gmail.com*

**ШманТ.В.**

*к. б. н., заведующая лабораторией иммунологических исследований научного отдела ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь  
t\_shman@yahoo.com*

**Кустов А.В.**

*д.х.н., профессор, Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, Иваново, Россия  
kustov@isuct.ru*

**Березин Д.Б.**

*д.х.н, профессор, Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия  
berezin@isuct.ru*

**Зорин В.П.**

*к. б. н., доцент, заведующий НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики, БГУ, г. Минск, Беларусь  
vpzorin@mail.ru*

*В данной статье исследовано влияние включения фотосенсибилизаторов – аминокпроизводных хлорина e<sub>6</sub>, в липосомы из димеристоилфосфатидилхолина на характер локализации и механизмы фотодинамического повреждения клеток. Показано, что липосомальные формы аминокпроизводных хлорина e<sub>6</sub>, также как и этерифицированные хлорины, локализируются преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, комплексе Гольджи, митохондриях клетки и имеют низкий уровень локализации в лизосомах. Установлены отличия в активности и механизмах повреждения клеток для хлоринов с различной модификацией боковых групп и*

их липосомальных форм. Различия в механизмах повреждения клеток определяются особенностями локализации и уровнем накопления фотосенсибилизаторов.

**Ключевые слова:** фотосенсибилизаторы; липосомы; аминокпроизводные хлорина  $E_6$ ; локализация в клетке; фотоцитотоксичность

**FEATURES OF LOCALIZATION OF LIPOSOMAL FORMS OF  
AMINO DERIVATIVES CHLORINE  $E_6$  AND THEIR  
PHOTODYNAMIC ACTIVITY**

**Zorina T.E.**

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher,  
Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Department of Biophysics,  
BSU, Minsk, Belarus  
zorinate@mail.ru*

**Kravchenko I.E.**

*Senior Researcher, Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology,  
Department of Biophysics, BSU, Minsk, Belarus  
krav-irina@mail.ru*

**Ermilova T.I.**

*Junior Researcher, State Institution "Republican Scientific and Practical  
Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology", Minsk, Belarus  
tatyana.ig21@gmail.com*

**Shman T.V.**

*Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Immunological  
Research, Scientific Department, State Institution "Republican Scientific and  
Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology", Minsk,  
Belarus  
t\_shman@yahoo.com*

**A.V. Kustov**

*Doctor of Chemistry, Professor, Institute of Chemistry of Solutions named  
after G.A. Krestov Russian Academy of Sciences, Ivanovo, Russia  
kustov@isuct.ru*

**Berezin D.B.**

*Doctor of Chemistry, Professor, Ivanovo State University of Chemical  
Technology, Ivanovo, Russia  
berezin@isuct.ru*

**Zorin V.P.**

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the  
Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Department of Biophysics,  
BSU, Minsk, Belarus  
vpzorin@mail.ru*

*This article is devoted to the study of the accumulation in cells of amino derivatives of the photosensitizer chlorin e<sub>6</sub> administered as solutions or as with lipid vesicles. The intracellular localization and photosensitizing activity of these compounds in cells were additionally studied. It was found that, regardless of the method of administration, all the compounds studied are localized mainly in the endoplasmic reticulum, Golgi complex, cell mitochondria and have a low level of localization in lysosomes. In contrast to the nature of intracellular localization, the overall level of accumulation of the studied compounds in cells, as well as the mechanisms of photosensitized cell damage, strongly depended on both the characteristics of the chemical structure and the method of administration of the photosensitizer.*

**Key words:** photosensitizers, liposomes, chlorin e<sub>6</sub> amino derivatives, cell localization, photocytotoxicity.

Конструирование систем пассивного и/или направленного транспорта гидрофобных фотосенсибилизаторов (ФС) позволяет решить ряд проблем с их введением посредством повышения растворимости, влияния на уровень и кинетику накопления ФС в клетках и тканях и др. Основным действующим агентом при фотосенсибилизированных процессах в биологических системах является синглетный кислород (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Поскольку время жизни <sup>1</sup>O<sub>2</sub> невелико (порядка 0,03-0,04 микросекунды) и длина свободного пробега молекулы за это время не превышает 0,1 мкм, внутриклеточная локализация ФС имеет существенное значение при оценке эффективности их действия [1]. В качестве транспортных систем применяют наночастицы разной природы. Липосомальные формы (ЛФ) ФС являются наиболее изученными наноструктурами, свойства которых оказывают значительное влияние на эффективность применения ФС. Следует отметить, что результаты применения ЛФ зависят как от свойств самого фотоактивного соединения, так и от структурных характеристик частиц-носителей.

**Цель работы.** Провести оценку влияния включения ФС с различной химической структурой в состав липидных нановезикул на характер локализации, уровень накопления и механизмы фотосенсибилизированного повреждения клеточных культур.

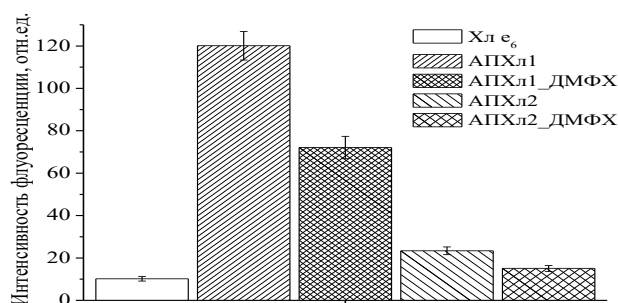
**Материалы и методы.** В работе использованы тетрапиррольные ФС хлоринового ряда с аминогруппами (АПХл e<sub>6</sub>): 13(1)-(2-NNN-триметиламиноэтил)амид-диметиловый эфир хлорина e<sub>6</sub> иодид (АПХл1) и 13(1)-метиламид-17(3)-(2,3-дигидроксиметил-1,4-хиноксалиновый эфир) хлорина e<sub>6</sub> (АПХл2), синтезированные в Ивановском государственном химико-технологическом Университете (Иваново, Россия), а также хлорин e<sub>6</sub> (Хл e<sub>6</sub>) производства Frontier Scientific (США).

Работа проведена на культуральных клетках лейкемической линии миелоидного происхождения К-562. Липосомы готовили из синтетического

насыщенного липида димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), производства «Sigma» (США), на ручном экструдере Avanti Mini-Extruder (метод Бенгема), используя поликарбонатные мембранные фильтры «Nuclepore®» (УК) с порами 100 нм. Соотношение липид:пигмент 40:1.

Анализ локализации ФС в интактных клетках проводили на лазерном сканирующем конфокальном флуоресцентном микроскопе Leica TCS SPE (Германия). Изменения в клетках, индуцированные фотодинамическим воздействием, анализировали на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter, США). Оценку числа некротически поврежденных клеток проводили с использованием пропидиума иодида (PI), апоптотических клеток – липофильного флуорохрома Mito Tracker® Red CMXRos – хлорметил-Х-розамина (CMXRos), чувствительного к изменениям трансмембранного потенциала митохондрий.

**Результаты.** Исследуемые АПХл е<sub>6</sub> в мономерной форме имеют близкие спектральные и фотофизические характеристики, что позволяет использовать величины интенсивности флуоресценции клеток в полосе испускания хлоринов для количественного сравнения уровней их внутриклеточного накопления. Включение АПХл е<sub>6</sub> в липосомы позволяет сохранить мономерное состояние ФС в водных растворах. Спектрально-флуоресцентные характеристики АПХл е<sub>6</sub> в составе липидных везикул, приготовленных экструзионным способом, практически не изменяются. Оценка интегральной флуоресценции единичных клеток показала, что при инкубировании в течение 2 часов в одинаковых условиях исследованные ФС, введенные в суспензию клеток в растворителях и в составе ЛФ имеют различный уровень накопления в клетках. Использование ЛФ для введения АПХл е<sub>6</sub> практически не влияет на кинетику накопления хлоринов в клетках, в тоже время увеличение центров связывания, при введении ФС в составе липосом, сопровождалось снижением их уровня накопления в клетках (рис. 1).



**Рисунок 1.**  
Накопление Хл е<sub>6</sub>, АПХл е<sub>6</sub> и их ЛФ в клетках К 562. Время инкубирования – 120 минут; температура инкубирования 37 °С; концентрация клеток 1x10<sup>6</sup>/мл; концентрация хлоринов 5x10<sup>-6</sup> моль/л.

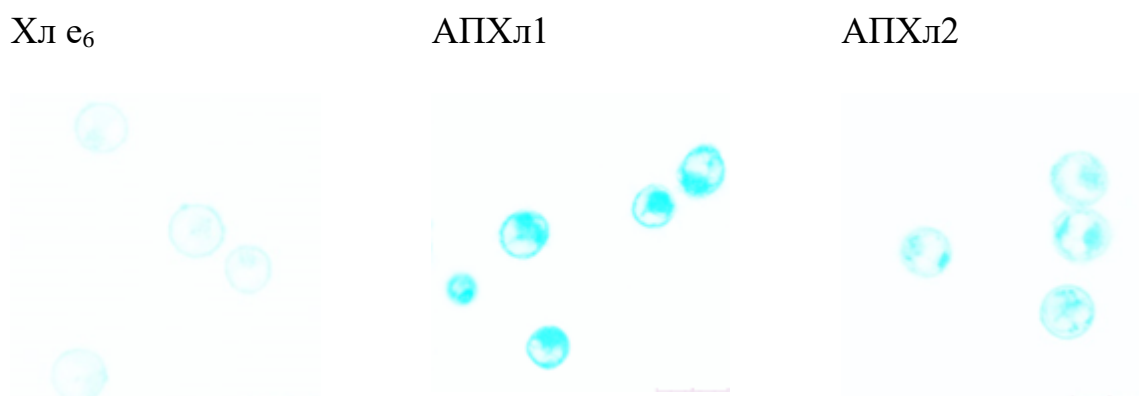
Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными с использованием различных клеточных моделей, согласно которым основными факторами, определяющими уровень накопления и эффективность



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

сенсibilизации повреждения клеток, являются различия скоростей перераспределения ФС на плазматическую мембрану с белков сыворотки крови и наноносителей, а также скорость их трансмембранного переноса [2].

Использование колокализаторов для различных клеточных органелл позволило провести анализ характера внутриклеточного распределению АПХл е<sub>6</sub>. Введение АПХл е<sub>6</sub> в липосомах оказывает существенное влияние на уровень накопления их в клетках, но не влияет на внутриклеточную локализацию АПХл е<sub>6</sub> (рис. 2). Показано, что АПХл е<sub>6</sub> и их ЛФ локализуются преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, комплексе Гольджи, относительно более низкий уровень накопления для них отмечен в митохондриях. При этом для флуоресценции АПХл е<sub>6</sub> и их ЛФ практически нет перекрытия с флуоресценцией лизосомального зонда. Для всех исследуемых ФС флуоресценция в области ядра клетки отсутствует.



**Рисунок 2.** Изображения клеток K562, окрашенных Xл е<sub>6</sub>, АПХл1 и АПХл2 в режиме флуоресценции (инвертированы) через 90 минут инкубирования. Концентрация пигмента  $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ; температура инкубирования 37 °С; срезы клеток представлены для Z=12, число срезов – 20.

Результаты исследования сенсibilизации АПХл е<sub>6</sub> клеток K562 подтверждают наличие корреляции между уровнем накопления ФС и относительной эффективностью фотоповреждения клеток. Процент поврежденных клеток в образцах с Xл е<sub>6</sub> значительно ниже в сравнении с АПХл1, АПХл2. Существенной особенностью процессов фотоповреждения клеток K562 при использовании в качестве ФС АПХл е<sub>6</sub> и их ЛФ являются различия в относительном выходе апоптотически и некротически поврежденных клеток по сравнению с исследованными ранее этерифицированными производными Xл е<sub>6</sub> (ЭПХл е<sub>6</sub>). При облучении клеток в присутствии ЭПХл е<sub>6</sub> и их ЛФ процент апоптотически поврежденных клеток значительно превышал процент числа клеток с поврежденной плазматической мембраной (некротические изменения) [2]. Особенностью фотосенсibilизации с участием АПХл1, АПХл2 и их ЛФ является высокий выход некротически поврежденных клеток.

**Список литературы**

1. Wua J. Photodynamic action of palmatine hydrochloride on colonadenocarcinoma HT-29 cells / J. Wua, Q. Xiao, N. Zhang, Ch. Xue, A. W. Leunga, H. Zhanga, C. Xua., Q.-J. Tangb. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2016. – Vol. 15. – P. 53-58.
2. Zorina T.E. Intracellular Localization and Phototoxicity Mechanisms of Chlorin e6 Derivatives and their Liposomal Formulations / T.E. Zorina , I.V. Yankovsky , I.V. Yakavets, I.E. Kravchenko, T.I. Ermilova, Shman T.V., M.V. Belevtsev, V.P. Zorin // Biophysics. – 2019. – Vol. 64, № 4. – P. 533-542.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, грант № M20P-279.

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ АНТИОКСИДАНТНЫХ И  
МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭРИТРОЦИТАХ  
ПАЦИЕНТОВ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

**Зубрицкая Г.П.**

*к. б. н., ведущий научный сотрудник  
Государственного научного учреждения «Институт биофизики  
и клеточной инженерии НАН Беларуси»  
petro371@mail.ru*

**Найда Н. Н.**

*аспирант кафедры кардиологии и внутренних болезней  
Белорусского государственного медицинского университета,  
заведующий кардиологическим отделением  
УЗ «5-ая городская клиническая больница» г. Минска  
hel.flying@mail.ru*

**Нападовская К.Д.**

*младший научный сотрудник  
Государственного научного учреждения «Институт биофизики  
и клеточной инженерии НАН Беларуси»  
kristina.napadovskaya@mail.ru*

**Климович Е.С.**

*магистрант Белорусского государственного университета  
katrysha@bk.ru*

**Григоренко Е.А.**

*к. м. н., доцент, заместитель директора по международному  
сотрудничеству и аналитической работе  
Государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр «Кардиология» Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь.  
alegri@tut.by*

**Митьковская Н.П.**

*д.м.н.,  
профессор, директор  
Государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр «Кардиология» Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь,  
заведующий кафедрой кардиологии и внутренних болезней  
Белорусского государственного медицинского университета  
mitkovskaya1@mail.ru*

**Слобожанина Е.И.**

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*д.б.н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, главный научный сотрудник Государственного научного учреждения «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»  
eislobozhanina@gmail.com*

*Установлено снижение концентрации восстановленного глутатиона в эритроцитах пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, а также в эритроцитах лиц с артериальной гипертензией и бессимптомным поражением головного мозга по данным магнитно-резонансной томографии по сравнению с пациентами с артериальной гипертензией без поражения головного мозга. Обнаружена прямая зависимость активности мембраносвязанных ферментов в эритроцитах пациентов с показателями степени тяжести и риска артериальной гипертензии. Повышение активности глутатионпероксидазы и каталазы в эритроцитах являлось подтверждением компенсаторной мобилизации глутатионовой системы.*

***Ключевые слова:** артериальная гипертензия; эритроциты; антиоксидантная система защиты; мембраносвязанные ферменты.*

**CHANGES IN THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANTS AND  
MEMBRANE-BOUND ENZYMES IN ERYTHROCYTES  
OF PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION**

**Zubritskaya G.P.**

*candidate of biological sciences, leading researcher of the State Scientific Institution "Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus"*

*petro371@mail.ru*

**Naida N.N.**

*Postgraduate student of the Department of Cardiology and Internal Medicine*

*Belarusian State Medical University, head of the cardiology department  
ME "5th City Clinical Hospital" in Minsk*

*hel.flying@mail.ru*

**Napadovskaya K.D.**

*Junior Researcher of the State Scientific Institution "Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus"*

*kristina.napadovskaya@mail.ru*

**Klimovich E.S.**

*Master's student of the Belarusian State University*

*katrysha@bk.ru*

**Grigorenko E.A.**

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Deputy Director for International Cooperation and Analytical Work*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*State institution "Republican Scientific and Practical Center" Cardiology "of  
the Ministry of Health of the Republic of Belarus.*

*alegri@tut.by*

***Mitkovskaya N.P.***

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Republican Scientific  
and Practical Center "Cardiology" of the Ministry of Health of the Republic of  
Belarus.*

*cardio@bsmu.by*

***Slobozhanina E.I.***

*Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of the  
National Academy of Sciences of Belarus, Chief Researcher of the State Scientific  
Institution "Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy  
of Sciences of Belarus"*

*eislobozhanina@gmail.com*

*A decrease in the concentration of reduced glutathione was found in the erythrocytes of patients with acute cerebrovascular accident, as well as in the erythrocytes of people with arterial hypertension and asymptomatic brain damage according to magnetic resonance imaging compared with patients with arterial hypertension without brain damage. A direct relationship was found between the activity of membrane-bound enzymes in the erythrocytes of patients with indicators of the severity and risk of arterial hypertension. An increase in the activity of glutathione peroxidase and catalase in erythrocytes was a confirmation of the compensatory mobilization of the glutathione system.*

***Key words:*** *arterial hypertension ; erythrocytes antioxidant defense system ; membrane-bound enzymes.*

Артериальная гипертензия (АГ) в XXI веке сохраняет лидирующее место в группе главных причин сердечно-сосудистой смертности и является одной из ведущих медико-социальных проблем во всем мире. На сегодняшний день более одного миллиарда человек страдает данным заболеванием, а к 2025 году ожидается рост числа заболевших до 1,5 миллиардов. Однако истинная заболеваемость АГ неизвестна и часто регистрируется при развитии осложнений, таких, как инфаркт миокарда, внезапная смерть, хроническая сердечная недостаточность, почечная недостаточность, острое нарушение мозгового кровообращения. Ситуация осложняется тем, что большинство пациентов не подозревают о наличии повышенного артериального давления, поскольку АГ часто протекает бессимптомно. В настоящее время широко обсуждается вопрос о роли дисбаланса в системе окислители–антиоксиданты как одного из этиопатогенетических факторов многих заболеваний. Несмотря на огромное количество работ, посвященных исследованиям как системы антиоксидантной защиты (АОС), так и процессов окисления, вопрос о роли данных нарушений в патогенезе развития АГ остается недостаточно

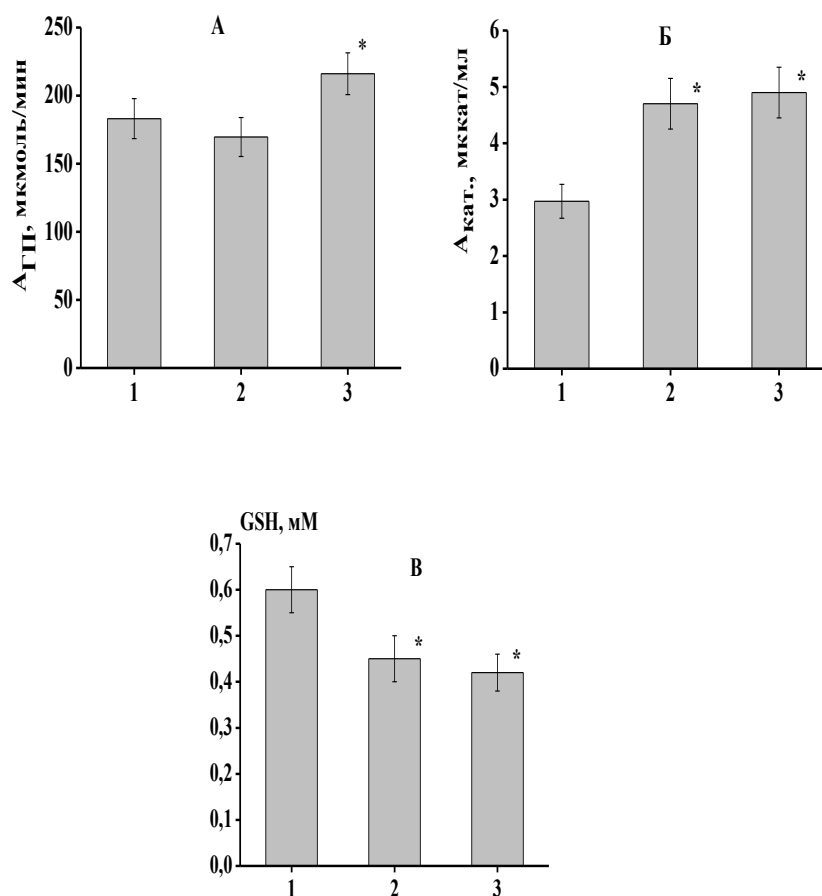
## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

изученным. Также остается открытым вопрос об активности мембраносвязанных ферментов в эритроцитах пациентов при АГ, изменение функционирования которых может привести к нарушению микроциркуляции.

Цель исследования – провести сравнительный анализ активности ферментов антиоксидантной защиты и мембраносвязанных ферментов в эритроцитах пациентов с АГ и поражением головного мозга (ГМ), у лиц с АГ при отсутствии повреждения данного органа-мишени, а также в эритроцитах пациентов с перенесенным острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК).

**Материалы и методы.** В работе использована периферическая кровь пациентов УЗ «5-я городская клиническая больница» г. Минска, включенных в исследование: с АГ без поражения ГМ (n=15), АГ с поражением ГМ (n=17) и лиц с АГ, перенесших ОНМК (n=10). Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000g 10 мин и трижды отмывали в 155 мМ NaCl. Эритроцитарные мембраны выделяли по методу Доджа и сотр. Определение активностей каталазы оценивали (Королюк и др., 1988), глутатионпероксидазы (Моин, 1986). Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) и активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли по методам Элмана. Определение активности мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы в мембранах эритроцитов проводили по скорости окисления NADH.

**Результаты и обсуждение.** Как известно, в эритроцитах каталитическая активность каталазы высока, когда концентрация  $H_2O_2$  в клетке выше  $10^{-4}M$ , при более низких концентрациях перекиси водорода доминируют пероксидазные реакции. Нами установлено, что в эритроцитах пациентов с перенесенным ОНМК наблюдалось достоверное увеличение активности как ГП, так и каталазы по сравнению с пациентами с АГ без поражения головного мозга (рисунок 1 А и Б). В то же время содержание GSH – главного низкомолекулярного антиоксиданта эритроцитов, было достоверно снижено ( $P<0,05$ ) как у пациентов с ОНМК, так и в группе с АГ и поражением головного мозга по сравнению с группой пациентов с АГ без поражения ГМ (рисунок 1 В).



**Рисунок 1** Активность ферментов антиоксидантной защиты (А - глутатионпероксидазы, Б - каталазы) и уровень GSH (В) в эритроцитах пациентов с АГ (1), АГ и поражением головного мозга (2), АГ и ОНМК в анамнезе (3). \*Достоверность анализируемого показателя к группе пациентов с АГ без поражения ГМ ( $P < 0,05$ ).

По всей вероятности, основную антиоксидантную нагрузку после перенесенного ОНМК несут ферменты антиоксидантной защиты: на фоне снижения концентрации GSH наблюдалось повышение активности ГП и каталазы, что является подтверждением компенсаторной мобилизации глутатионовой системы у пациентов, перенесших ОНМК. Можно предположить, что при определенных патологических условиях включаются адаптивные механизмы, поэтому ГП и каталаза начинают играть важную роль в приобретении клеткой устойчивости к окислительному стрессу. Нами обнаружено, что активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах пациентов с АГ (степень 1, риск 2 и степень 2, риск 3) с поражением ГМ было достоверно повышено по сравнению с сопоставимой группой пациентов с АГ без поражения ГМ. Прослеживается тенденция к увеличению активности ГП, снижению каталазной активности и концентрации ВГ соответственно:

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

190,3±18,2 мкмоль/мин, 2,26±0,25 мккат/мл, 0,34±0,045 мМ и 170,6±16,2 мкмоль/мин, 3,5±0,3 мккат/мл, 0,72±0,05 мМ. Известно, что для сохранения способности эритроцитов к деформируемости большое значение имеет структурно-функциональное состояние их мембран, а для газообмена – физико-химическое состояние гемоглобина. Для превращения метгемоглобина в оксигемоглобин в эритроцитах имеются две ферментативные системы – одна из них связана с гликолизом, другая – с пентозофосфатным путем. Принято считать, что наибольшее физиологическое значение имеет восстановление гемоглобина с участием мембраносвязанной NADH-метгемоглобинредуктазы. Нами обнаружено, что активность мембраносвязанной NADH-метгемоглобинредуктазы практически не изменялась в группах пациентов с АГ (степень 1, риск 2; степень 2, риск 3) с поражением головного мозга по сравнению с группой пациентов без поражения ГМ, а в эритроцитах пациентов с ОНМК по сравнению с другими исследуемыми группами проявлялась тенденция к повышению активности мембраносвязанной NADH-метгемоглобинредуктазы. Мембраносвязанная АХЭ является ферментом, характеризующим структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов, и поэтому ее каталитическая активность находится под контролем структурного состояния липидной фазы мембраны. Обнаружено, что значение константы Михаэлиса ( $K_M$ ) для АХЭ в изолированных мембранах эритроцитов пациентов с АГ степень 1, риск 3 и АГ степень 2, риск 3 было достоверно повышено по сравнению с группой пациентов без поражения ГМ (таблица).

**Таблица** - Параметры активности ацетилхолинэстеразы в изолированных эритроцитарных мембранах пациентов с артериальной гипертензией

Группы обследованных пациентов	Максимальная скорость, ( $V_{\text{макс}}$ )* $10^{-4}$ М/мин <sup>-1</sup>	Константа Михаэлиса, ( $K_M$ ) ммоль
Пациенты с АГ без поражения головного мозга	16,5±1,6	1,2±0,05
Пациенты с АГ степень 1, риск 3 с поражением головного мозга	28,0±2,5* P < 0,05	2,1±0,15
Пациенты с АГ степень 2, риск 3 с поражением головного мозга	39,5±3,2** P < 0,01	2,0±0,07

\* и \*\* Достоверность анализируемого показателя к группе пациентов с АГ без поражения ГМ.

Таким образом, показано, что в эритроцитах пациентов с АГ с поражением ГМ наблюдались высокие значения максимальной скорости



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

реакции и константы Михаэлиса АХЭ по сравнению со значениями данных параметров в эритроцитах пациентов с АГ без поражения ГМ. Полученные данные свидетельствуют о том, что активность мембраносвязанных ферментов в эритроцитах пациентов с АГ зависит от степени поражения ГМ.

**ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА ВЫРАБОТКУ  
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ ЕСТЕСТВЕННЫМИ  
КИЛЛЕРАМИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ  
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ**

**Кадушкин А.Г.**

*к. м. н., доцент кафедры биологической химии учреждения образования  
«Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск,  
Беларусь*

*kadushkinah@bsmu.by;*

**Таганович А.Д.**

*д. м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии  
учреждения образования «Белорусский государственный медицинский  
университет», г. Минск, Беларусь taganovich@bsmu.by;*

**Талабаева Э.И.**

*врач-пульмонолог консультационного отделения учреждения  
здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический  
центр», г. Минск, Беларусь*

*alina.tal@mail.ru;*

**Пластинина А.В.**

*врач-пульмонолог консультационного отделения учреждения  
здравоохранения «Минский клинический консультативно-диагностический  
центр», г. Минск, Беларусь*

*alenaalina@gmail.com;*

**Левандовская О.В.**

*заведующая центром трансфузиологии государственного учреждения  
«Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и  
гематологии», г. Минск, Беларусь*

*o\_lev77@mail.ru*

В настоящей работе проведена оценка способности N-ацетилцистеина (N-АЦЦ) усиливать противовоспалительные эффекты глюкокортикоидов (ГК) в отношении продукции провоспалительных медиаторов естественными киллерами (ЕК-клетками) крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) (n=21). Внутриклеточный синтез цитокинов в ЕК-клетках крови, стимулированных форбол-миристал-ацетатом, оценивали методом проточной цитометрии. N-АЦЦ (1 мМ) подавлял синтез интерлейкина 4 (ИЛ-4) и ИЛ-8 ЕК-клетками. Сочетание 1 мМ N-АЦЦ и 10 нМ будесонида оказывало более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 ЕК-клетками, чем действие любого из этих препаратов. Статистически значимой разницы процентного содержания ЕК-клеток, продуцирующих ИЛ-8, интерферон  $\gamma$  и фактор некроза опухоли  $\alpha$ , под влиянием комбинации N-АЦЦ и будесонида по сравнению с клетками,

культивированными в присутствии одного будесонида, выявлено не было. Полученные результаты свидетельствуют об ограниченной способности N-АЦЦ потенцировать противовоспалительные эффекты ГК.

**Ключевые слова:** *естественные киллеры; хроническая обструктивная болезнь легких; медиаторы; N-ацетилцистеин*

**INFLUENCE OF N-ACETYLCYSTEINE ON THE PRODUCTION OF PRO-INFLAMMATORY MEDIATORS BY BLOOD NATURAL KILLER CELLS OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

**Kadushkin A.G.**

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State Medical University", Minsk, Belarus  
kadushkyn@gmail.com;*

**Tahanovich A.D.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State Medical University", Minsk, Belarus,  
taganovich@bsmu.by;*

**Talabayeva E.I.**

*pulmonologist at the Consulting Department of the Healthcare Institution "Minsk Clinical Consultative and Diagnostic Center", Minsk, Belarus  
alina.tal@mail.ru;*

**Plastinina A.V.**

*pulmonologist at the Consulting Department of the Healthcare Institution "Minsk Clinical Consultative and Diagnostic Center", Minsk, Belarus  
alenailina@gmail.com;*

**Levandovskaya O.V.**

*head of the Transfusiology Center of a State Institution "Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology", Minsk, Belarus  
o\_lev77@mail.ru*

*In this work, we have assessed the ability of N-acetylcysteine (N-ACC) to enhance the anti-inflammatory effects of glucocorticoids (GCs) on the production of pro-inflammatory mediators by natural killer cells (NK cells) in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n = 21). Intracellular synthesis of cytokines in blood NK cells stimulated with phorbol myristate acetate was assessed by flow cytometry. N-ACC (1 mM) inhibited the synthesis of interleukin 4 (IL-4) and IL-8 by NK cells. The combination of 1 mM N-ACC and 10 nM budesonide had a more pronounced inhibitory effect on the production of IL-4 by NK cells than the effect of any of these drugs. There was no statistically significant*

*difference in the percentage of NK cells producing IL-8, interferon  $\gamma$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$  under the influence of a combination of N-ACC and budesonide compared to cells cultured in the presence of budesonide alone. The results obtained indicate the limited ability of N-ACC to potentiate the anti-inflammatory effects of GCs.*

**Key words:** *natural killer cells, chronic obstructive pulmonary disease, mediators, N-acetylcysteine*

Глюкокортикоиды (ГК) широко используются для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), поскольку обладают противовоспалительным механизмом действия. Однако клетки пациентов с ХОБЛ оказались устойчивыми к действию этих препаратов. В частности, сообщается о сниженной чувствительности к ГК естественных киллеров (ЕК-клеток). Процентное содержание этих лимфоцитов повышено в дыхательных путях пациентов с ХОБЛ [1].

ЕК-клетки относят к эффекторным клеткам врожденной иммунной системы. Они взаимодействуют с дендритными клетками, макрофагами, Т-лимфоцитами и эндотелиальными клетками, что позволяет им ограничивать или усиливать иммунный ответ. ЕК-клетки являются важным источником цитокинов и хемокинов, таких как интерферон  $\gamma$  (ИФН $\gamma$ ), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), интерлейкин 4 (ИЛ-4), ИЛ-8 и других.

Резистентность клеток пациентов с ХОБЛ к ГК подтолкнула клиницистов и ученых к поиску лекарственных средств, способных усиливать противовоспалительные эффекты стероидов. Получены данные о способности N-АЦЦ усиливать противовоспалительные эффекты ГК [2], которые не нашли подтверждения в работе других исследователей [3].

Целью настоящей работы явилось установить способность N-АЦЦ усиливать противовоспалительные эффекты ГК в отношении синтеза ФНО $\alpha$ , ИФН $\gamma$ , ИЛ-4 и ИЛ-8 ЕК-клетками крови пациентов с ХОБЛ.

В исследовании принял участие 21 пациент с ХОБЛ (17 лиц мужского пола и 4 женщины). Средний возраст обследуемых лиц составил  $65,1 \pm 1,5$ , индекс массы тела –  $26,7 \pm 1,2$  кг·м<sup>-2</sup>. Критерии включения пациентов в исследование: соответствие диагноза критериям GOLD 2019, индекс курящего человека более 10 пачка-лет, стабильное течение заболевания. Критериями исключения из исследования являлись наличие у пациентов других заболеваний бронхолегочной системы, аллергологического анамнеза, острых инфекционных заболеваний, нарушений свертывающей системы крови.

Венозную кровь у пациентов забирали в пробирки, содержащие гепарин натрия, и немедленно доставляли в лабораторию. В новых стерильных пробирках смешивали 7 мл крови с 7 мл культуральной среды RPMI 1640, обогащенной 10% фетальной телячьей сывороткой. К клеточным культурам добавляли 10 нМ будесонида (Glentham Life Sciences Ltd, Великобритания)

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

и/или 1 мМ N-АЦЦ (Sigma-Aldrich, США), и далее пробирки инкубировали в течение 1 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для стимуляции клеток в пробирки вносили 50 нг/мл форбол-миристан-ацетата (ФМА, Cayman Chemical, США) и 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина (Cayman Chemical, Израиль), для прекращения секреции цитокинов из клетки – 10 мкг/мл брефельдина А (Cayman Chemical, Израиль). По окончании 6 часов к клеткам добавляли 100 мкл 20 мМ раствора ЭДТА, пробирки встряхивали в течение 20 секунд. После отмывки к клеткам добавляли моноклональные антитела (CD45-APC-Alexa Fluor 750, Beckman Coulter, Франция; CD3-PE-DyLight 594, CD56-PE-Cy7, Exbio, Чехия) для связывания с соответствующими поверхностными антигенами в течение 15 минут в темноте. Проводили лизирование эритроцитов с применением раствора Versalyse (Beckman Coulter, Франция) в течение 15 минут. Затем, используя IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter), клетки последовательно отмывали, фиксировали в течение 15 минут, снова отмывали и пермеабелизировали в течение 5 минут. В пробирки вносили конъюгированные с флюорохромами антитела к внутриклеточным цитокинам: ИЛ-8-FITC (R&D systems Europe, Великобритания), ИЛ-4-PE, ИФН $\gamma$ -APC или ФНО $\alpha$ -PE (Beckman Coulter). Спустя 15 минут инкубации клеток с антителами, их отмывали и фиксировали, используя 500 мкл 1% раствора параформальдегида. Фенотипирование клеток проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). ЕК-клетки определяли как CD45+CD3-CD56+ события.

Обработку результатов исследования проводили с помощью программы GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Анализ полученных данных проводили с использованием метода ANOVA и критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

В настоящей работе внесение N-АЦЦ к культуре клеток периферической крови снижало продукцию ИЛ-4 ЕК-клетками (таблица). Более того, совместное использование N-АЦЦ и ГК приводило к более выраженному подавлению образования ИЛ-4 ЕК-клетками, чем каждый из препаратов по отдельности.

**Таблица - Влияние N-ацетилцистеина (N-АЦЦ), будесонида и их комбинации на внутриклеточную продукцию цитокинов ЕК-клетками крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких**

Субпопуляция лимфоцитов	ФМА + иономицин	ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ	ФМА + иономицин + N-АЦЦ 1 мМ	ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ + N-АЦЦ 1 мМ
ИЛ-4+ ЕК-клетки, %	3,7 ± 0,2	2,9 ± 0,2*	3,0 ± 0,1*	2,3 ± 0,1* #§

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

ИЛ-8+ ЕК-клетки, %	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1*	1,5 ± 0,2*	1,1 ± 0,2*
ФНО $\alpha$ + ЕК-клетки, %	69,9 ± 6,6	59,3 ± 6,2*	67,4 ± 7,7	52,8 ± 4,7*
ИФН $\gamma$ + ЕК-клетки, %	40,5 ± 5,0	33,8 ± 4,1*	37,7 ± 5,4	33,0 ± 5,6*

Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n=6. ИЛ – интерлейкин; ИФН $\gamma$  – интерферон  $\gamma$ ; ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ ; \* p < 0,05 по сравнению с ФМА + иономицин; #p < 0,05 по сравнению с ФМА + иономицин + будесонид 10 нМ; §p < 0,05 по сравнению с ФМА + иономицин + N-АЦЦ 1 мМ.

Результаты нашего исследования показали, что будесонид и N-АЦЦ по отдельности снижают процент ЕК-клеток, продуцирующих ИЛ-8. При комплексном внесении в культуральную среду будесонида и N-АЦЦ угнеталось образование ИЛ-8 в ЕК-клетках крови пациентов с ХОБЛ по сравнению с такими же клетками, находившимися в культуральной среде в отсутствии этих лекарственных средств. Однако статистически значимой разницы при сравнении процента ЕК-клеток, экспрессирующих ИЛ-8, в присутствии одновременно будесонида и N-АЦЦ с процентом этих клеток, культивированных только с одним из этих препаратов, не наблюдалось. Это свидетельствует об отсутствии преимуществ комбинированного применения N-АЦЦ и ГКС в отношении снижения продукции ИЛ-8 ЕК-клетками крови.

В то время как ИЛ-8 участвует в миграции нейтрофилов, другой цитокин, ИФН $\gamma$ , способствует перемещению Т-лимфоцитов в дыхательные пути пациентов с ХОБЛ. Это происходит за счет его способности индуцировать экспрессию клетками воздухоносных путей хемокинов Mig, IP-10 и I-TAC, которые, связываясь с рецептором Т-лимфоцитов CXCR3, запускают перемещение этих клеток. Как видно из таблицы, N-АЦЦ не влиял на образование ИФН $\gamma$  ЕК-клетками крови пациентов с ХОБЛ. Сочетание N-АЦЦ с ГК оказалось эффективным в подавлении продукции ИФН $\gamma$  ЕК-клетками крови по сравнению с клетками, инкубация которых проводилась в отсутствии обоих лекарственных средств. Однако процент ЕК-клеток, продуцирующих ИФН $\gamma$ , в присутствии одного будесонида не отличался от процента этих клеток, находившихся в культуральной среде совместно с обоими препаратами (будесонидом и N-АЦЦ).

В нашей работе внесение N-АЦЦ в культуру клеток периферической крови не приводило к изменению синтеза ФНО $\alpha$  ЕК-клетками периферической крови, тогда как будесонид подавлял образование ФНО $\alpha$  этими клетками. Сочетание N-АЦЦ и ГК также ингибировало продукцию ФНО $\alpha$  ЕК-клетками. Вместе с тем статистически значимой разницы процентного содержания ЕК-клеток, экспрессирующих ФНО $\alpha$ , при инкубации

клеток с будесонидом и комбинацией лекарственных средств N-АЦЦ/будесонид обнаружено не было. Такие результаты нашего исследования демонстрируют неспособность N-АЦЦ, во-первых, самостоятельно ингибировать синтез ФНО $\alpha$ , а, во-вторых, потенцировать противовоспалительные эффекты ГК в отношении продукции этого цитокина.

Таким образом, N-АЦЦ самостоятельно проявляет противовоспалительные эффекты в отношении продукции цитокинов ЕК-клетками крови пациентов с ХОБЛ. Так, N-АЦЦ подавляет синтез ИЛ-4 и ИЛ-8 ЕК-клетками. Сочетание N-АЦЦ и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 ЕК-клетками, чем действие любого из этих препаратов. Вместе с тем отсутствует разница процентного содержания ЕК-клеток, продуцирующих ИЛ-8, ИФН $\gamma$  и ФНО $\alpha$ , в присутствии комбинации N-АЦЦ и будесонида по сравнению с клетками, находившимися в культуральной среде лишь с одним будесонидом. Полученные результаты свидетельствуют об ограниченной способности N-АЦЦ потенцировать противовоспалительные эффекты ГК.

#### **Список литературы**

1. Hodge, G. Therapeutic Targeting Steroid Resistant Pro-Inflammatory NK and NKT-Like Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease / G. Hodge, S. Hodge // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 6. – P. 1–10.
2. Benefits of high-dose N-acetylcysteine to exacerbation-prone patients with COPD / H.N. Tse [et al.] // *Chest.* – 2014. – Vol. 146, № 3. – P. 611–623.
3. Impact of smoking status and concomitant medications on the effect of high-dose N-acetylcysteine on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: A post-hoc analysis of the PANTHEON study / A. Papi [et al.] // *Respir. Med.* – 2019. – Vol. 147. – P. 37–43.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ  
СИСТЕМЫ ГЕМОГЛОБИН/ГИДРОПЕРОКСИД  
ФОСФАТИДИЛХОЛИНА/КУМАРИН 334**

**Камионская М. В.**

*студентка V курса химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
г. Москва, Россия  
mari-kam@mail.ru;*

**Созарукова М. М.**

*к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории синтеза  
функциональных материалов и переработки минерального сырья  
Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова  
Российской академии наук, г. Москва, Россия  
s\_madinam@bk.ru;*

**Проскурнина Е. В.**

*д.м.н.,*

*доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии  
Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, г.  
Москва, Россия  
proskurnina@gmail.com;*

*Фосфолипиды являются важными субстратами свободнорадикальных реакций, в том числе с участием главного прооксиданта крови — гемоглобина. Целью данной работы был анализ кинетики перекисного окисления гидропероксида фосфатидилхолина, катализируемого дезоксигемоглобином, в присутствии кумарина 334 хемилюминесцентным методом с математическим моделированием экспериментальных кривых. Получено, что гемоглобин по отношению к субстрату проявляет фосфолипипероксидазоподобную активность. Предложена схема из 4-х реакций, наиболее удовлетворительно описывающая кинетику системы, и подобраны константы скоростей, характеризующих прооксидантную активность гемоглобина.*

***Ключевые слова:** свободные радикалы; хемилюминесценция; гемоглобин; перекисное окисление фосфолипидов; механизм; кинетика реакции; скорость реакции; моделирование*

**COMPUTER SIMULATION OF THE KINETICS OF THE  
CHEMILUMINESCENT SYSTEM OF  
HEMOGLOBIN/PHOSPHATIDYLCHOLINE  
HYDROPEROXIDE/COUMARIN 334**

**Kamionskaya M. V.**

*5th year student of the Faculty of Chemistry  
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*



*mari-kam@mail.ru;*

**Sozarukova M. M.**

*Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory for the advanced materials synthesis and minerals processing  
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia*

*s\_madinam@bk.ru;*

**Proskurnina E. V.**

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of  
Molecular Biology*

*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia*

*proskurnina@gmail.com;*

*Phospholipids are important substrates of free-radical reactions, including those involving the main blood prooxidant, hemoglobin. The aim of this work was to analyze the kinetics of phosphatidylcholine hydroperoxidation catalyzed by deoxyhemoglobin in the presence of coumarin 334 by chemiluminescent method with computer simulation of experimental curves. It was obtained that hemoglobin exhibits phospholipoperoxidase-like activity towards to the substrate. The scheme of 4 reactions, most satisfactorily describing the kinetics of the system, was proposed and the rate constants characterizing the pro-oxidant activity of hemoglobin were selected.*

**Key words:** *free radicals; chemiluminescence; hemoglobin; phospholipid peroxidation; mechanism; reaction kinetics; reaction rate; computer simulation*

В развитии ряда социально значимых заболеваний особое место занимает окислительный стресс, в одних случаях являясь первичным звеном патогенеза, в других — следствием [1]. В организме существуют различные мишени действия свободных радикалов. Наиболее чувствительными к свободнорадикальному окислению являются липиды («*primary target*») и фосфолипиды [2, 3]. Важную роль в процессах липидной перекисидации играет Fe (II). Безусловно, в организме главным источником ионов железа является основной белок эритроцитов — гемоглобин. Процесс липидной перекисидации изучен довольно подробно [2], в свою очередь перекисное окисление фосфолипидов (ПОФЛ) требует систематического анализа механизмов и поиска высокоэффективных антиоксидантов для ингибирования ПОФЛ.

Таким образом, целью работы был анализ кинетики перекисного окисления гидропероксида фосфатидилхолина, катализируемого гемоглобином, в присутствии кумарина 334 хемилюминесцентным методом с математическим моделированием экспериментальных кривых.

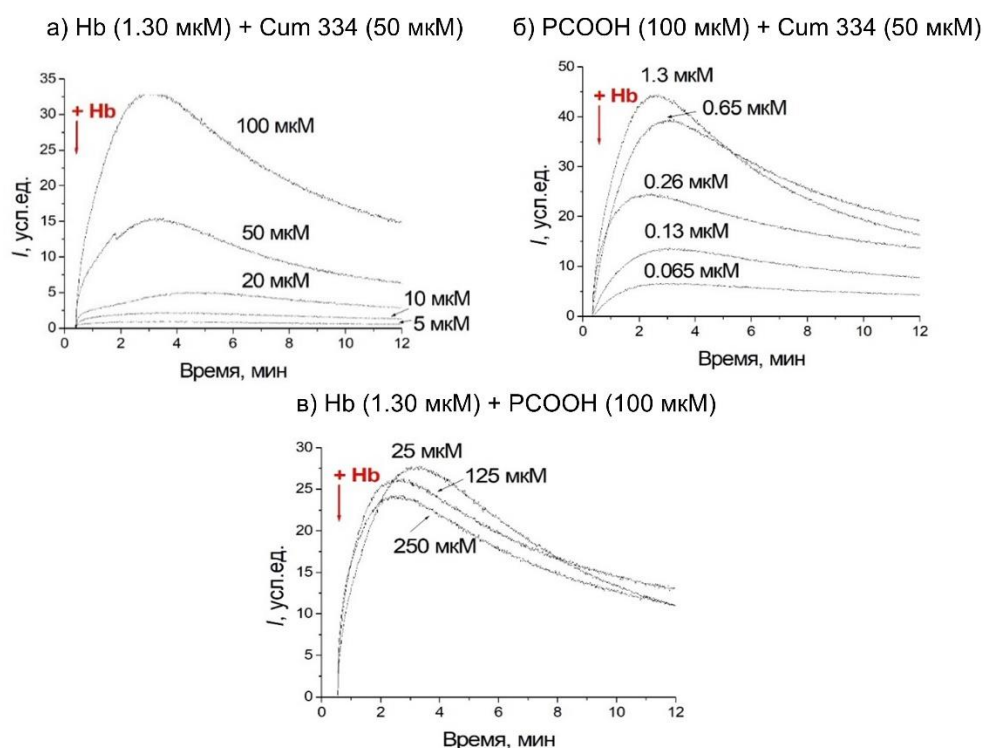
#### **Материалы и методы.**

**Хемилюминесцентная методика регистрации кинетики перекисного окисления фосфолипидов.** Хемилюминесценцию (ХЛ) регистрировали на одноканальном хемилюминометре Lum-100 (ДИСофт, Россия) при комнатной температуре. В пластиковой кювете смешивали аликвоты гидропероксида

фосфатидилхолина (PCOON, препарат «Фосфолипovit», ИБМХ), кумарина 334 (Cum 334) — ХЛ-зонд, чувствительный к липидным и фосфолипидным радикалам, и необходимое количество фосфатного буферного раствора (ФБР, 100 мМ рН 7.4). Общий объем составлял 1.000 мл. Регистрировали спонтанную ХЛ в течение 30–60 с. Реакцию перекисного окисления фосфолипида инициировали добавлением к системе дезоксигемоглобина (Hb) (стабилизация гепарином лития 17 МЕ/мл).

**Математическое моделирование хемилюминесцентных кривых.** Моделирование кинетики экспериментальных кривых проводили при помощи программы Kinetic Analyzer (разработчик Д.Ю. Измайлов). В данной программе решается прямая задача, а именно предполагается построение математической модели, представляющей собой набор химических реакций, и вычисление значений констант скоростей этих реакций, при которых совпадение теоретической и экспериментальной кривых будет удовлетворительным.

**Результаты и обсуждение.** Хемилюминесцентные кривые (ХЛ-кривые), полученные при варьировании концентраций компонентов системы, фосфолипида, дезоксигемоглобина и кумарина 334, приведены на рис. 1(а) – (в), соответственно.

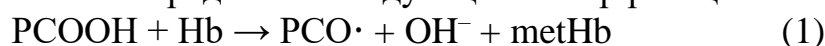


**Рисунок 1.** ХЛ–кривые при разных концентрациях (а) PCOON; (б) Hb; (в) Cum 334.

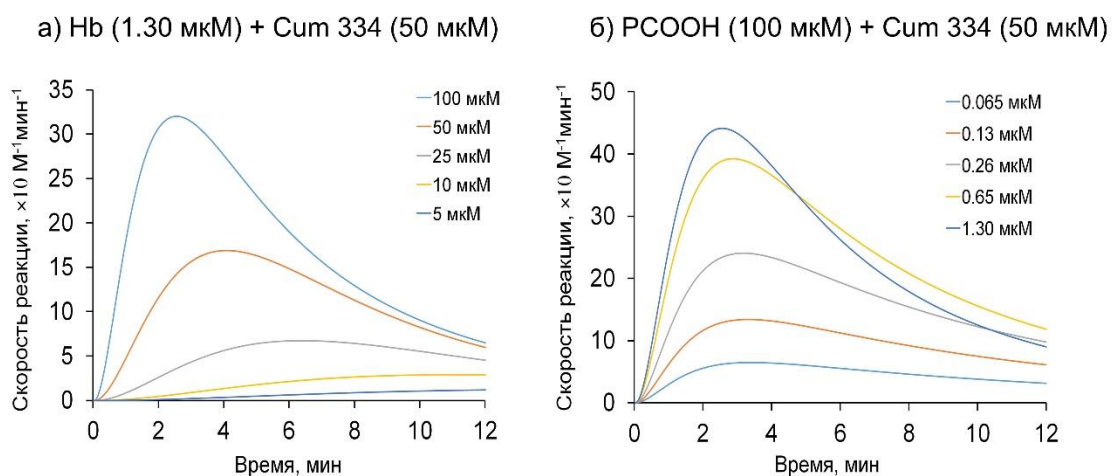
Система характеризовалась высокой интенсивностью свечения, наблюдалась экспоненциально затухающая кинетика, развивающаяся относительно медленно при сравнении с кривыми по типу быстрой вспышки в случае липидной перекисидации [2]. Увеличение концентраций PCOON и Hb приводило к дозозависимому эффекту усиления ХЛ. В свою очередь

варьирование содержания в системе кумарина 334 не вызывало существенного изменения аналитического сигнала. Незначительное снижение интенсивности ХЛ можно объяснить эффектом перепоглощения.

С целью подбора наиболее вероятной схемы реакций и констант скоростей взаимодействия гемоглобина с субстратом восстановления было проведено математическое моделирование экспериментальных кривых. На основании литературных данных [4] возможными продуктами взаимодействия субстрата (гидропероксид фосфолипида) с катализатором (гемоглобином) могут быть радикалы фосфолипида ( $\text{PCO}\cdot$ ) и окисленная форма гемоглобина (метгемоглобин,  $\text{metHb}$ ). Как известно, кумарин 334 является, так называемым, физическим активатором (рис. 1в), в основе действия которого процесс переноса (миграции) энергии с молекулы продукта ХЛ-реакции на активатор [5]. Следующим предположением при построении математической модели был тот факт, что два радикала фосфолипида при взаимодействии друг с другом образуют некий промежуточный продукт в возбужденном состоянии ( $\text{P}^*$ ). В дальнейшем переход продукта в основное состояние ( $\text{P}$ ) сопровождается высвобождением квантов света ( $h\nu$ ). В связи с выше сказанным, для описания кинетики был предложен следующий набор реакций:



Взяв за основу предложенную схему реакций (1) – (4) с соответствующими начальными концентрациями компонентов системы  $\text{Hb}/\text{PCOON}/\text{Cum}$  334, осуществляли подбор констант реакций до совпадения расчетных и экспериментальных кривых. Результаты моделирования экспериментальных кривых при варьировании концентраций гидропероксида фосфатидилхолина и дезоксигемоглобина приведены на рис. 2(а) и (б), соответственно:



**Рисунок 2.** Данные моделирования кинетики ХЛ-системы  $\text{Hb}/\text{PCOON}/\text{Cum}$  334 при изменении концентраций: (а) PCOON; (б) Hb.

Наилучшее соответствие между экспериментальными и рассчитанными ХЛ-кривыми было найдено при следующих значениях констант ( $M^{-1}min^{-1}$ ):

$$k_1 = 9.00 \times 10^3,$$

$$k_2 = 9.00 \times 10^2,$$

$$k_3 = 4.00 \times 10^4,$$

$$k_4 = 8.00 \times 10^2,$$

полученные константы являются количественной характеристикой прооксидантной активности гемоглобина, отражая скорость его взаимодействия с субстратом восстановления.

**Заключение.** Получены кинетические кривые в ХЛ-системе Нь/PCOON/Cum 334 при варьировании концентраций всех компонентов. Данные хемилюминесцентного анализа демонстрируют прооксидантные свойства дезоксигемоглобина по отношению к гидропероксиду фосфатидилхолина в присутствии кумарина 334.

Методом математического моделирования кинетики предложен возможный механизм (реакции (1) – (4)) процессов, протекающих при перекисном окислении гидропероксида фосфатидилхолина, катализируемом дезоксигемоглобином. Подобраны константы скоростей реакций, являющиеся количественной характеристикой прооксидантной активности дезоксигемоглобина.

**Финансирование работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-2763.2021.1.3).

#### Список литературы.

1. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine / H. Sies // *Redox biol.* — 2015. — 4. — P. 180–183.
2. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. — М.: Наука, 1972. — 102 с.
3. Reis, A. Chemistry of phospholipid oxidation / A. Reissand, C. M. Spickett, // *BBA. Biomembranes.* — 2012. — 1818(10). — P. 2374–2387.
4. Antunes, F. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model / F. Antunes, A. Salvador, H. S. Marinho, R. Alves, R. E. Pinto // *Free Radic. Biol. Med.* — 1996. — V. 21(7). — P. 917–943.
5. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биол. химии.* — 2009. — Т. 49. — №. 7. — С. 341–388.

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ МЕЛАТОНИНА У ПАЦИЕНТОВ С ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНЬЮ

**Карпович О.А.**

*к. м. н., старший преподаватель*

*2-й кафедры внутренних болезней учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь  
[olesjakarpovich@rambler.ru](mailto:olesjakarpovich@rambler.ru);*

*Исследован уровень 6-сульфатоксимелатонина в моче у 29 пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и 21 пациента контрольной группы. Выявлено снижение суточного и ночного уровня мелатонина при ГЭРБ, а также смещение пика его синтеза на дневные часы при эрозивной ГЭРБ. Выявленные особенности суточной продукции мелатонина были ассоциированы с выраженностью изменений слизистой оболочки пищевода. Стандартная антисекреторная терапия ГЭРБ с использованием ингибитора протонной помпы сопровождалась повышением уровня мелатонина на протяжении всех периодов суток.*

**Ключевые слова:** *гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь; ГЭРБ; рефлюкс-эзофагит; мелатонин; 6-СОМ*

## CHANGES IN MELATONIN LEVELS IN PATIENTS WITH GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE

**Карпович А.А.**

*PhD, Senior Lecturer of the Department of Internal Medicine,  
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus  
[olesjakarpovich@rambler.ru](mailto:olesjakarpovich@rambler.ru);*

*The level of 6-sulfatoxymelatonin in urine was studied in 29 patients with gastroesophageal reflux disease and 21 patients in the control group. A decrease in the 24-hour urine and nighttime levels of melatonin in GERD, as well as a shift in the peak of its synthesis to the daytime in erosive GERD, was revealed. The revealed features of daily melatonin production were associated with the severity of changes in the esophageal mucosa. Standard antisecretory therapy for GERD using a proton pump inhibitor was accompanied by an increase in melatonin levels throughout the 24-hour.*

**Keywords:** *gastroesophageal reflux disease; GERD; reflux esophagitis; melatonin; 6-SOM*

Желудочно-кишечный тракт проявляет высокую биосинтетическую активность в отношении мелатонина и вносит значительный вклад в поддержание его уровня в плазме крови, особенно в дневное время [1]. Основная функция местного производства мелатонина в верхних отделах желудочно-кишечного тракта заключается в поддержании целостности барьера слизистой оболочки пищевода и желудка и обеспечении её защиты от повреждающего

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

действия разного рода стрессоров эндогенного или экзогенного происхождения [2, 3]. Таким образом, представляется актуальным изучение особенностей продукции мелатонина у пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ).

**Цель исследования.** Оценить особенности суточной продукции мелатонина у пациентов с ГЭРБ и динамику его уровня на фоне стандартной антисекреторной терапии с использованием ингибитора протонной помпы.

**Материал и методы.** В исследовании приняли участие 29 пациентов в возрасте 30-60 лет с верифицированным диагнозом ГЭРБ. Группу сравнения составили 21 человек без ГЭРБ. Все лица, согласившиеся на участие в исследовании, подписали форму «Информированное согласие пациента на участие в научном исследовании». Критериями невключения были: язва желудка и/или двенадцатиперстной кишки в стадии обострения, цирроз печени, хронические заболевания внутренних органов в стадии обострения, острые воспалительные и инфекционные заболевания, приём снотворных и препаратов, содержащих мелатонин, иные заболевания, влияющие на синтез и обмен мелатонина.

Уровень мелатонина оценивали по содержанию его метаболита 6-сульфатоксимелатонина (6-COM) в суточной моче и отдельно в дневной и ночной её порциях методом иммуноферментного анализа (ELIZA). Также рассчитывался индекс ночь/день, который характеризует суточную ритмику продукции мелатонина.

Статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., США). Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q25-Q75). В случае описания количественных показателей, имеющих нормальное распределение, полученные данные описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD). Для сравнения независимых совокупностей между двумя группами использовался U-критерий Манна-Уитни. При сравнении количественных показателей между четырьмя независимыми выборками использовался критерий Краскела–Уоллиса (H). С целью изучения связи между явлениями использовался расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). За уровень значимости принималось значение  $p < 0,05$  [10].

**Результаты.** Исследуемые группы были сопоставимы по гендерному составу, возрасту и индексу массы тела. Характеристика исследуемых групп представлена в таблице 1.

**Таблица 1.** - Характеристика исследуемых групп

Показатели	Основная группа (n = 29)	Группа сравнения (n = 21)	p- уровень
Возраст, лет	44,2±9,2	41,9±9,1	0,61

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Пол, муж. (%)	18 (62%)	17 (81%)	0,15
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	26,9 (23,8; 28,7)	27,5(23,9; 30,1)	0,40

При анализе уровня 6-СОМ установлено его снижение в суточной моче и ночной её порции у пациентов основной группы. Кроме того, у пациентов основной группы отмечалась тенденция к смещению пика синтеза мелатонина на дневные часы, о чём свидетельствует более выраженное снижение индекса ночь/день, однако не достигшее достоверного уровня значимости. Результаты представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** - Показатели уровня 6-СОМ в исследуемых группах

Уровень 6-СОМ	Основная группа (n=29)	Группа сравнения (n=21)	p- уровень
Сутки, нг/мл	30,53 (7,1; 71,78)	80,0 (33,42; 113,86)	0,0011
День, нг/мл	31,53 (8,1; 73,34)	64,95 (16,67; 152,36)	0,14
Ночь, нг/мл	22,69 (4,1; 74,81)	85,71 (60,20; 151,0)	0,0004
Инд. ночь/день, %	49,4 (31,7; 61,1)	53,2 (45,9; 70,8)	0,074

Для изучения особенностей продукции мелатонина в зависимости от степени эндоскопических изменений слизистой оболочки пищевода из пациентов основной группы были сформированы 2 подгруппы в зависимости от тяжести эзофагита: подгруппа Г 1 (n=20) – пациенты с неэрозивной рефлюксной болезнью (НЭРБ) и подгруппа Г 2 (n=9) – пациенты с эрозивной рефлюксной болезнью (ЭРБ). Статистический анализ показал, что при менее тяжелой (неэрозивной) форме ГЭРБ отмечается более выраженное смещение пика синтеза мелатонина на дневные часы, что выражается в статистически значимом уменьшении значения индекса ночь/день по отношению к пациентам контрольной группы (индекс ночь/день 41,5 (25,2; 51,8) против 59,9 (47,7; 70,8) %, p=0,013).

Корреляционный анализ выявил наличие обратной связи между уровнем 6-СОМ в суточной моче и степенью эндоскопических изменений слизистой оболочки дистального отдела пищевода (r=-0,39, p=0,0061). У пациентов с ЭРБ выявлена прямая корреляционная связь между уровнем 6-СОМ в ночной порции мочи и степенью повреждения слизистой пищевода (r=0,61; p=0,008).

Всем пациентам с ГЭРБ была назначена стандартная антисекреторная терапия ингибитором протонной помпы панторазолом. Пациенты с НЭРБ получали пантопразол в дозе 40 мг в сутки, пациенты с ЭРБ - 80 мг в сутки. Через 4 недели лечения у 10 случайным образом отобранных пациентов повторно проведена ЭГДС и определялся уровень 6-СОМ в моче. По результатам ЭГДС отчетливые повреждения слизистой оболочки пищевода в виде эрозий и язв отсутствовали у всех обследованных пациентов (100%). Макроскопические признаки катарального рефлюкс-эзофагита в виде гиперемии слизистой

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

оболочки дистального отдела пищевода сохранялись у 3-х из 4-х включенных в данный этап исследования пациентов с ЭРБ (75%).

В ответ на стандартную антисекреторную терапию пантопразолом выявлено увеличение уровня 6-СОМ на протяжении всех периодов суток. Результаты представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** - Показатели уровня 6-СОМ в исследуемых группах до и после курса стандартной антисекреторной терапии

Уровень 6-СОМ	До лечения (n=10)	После лечения (n=10)	p-уровень
Сутки, нг/мл	59,64 (10,83; 76,71)	98,90 (65,83; 171,09)	0,041
День, нг/мл	61,12 (7,42; 74,16)	106,51 (45,43; 132,72)	0,023
Ночь, нг/мл	59,03 (18,15; 82,09)	109,47 (71,36; 192,53)	0,042
Инд. ночь/день, %	56,8 (33,5; 80,1)	55,0 (48,5; 60,1)	0,62

**Заключение.** Основная функция местного производства мелатонина в верхних отделах ЖКТ заключается в поддержании целостности барьера слизистой оболочки пищевода и желудка и обеспечении ее защиты от повреждающего действия разного рода стрессоров эндогенного или экзогенного происхождения. Изучение уровня 6-СОМ в моче у пациентов с ГЭРБ позволило выявить снижение суточной выработки мелатонина ( $p=0,0011$ ) за счет дефицита его синтеза в ночные часы ( $p=0,0004$ ). Кроме того, у пациентов с НЭРБ отмечалось достоверное смещение пика синтеза мелатонина на дневные часы, что выражается в уменьшении индекса ночь/день ( $p=0,013$ ). Установленные особенности продукции мелатонина ассоциированы со степенью эндоскопических изменений слизистой оболочки пищевода: уровень 6-СОМ в суточной моче пациентов с ГЭРБ ( $r=-0,39$ ,  $p=0,0061$ ) и уровень 6-СОМ в ночной моче пациентов с ЭРБ ( $r=0,61$ ;  $p=0,008$ ). Полученные данные указывают на то, что мелатонин оказывает защитное действие на слизистую оболочку пищевода при ГЭРБ, что подтверждается увеличением уровня 6-СОМ в моче на протяжении всех периодов суток на фоне 4-х недельной стандартной антисекреторной терапии пантопразолом ( $p=0,041$  в суточной моче,  $p=0,023$  в дневной порции мочи и  $p=0,042$  в ночной порции мочи). При этом важно отметить, что для реализации эзофагопротективного эффекта мелатонина недостаточно повышения его суточной продукции. Увеличение именно дневной продукции данного гормона ассоциировано с менее выраженным повреждением слизистой оболочки при ГЭРБ.



**Список литературы**

1. Esophagoprotection mediated by exogenous and endogenous melatonin in an experimental model of reflux esophagitis / P. C. Konturek [et al.] // J. of Pineal Research. – 2013. – Vol. 55, № 1. – P. 46–57.
2. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT) / S. J. Konturek [et al.] // J. of Physiology a. Pharmacology. – 2007. – Vol. 58, № 3. – P. 381–405.
3. Bubenik, G. A. Thirty-four years since the discovery of gastrointestinal melatonin / G. A. Bubenik // J. of Physiology a. Pharmacology. – 2008. – Vol. 59, № 2. – P. 33–51.

**ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ  
ЗАЩИТУ НОВОРОЖДЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРОКСИИ**

**Клачѣк В. С.**

*ассистент кафедры биологической химии,  
meri.blut@mail.ru*

**Котович И. Л.,**

*к.м.н., доцент кафедры биологической химии,*

**Рутковская Ж. А.,**

*к.м.н., доцент кафедры биологической химии,*

*Белорусский государственный медицинский университет,*

*г. Минск, Беларусь*

*В статье представлены результаты исследования, проведенные на группах новорожденных морских свинок, которые подвергались кратковременной и длительной гипероксии, определены основные антиокислительные ферменты в бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Выяснилось, что в условиях длительной гипероксии наблюдается снижение активности основных антиоксидантных ферментов. Однако ингаляционное введение N-ацетилцистеина способствует увеличению синтеза глутатиона, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы, что эффективно для усиления антиоксидантной защиты.*

**Ключевые слова:** *бронхолегочная дисплазия; глутатион; N-ацетилцистеин; окислительный стресс; свободные радикалы; ферменты-антиоксиданты*

**EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE ON ANTIOXIDANT  
PROTECTION  
OF NEWBORNS UNDER HYPEROXIA**

**Klachok V. S.**

*assistant of the department of biological chemistry of  
the Educational Institution «Belarusian State Medical University»,*

*Minsk, Belarus*

*meri.blut@mail.ru*

**Katovich I. L.,**

*candidate of medical sciences,*

*associate professor of the department of biological chemistry,*

**Rutkovskaya Zh. A.,**

*candidate of medical sciences,*

*associate professor of the department of biological chemistry,*

*The article presents the results of a study carried out on groups of newborn guinea pigs that were exposed to short-term and long-term hyperoxia, the main antioxidant enzymes in the bronchoalveolar lavage. It turned out that under conditions of prolonged hyperoxia, there is a decrease in the activity of the main antioxidant*

*enzymes. However, inhalation of N-acetylcysteine increases the synthesis of glutathione, glutathione peroxidase and superoxide dismutase, which is effective for enhancing antioxidant protection.*

**Key words:** *bronchopulmonary dysplasia; glutathione; N-acetylcysteine; oxidative stress; free radicals; antioxidant enzymes*

В настоящее время проблема возникновения бронхолегочной дисплазии у новорожденных недоношенных детей остается актуальной. Для выхаживания и поддержания полноценного газообмена применяют искусственную вентиляцию легких. Однако этот метод нельзя назвать эффективным. Вдыхание высоких концентраций кислорода, который является мощным окислителем и источником свободных радикалов, способствует развитию «оксидантного стресса» [1]. У недоношенных это явление протекает на фоне недостатка антиоксидантных систем и служит одним из факторов повреждения легочной ткани, что в дальнейшем приводит к бронхолегочной дисплазии [6]. Для того чтобы предотвратить нежелательный эффект, необходимо усилить антиоксидантную защиту организма. N-ацетилцистеин (N-АЦ), являясь одним из мощных антиоксидантов, способен поддерживать окислительно-восстановительный статус клеток, тем самым защищает организм от влияния свободных радикалов, поставляя цистеин для синтеза глутатиона [4].

Материалы и методы. Для исследования были отобраны новорожденные морские свинки: 1 группа – интактные животные; 2 группа – животные, которые подверглись гипероксии (новорожденных животных помещали в плексигласовую камеру, где поддерживали концентрацию кислорода не менее 70% в течение 3 или 14 суток); 3 группа – животные, которые во время воздействия гипероксии получали ингаляционно N-АЦ (20% раствор для ингаляций) из расчета 250 мг/кг. Для разведения препарата использовали натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. Ингаляции проводили один раз в два дня с помощью компрессорного небулайзера.

По окончании эксперимента животных наркотизировали тиопенталом натрия (15 мг/кг) и проводили промывание легких через эндотрахеальный зонд раствором 0,9% NaCl. Полученную бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ) центрифугировали для осаждения клеток. В бесклеточном супернатанте БАЛЖ определяли содержание восстановленного глутатиона и активность основных антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы (ГП), супероксиддисмутазы (СОД), каталазы.

Статистическая обработка данных выполнялась с использованием пакета программ STATISTICA 10.0. Анализ осуществляли непараметрическими методами вариационной статистики и выражали в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей [25%-75%]. При изучении статистических различий между двумя группами показателей применяли критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Результаты и обсуждение. После кратковременной гипероксии в течение 3 суток, количество глутатионпероксидазы уменьшилось по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Это связано с тем, что глутатионпероксидаза – селензависимый фермент, поэтому ее активность напрямую зависит от содержания селена в организме. В условиях свободнорадикального окисления у новорожденных стремительно истощаются запасы данного микроэлемента, и как следствие снижается активность ГП [2]. Изменений среди супероксиддисмутазы, каталазы и глутатиона не наблюдалось.

**Таблица 1.** - Содержание антиоксидантных ферментов в группах новорожденных морских свинок после 3 суток гипероксии

Антиоксидантные ферменты	Контроль 3	Опыт 3	Опыт + NAC 3	Контроль / опыт 3 p	Контроль / опыт 3+NAC p
ГП нМ/мин/мг белка	81,47 [73,35-91,7]	30,62 [12,07-65,5]*	40,08 [37,08-75,05]	$p < 0,05$	-
СОД мкмоль/мин/мг белка	44,47 [42,6-57,4]	50,64 [39,8-62,9]	42,5 [35,27-48,38]	-	-
Каталаза мкмоль/мин/мг белка	0,28 [0,21-0,46]	0,36 [0,34-0,47]	0,52 [0,27-0,54]	-	-
Глутатион нМ/мг белка	61,16 [40,36-89,37]	84,4 [63,66-112,4]	44,6 [41,95-49,9]	-	-

Примечание: \* - Есть статистически значимые различия.

При увеличении гипероксии до 14 суток количество глутатионпероксидазы и глутатиона в БАЛЖ уменьшилось в 1,86 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Глутатион, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза образуют глутатионовую антиоксидантную систему. Глутатион защищает клетку от токсичного действия свободных радикалов. При этом восстановленная форма глутатиона становится окисленной. Катализирует данное превращение глутатионпероксидаза. Восстановление окисленной формы глутатиона происходит за счёт НАДФН·Н<sup>+</sup> и фермента глутатионредуктазы. Однако недостаток кофермента ведет к снижению активности глутатионредуктазы и сульфгидрильная группа глутатиона не может восстановиться. Вследствие чего количество восстановленного глутатиона

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

уменьшается, что отрицательно сказывается на активности глутатионпероксидазы [3].

**Таблица 2.** Содержание антиоксидантных ферментов в группах новорожденных морских свинок после 14 суток гипероксии

Антиоксидантные ферменты	Контроль 14 р	Опыт 14	Опыт + NAC	Контроль опыт 14 р	Контроль опыт 14+NAC р
ГП нМ/мин/мг белка	58,19 [36,3-82,4]	30,7 [22,98-35,59]	33,8 [27,3-40,23]	p<0,05	-
СОД мкмоль/мин/мг белка	45,71 [40,26-54,44]	39,52 [35,52-51,85]	58,03 [46,69-64,96]	-	p<0,05
Каталаза мкмоль/мин/мг белка	0,24 [0,16-0,31]	0,21 [0,16-0,28]	0,18 [0,13-0,22]	-	-
Глутатион нМ/белка	116,8 [73,56-177,5]	61,77 [47,8-70] *	113,63 [99,95-122,4]	p<0,01	p<0,05

Примечание: \* - Есть статистические значимые различия.

У животных, которые ингаляционно получали N-АЦ в период длительной гипероксии, наблюдалось увеличение концентрации супероксиддисмутазы в 1,47 раза (p<0,05), глутатиона – в 1,8 раза (p<0,05) по сравнению с контролем. Это обусловлено тем, что N-ацетилцистеин является поставщиком цистеина, который необходим для синтеза глутатиона, а сама восстановленная форма данного антиоксиданта необходима для активации и увеличения активности супероксиддисмутазы [5].

Таким образом, ингаляционное введение N-ацетилцистеина способствует увеличению синтеза основных антиокислительных ферментов, что является эффективным для усиления антиоксидантной защиты недоношенного организма.

### Список литературы

1. Самаль, Т. Н. Бронхолегочная дисплазия в хронической стадии у детей раннего возраста / Т. Н. Самаль, Т. Г. Маскаленко // Журнал медицинские новости. – 2009. – № 13. – С.6.
2. Матейкович, П. А. Глутатионпероксидаза как фермент системы антиоксидантной защиты клеток / П. А. Матейкович // Международный научный журнал. – 2016. – № 6. – С.22-23.
3. Рутковская, Ж. А. Влияние гипероксии на состояние антиоксидантной системы эритроцитов у новорождённых морских свинок / Ж. А. Рутковская,

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

И. Л. Котович, А. Д. Таганович // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2011. – № 3. – С.52-53.

4. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why / G. Aldini, A. Altomare, G. Baron [et al.] // Free Radical Research. – 2018. – Vol. 52. – P. 751-760.

5. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone / M. Carroll, J. Girouard, J. Ulloa [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – P. 5964-5965.

6. Matyas, M. Antioxidants at Newborns / M. Matyas, G. Zaharie // Antioxidants. – 2019. – Ch.10. – P. 97-109.

**РИСК РАЗВИТИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, СВЯЗАННЫХ С  
УРОТЕЛИАЛЬНОЙ КАРЦИНОМОЙ, НА ОСНОВАНИИ  
ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ГУАНИНА В ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ  
ГУАНИНОВЫХ КВАДРУПЛЕКСАХ**

*Коваль А. Н.,  
к.б.н., доцент*

*Гомельский государственный медицинский университет  
akoval@gmail.com*

*Вопросы диагностики и лечения онкологических заболеваний включают разработку перспективных лечебных средств таргетного действия. Возникновение мутаций в онкогенах и онкосупрессорах может объясняться высоким процентным содержанием в них гуаниновых нуклеотидов, которые способны образовывать гуаниновые квадруплексы (G4).*

**Ключевые слова:** *уротелиальная карцинома; гуанин; мутации*

**THE RISK OF DEVELOPING MUTATIONS IN GENES ASSOCIATED  
WITH UROTHELIAL CARCINOMA BASED ON PERCENTAGE OF  
GUANIN IN POTENTIAL GUANINE QUADRUPLEXES**

*Koval A. N.*

*the candidate of biological sciences, an associate professor  
Homel state medical university  
akoval@gmail.com*

*The diagnosis and treatment of urothelial carcinoma includes the development of prospective target facilities. Mutation occurrence in oncogenes and oncosuppressants can be explained by high percentage of guanine that can develop guanine quadruplexes.*

**Key words:** *urothelial carcinoma; guanine; mutations*

Уротелиальная карцинома – злокачественное новообразование, которое занимает четвертое место в структуре онкологической заболеваемости. Основными факторами, способствующими развитию уротелиального рака, являются курение и профессиональная деятельность (воздействие ароматических аминов и прочих канцерогенных соединений). Имеют место и эпигенетические нарушения в опухолевых клетках уротелиальной карциномы [1].

**Цель исследования.** Оценить риск развития мутаций в генах, связанных с развитием уротелиальной карциномы, на основании процентного содержания гуанина в G4.

**Материалы и методы.** Референсные последовательности ряда генов, мутации в которых обнаруживаются при уротелиальной карциноме (FGFR3, PIK3CA, ERBB2, ERBB3, TP53, RB1, MDM2, AKT1, CCND1, HRAS, KRAS). G4

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

определяли с использованием пакета `gquad` для среды программирования R, рассчитывали процентное соотношение гуаниновых нуклеотидов в каждой G4 последовательности. Статистическая значимость различий определяли непараметрическими статистическими методами (тесты Краскела-Уолеса и Уилкоксона) исходя из распределения данных (тест Колмогорова-Смирнова).

**Результаты.** Исследуемые гены разделили на 2 группы: 1) относящихся к сигналингу RTK-RAS-PI3K и 2) регулирующие клеточный цикл и апоптоз.

Обнаружено значительное количество возможных участков образования G4 в исследованных генах. В 1-й группе онкогенов (сигналинг RTK-RAS-PI3K) наибольшее процентное содержание гуаниновых нуклеотидов в G4 (%G в G4) отмечено для генов FGFR3 (42,6 %), AKT1 (42,5 %) а наименьшее – для PIK3CA (32,1 %). Во 2-й группе генов (клеточный цикл и апоптоз) наибольшее значение %G в G4 отмечено для генов CCND1 (39,2 %) и TP53 (36,8%).

**Выводы:** Высокое процентное содержание гуаниновых нуклеотидов в G4, отмеченное для генов группы 1 - FGFR3, AKT1 и генов группы 2 – CCND1 и TP53 может свидетельствовать:

- 1) о чувствительности этих генов к концентрации внутриклеточных моно- и дивалентных ионов как показателя внутриклеточного энергетического статуса,
- 2) о потенциально большем риске возникновения мутаций в этих генах, инициирующих опухолевый рост.

### Список литературы

1. Ying H. Diagnostic value of quantification of circulating free DNA for gall bladder cancer using a chemiluminescence DNA biosensor system based on DNA G-quadruplex / hemin enzyme / H. Ying [et al] // *Transl Oncol.* – 2021. – Vol 14, №1. – P. 100928.



**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ НА  
РАННИХ СТАДИЯХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО НА  
ОСНОВАНИИ КОМПЛЕКСНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ СУFRA  
21-1 И РЕЦЕПТОРОВ CXCR1, CXCR2, CD44V6 В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ**

**Ковганко Н.Н.,**

*к.х.н., доцент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

**Таганович А.Д.,**

*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет*

**Мурашко Д.И.,**

*ассистент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

**Колб А.В.,**

*к.б.н., доцент кафедры биологической химии  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

**Прохорова В. И.**

*д.м.н., профессор, заведующая  
диагностической лабораторией с группой лучевой диагностики  
государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь,*

*Vprohorova@mail.ru;*

**Державец Л. А.**

*д.б.н., заведующая клинично-  
диагностической лабораторией, государственного учреждения  
«Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской  
радиологии им. Н.Н. Александрова г. Минск, Беларусь,*

*l-dzerzhavets@mail.ru;*

**Цырусъ Т. П.**

*к.б.н., ведущий научный сотрудник  
диагностической лаборатории с группой лучевой диагностики  
государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова г. Минск, Беларусь,*

*toma\_minsk@mail.ru;*

**Готько О.В.**

*научный сотрудник диагностической лаборатории с группой  
лучевой диагностики  
babuka\_05@mail.ru.*

*mikalai44@tut.by; ataganovich@gmail.com; vprohorova@mail.ru*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*sherstyanoymurovei@mail.ru, sanya.kolb@yandex.by, babuka05@mail.ru;*

*По итогам годовичного наблюдения и графического анализа Каплана-Майера определены группы низкого (I ст. G1-2 + II ст. G1) и высокого (I ст. G3 + II ст. G2-3) риска прогрессирования опухоли. По результатам логистического регрессионного анализа построено уравнение, расчет которого позволяет прогнозировать риск рецидива опухоли.*

**Ключевые слова:** *немелкоклеточный рак легкого; кровь; прогрессирование*

**PREDICTION OF THE RISK OF TUMOR PROGRESSION AT EARLY STAGES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER BASED ON COMPREHENSIVE DETERMINATION OF CYFRA 21 1 AND RECEPTORS CXCR1, CXCR2, CD44v6 IN BLOOD PATIENTS**

***Kauhanka M. M.,***

*candidate of chemical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

***Murashka D.I.,***

*assistant of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

***Tahanovich A. D.,***

*doctor of medical sciences., professor,  
head of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

***Prokhorova V. I.,***

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the diagnostic  
laboratory with the radiation diagnostics group of the state institution  
"Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical  
Radiology named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,*

*Vprohorova@mail.ru;*

***Gotko O.V.,***

*researcher of the diagnostic laboratory with the radiation  
diagnostics group,  
state institution "Republican Scientific  
and Practical Center of Oncology and Medical Radiology  
named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,*

*babuka\_05@mail.ru.*

***Derzhavets L. A.,***

*Doctor of Biological Sciences, Head of the clinical and diagnostic  
laboratory, state institution "Republican Scientific and Practical  
Center of Oncology and Medical Radiology named after  
N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,*

*mikalai44@tut.by; ataganovich@gmail.com; vprohorova@mail.ru*

*sherstyanoymurovei@mail.ru, sanya.kolb@yandex.by, babuka05@mail.ru;*

*Based on the results of one-year observation and graphic analysis of Kaplan-Meier, groups of low (grade I G1-2 + grade II G1) and high (grade I G3 + grade II G2-3) risk of tumor progression were identified. Based on the results of logistic regression analysis, an equation was constructed, the calculation of which allows predicting the risk of tumor recurrence.*

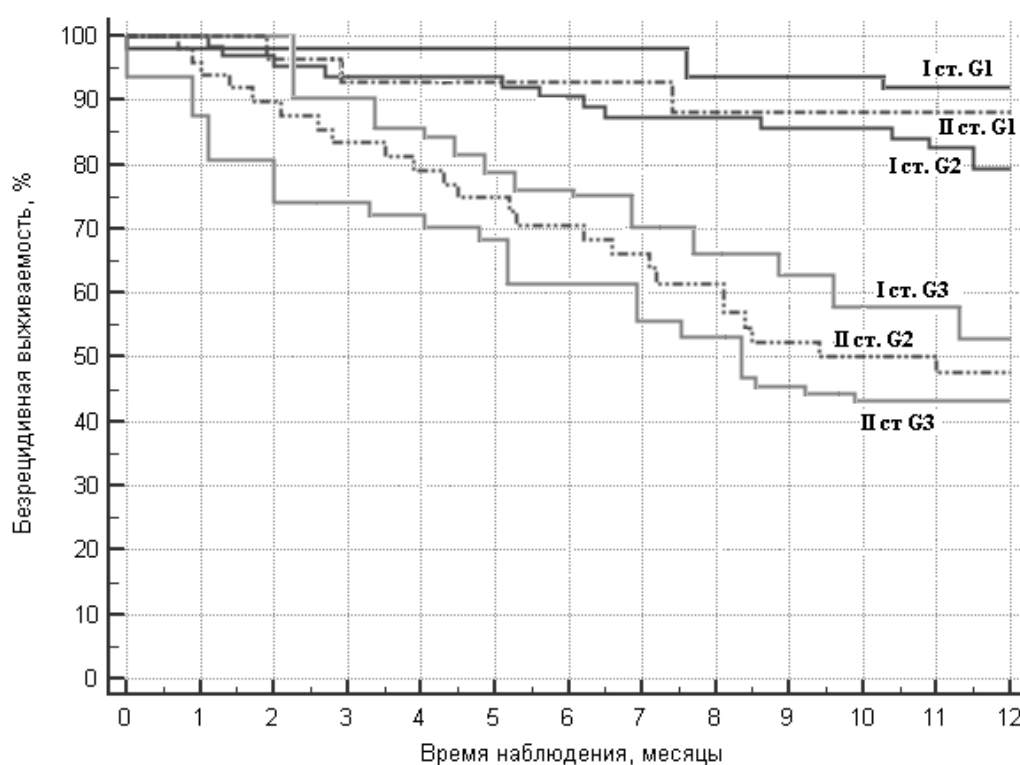
**Key words:** *non-small cell lung cancer; blood; progression*

**Актуальность.** У пациентов с I стадией НМКРЛ 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 [1]. Это свидетельствует о разном течении этого заболевания в пределах одной стадии. Есть необходимость в разработке прогностических показателей, которые бы позволяли предсказывать прогрессирование опухолевого процесса у пациентов на ранних стадиях развития опухоли с тем, чтобы правильно построить стратегию и тактику их лечения [2-5].

**Цель исследования:** выяснить и обосновать возможность использования лабораторных показателей, характеризующих уровень белков крови - участников канцерогенеза в прогнозе прогрессирования НМКРЛ у пациентов с ранними стадиями этого заболевания.

**Материалы и методы.** У 1250 пациентов (839 мужчин и 411 женщин), у которых впервые был диагностирован НМКРЛ в ранних стадиях (I и II), анализировалась длительность безрецидивного периода после проведенного лечения по результатам наблюдения в течение одного года. У 103 пациентов (56±22,5 лет) определяли уровень CYFRA 21-1, SCC, TPA, M2 пируваткиназы, хемокинов CXCL5, 8, концентрацию HIF1α и гиалуроновой кислоты иммуноферментным методом, рецепторов CXCR1,2, CD44v6 – методом проточной цитометрии. У 62 была I стадия (G1 - 20, G2 – 23, G3 – 19 человек). У 41 пациента была II стадия (G1 - у 14, G2 – у 15 и G3 – у 12 человек).

**Результаты.** По итогам одногодичного наблюдения и графического анализа Каплана-Майера определены группы низкого (I ст. G1-2 + II ст. G1) и высокого (I ст. G3 + II ст. G2-3) риска прогрессирования опухоли.



**Рисунок.** Безрецидивная выживаемость пациентов с НМКРЛ в зависимости от стадии и степени дифференцировки раковых клеток

У пациентов с высоким риском по сравнению с - низким больше был уровень CYFRA 21-1, интенсивность флуоресценции (MFI) рецептора CXCR1 в гранулоцитах, относительное содержание рецептора CXCR2 в лимфоцитах и рецептора CD44v6 в моноцитах ( $p < 0,05$ ). Все эти параметры имеют корреляционную связь с риском прогрессирования опухоли. С их участием по результатам логистического регрессионного анализа построено уравнение, расчет которого позволяет прогнозировать риск рецидива опухоли.

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

**Рисунок.** Уравнение логистической регрессии для предсказания развития опухолевой прогрессии у пациентов с НМКРЛ.

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;  $\exp (\approx 2,718)$  – основание натурального логарифма; «- 0,728» – константа логистического уравнения.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Пороговое значение уравнения - 0,467. Чувствительность модели построения прогноза - 84,8, специфичность - 84,2, прогностическая ценность положительного результата – 81,2%, отрицательного результата – 87,3%.

**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 НМКРЛ на ранних стадиях заболевания с целью оценки у них риска прогрессирования опухоли.

**Список литературы**

1. Howlader N., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016: Table 15.14 NonSmall Cell Cancer of the Lung and Bronchus (Invasive). National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2018 / Howlader N., Noone A.M., Krapcho M., et al. (<http://seer.cancer.gov/csr/2018>).
2. Katsunari M., Prognostic value of carcinoembryonic antigen and CYFRA21-1 in patients with pathological stage I non-small cell lung cancer/ Katsunari M., Shinichi S., Nariyasu N., et al. // *Eur. J. Cardiothoracic Surg.* 2007 – Vol. 3, № 3 – P. 435-439.
3. Zamay T. N., Current and prospective protein biomarkers of lung cancer / Zamay T. N., Zamay G. S., Kolovskaya O. S., et al. // *Cancers.* 2017 – Vol. 9, № 11 – 155.
4. Nolen B.M., Serum biomarker profiles as diagnostic tools in lung cancer / Nolen B.M., Langmead C.J., Choi S. et al. // *Cancer Biomark.*, 2011-2012 – Vol. 1, № 1 – P. 3-12.
5. Pujol J.L., CYFRA21-1 is a prognostic determinant in non-small cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients / Pujol J.L., Molinier O., Ebert W., et al. // *Br. J. Cancer.* 200 – Vol. 90, № 11 – P. 2097-2105.

**УРОВЕНЬ РЕЦЕПТОРА CXCR2 У ПАЦИЕНТОВ С  
АДЕНОКАРЦИНОМОЙ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО.  
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

**Ковганко Н.Н.,**

*к.х.н., доцент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

**Таганович А.Д.,**

*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет*

**Мурашко Д.И.,**

*ассистент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

**Герасименко А. М.,**

*студент 3-го курса УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Постоялко С. А.,**

*студент 3-го курса УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Прохорова В.И**

*д. м. н., профессор, заведующая  
диагностической лабораторией с группой лучевой диагностики*

*государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр онкологии и медицинской радиологии*

*им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь,*

*Vprohorova@mail.ru;*

**Державец Л. А.**

*д. б. н., заведующая клинико-*

*диагностической лабораторией, государственного учреждения*

*«Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской  
радиологии им. Н.Н. Александрова г. Минск, Беларусь,*

*l-dzerzhavets@mail.ru;*

**Готько О.В.**

*научный сотрудник диагностической лаборатории с группой  
лучевой диагностики*

*babuka\_05@mail.ru.*

*ataganovich@gmail.com; vprohorova@mail.ru*

*mikalai44@tut.by; babuka05@mail.ru;*

*dzerzhavets@gmail.com; sherstyanoymurovei@mail.ru.*

*С помощью ROC-анализа показано, что содержание в крови лимфоцитов,  
снабженных рецептором CXCR2, имеет диагностическое значение.  
Рассчитанные пограничные значения этих показателей позволяют не только*

*подтвердить наличие у пациента немелкоклеточного рака легкого, но отличить ранние и поздние стадии аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого, а также I и II стадии заболевания.*

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого; кровь; CXCR2

**CXCR2 RECEPTOR LEVEL IN PATIENTS WITH  
ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL LUNG CANCER.  
DIAGNOSTIC VALUE DEFINITION**

**Kauhanka M. M.,**  
*candidate of chemical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Murashka D.I.,**  
*assistant of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Tahanovich A. D.,**  
*doctor of medical sciences., professor,  
head of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Herasimenka A. M.,**  
*3<sup>rd</sup> year student, Belarusian State Medical University,*

**Postoyalka S. A.,**  
*3<sup>rd</sup> year student, Belarusian State Medical University*

**Prokhorova V. I.**  
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the diagnostic  
laboratory with the radiation diagnostics group of the state institution  
"Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical  
Radiology named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,  
Vprohorova@mail.ru;*

**Gotko O.V.,**  
*researcher of the diagnostic laboratory with the radiation  
diagnostics group,  
state institution "Republican Scientific  
and Practical Center of Oncology and Medical Radiology  
named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,  
babuka\_05@mail.ru;*

**Derzhavets L. A.,**  
*Doctor of Biological Sciences, Head of the clinical and diagnostic  
laboratory, state institution "Republican Scientific and Practical  
Center of Oncology and Medical Radiology named after  
N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,  
ataganovich@gmail.com; vprohorova@mail.ru*

*mikalai44@tut.by; babuka05@mail.ru;  
dzerzhavets@gmail.com; sherstyanoymurovei@mail.ru.*

*Using ROC-analysis, it was shown that the content of lymphocytes in the blood, supplied with the CXCR2 receptor, has the diagnostic value. The calculated borderline values of these parameters allow not only to confirm the presence of non-small cell lung cancer in a patient, but to distinguish between early and late stages of adenocarcinoma and squamous cell lung cancer, as well as stages I and II of the disease.*

**Key words:** *non-small cell lung cancer; blood; CXCR2*

В настоящее время отсутствуют информативные показатели в крови, которые позволили бы эффективно судить о наличии и распространенности немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ).

Рост и развитие опухоли неизменно сопровождается воспалительная реакция. Она включает в себя инфильтрацию иммунными клетками и привлечение сигнальных молекул (цитокинов и хемокинов) в зону роста опухоли. CXCL5 относится к ангиогенным CXС-хемокинам, индуцирующим хемотаксис иммунных клеток в воспалительный очаг. Связываясь с рецептором CXCR2, экспрессирующимся клетками опухолевой ткани и лейкоцитами периферической крови, CXCL5 способствует опухолевому росту, ангиогенезу и метастазированию опухоли.

**Цель.** Изучить количественные взаимоотношения концентрации рецептора CXCR2 в крови пациентов с аденокарциномой (АК) и плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ). Определить их диагностическую значимость у пациентов с НМКРЛ.

**Материалы и методы.** Обследовано 109 пациентов с ПКРЛ и 94 пациента с АК при первом поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период 2019-2021 гг. В качестве группы контроля обследовано 40 здоровых человек в возрасте 43-67 лет. Дополнительная группа сравнения включала 13 пациентов с доброкачественной опухолью легкого – гамартомой.

Кровь из локтевой вены испытуемых собирали натошак в вакутайнер с ЭДТА-К2 (Improvacuter, КНР). Для получения сыворотки кровь собирали в пробирку с тромбином и разделительным гелем (Improvacuter, КНР). Определение рецептора CXCR2 в клетках крови осуществляли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни для оценки различий между двумя независимыми группами. О взаимосвязи между показателями и характеристиками опухоли судили на основании расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Критическое значение уровня значимости принимали равным 5%.



Оценку информативности биохимических тестов проводили с помощью построения ROC–кривых, вычисления площади под ними (AUC), а также расчета диагностической чувствительности (ДЧ) и специфичности (ДС) для соответствующих пороговых значений.

**Результаты.** Доля лимфоцитов, снабженных рецептором CXCR2 и плотность расположения CXCR2 в лимфоцитах и моноцитах пациентов с АК и ПКРЛ значительно превышает таковую у здоровых людей и пациентов с гамартомой. Доля лимфоцитов с CXCR2 существенно увеличена у пациентов уже с I стадией обоих гистологических типов НМКРЛ и еще более возрастает в дальнейшем. Корреляционный анализ подтвердил наличие связи средней силы этого показателя со стадиями АК и ПКРЛ. Вне зависимости от гистологического типа НМКРЛ значения этого показателя существенно выше у пациентов с большим размером опухоли (в группе T>5 см медиана и интерквартильный размах значений доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, показателя равны 24,9 [24,8; 27,8] и 34,3 [26,8; 41,3] при ПКРЛ и АК соответственно, у пациентов с T<5 см - 21,2 [16,3;25,9] и 21,6 [15,2;24,3], соответственно), метастазами в регионарные лимфоузлы (в группе N1-3 медиана и интерквартильный размах равны 25,4 [23,8; 71,2] и 22,5 [22,3; 34,3] при ПКРЛ и АК соответственно, у пациентов с N0 - 21,2 [17,3; 24,9] и 16,8 [11,7; 22,5], соответственно) и внутренние органы (в группе M0 медиана и интерквартильный размах равны 24,9 [24,8; 27,8] и 34,3 [26,8; 41,3] при ПКРЛ и АК соответственно, у пациентов с M1 - 34,4 [25,4; 34,8] и 30,6 [26,8; 34,3], соответственно). Относительное содержание в крови лимфоцитов, снабженных CXCR2, равное 15,2%, позволяет отличить I от II стадии НМКРЛ с 51,2% чувствительностью и 98,7% истинно отрицательного результата. Значения этого же показателя больше, чем 9,5%, но меньше 22,5% соответствуют ранним стадиям АК и ПКРЛ (чувствительность – 97,1%, специфичность –52,4%). Для 78,9% пациентов с поздними стадиями НМКРЛ характерно относительное содержание лимфоцитов, снабженных CXCR2, превышающее 22,5% (специфичность 84,4%).

**Заключение.** Определение доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, имеет диагностическое значение. Рассчитанные пограничные значения этого показателя позволяют не только подтвердить наличие у пациента НМКРЛ, но отличить ранние и поздние стадии АК и ПКРЛ, а также I и II стадии заболевания.

### Список литературы

1. Ferlay J., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, Bray F. // Int. J. Cancer. 2015. – Vol. 136, № 5. – E359–386.
2. Molina R., Usefulness of serum tumor markers, including progastrinreleasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology / R. Molina, J.M. Auge,

X. Bosch, J.M. Escudero, N. Vinolas, R. Marrades, J. Ramirez, E. Carcereny, X. Filella. // *Tumor Biol.* 2009. – Vol. 30, № 3. – P. 121–129.

3. DeCotiis C., Inflammatory cytokines and non-small cell lung cancer in a CT-scan screening cohort: background review of the literature / C. DeCotiis, Y. Hu, A.K. Greenberg, M. Huie, J-C.J. Tsay, H. Pass, J.D. Goldberg, W.N. Rom // *Cancer Biomarkers.* 2016. – Vol.16, № 2. – P. 219-233.

4. Chen L., Prognostic value of circulating inflammatory factors in nonsmall cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis / L. Chen, Y. Zubin, G. Wei, L. Qingyun, W. Yanan, L. Yafei, B. Li // *Cancer Biomark.* 2014. – Vol.14, № 6. – P. 469-481.

5. Woodard G. Lung cancer staging and prognosis. *Cancer Treat Res.* 2016. – Vol. 170. – P. 47–75. 6. Sylman J.L., The predictive value of inflammation-related peripheral blood measurements in cancer staging and prognosis / J.L. Sylman, A. Mitrugno, M. Atallah, G.W. Tormoen, J.J. Shatzel, S.T. Yunga, T.H. Wagner, J.T. Leppert, P. Mallick, O.J. T. McCarty // *Front. Oncol.* 2018. – Vol. 21, № 8 – P. 78-86.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ  
АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛ И РЕТИНОИДЫ, НА УРОВЕНЬ  
ФОСФОЛИПИДОВ СУРФАКТАНТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
ГИПЕРОКСИИ**

**Котович И.Л.,**

*к.м.н., доцент кафедры биологической химии, УО «Белорусский  
государственный медицинский университет»,*

**Рутковская Ж.А.,**

*к.м.н., доцент кафедры биологической химии УО «Белорусский  
государственный медицинский университет»,*

**Таганович А.Д.,**

*д.м.н, профессор, зав. кафедрой биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

*Минск, Беларусь*

*В условиях эксперимента впервые показано, что ингаляционное введение липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол, эффективно нормализует уровень сурфактантных фосфолипидов на фоне относительно непродолжительной гипероксии (3 суток). Ингаляционное введение липосом, содержащих ретинол и ретиноевую кислоту, в условиях гипероксии способствует выраженному увеличению уровня фосфолипидов в бронхоальвеолярной жидкости.*

**Ключевые слова:** Легкие; гипероксия; фосфолипиды; липосомы;  $\alpha$ -токоферол; ретиноиды

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF LIPOSOMES  
CONTAINING ALPHA-TOCOPHEROL AND RETINOIDS ON THE LEVEL  
OF SURFACTANT PHOSPHOLIPIDS IN EXPERIMENTAL HYPEROXIA**

**Katovich I.L.,**

*candidate of medical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry*

**Rutkovskaya Zh.A.,**

*candidate of medical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry*

**Tahanovich A.D.,**

*doctor of medical sciences, professor, head of the department  
of biological chemistry*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

*Under experimental conditions, it was shown for the first time that inhalation of liposomes containing  $\alpha$ -tocopherol effectively normalizes the level of surfactant phospholipids under the relatively short-term hyperoxia (3 days). Inhalation of liposomes containing retinol and retinoic acid in hyperoxia promotes a pronounced increase in the level of phospholipids in the bronchoalveolar fluid.*

**Key words:** Lungs; hyperoxia; phospholipids; liposomes;  $\alpha$ -tocoferol; retinoids

Зрелость системы легочного сурфактанта играет важную роль в предотвращении развития респираторного дистресса у новорожденных и бронхолегочной дисплазии. Недостаточность сурфактанта у недоношенных новорожденных является одним из факторов, способствующих развитию патологии легких, а выхаживание таких новорожденных с использованием высоких концентраций кислорода во вдыхаемой смеси провоцирует усиление продукции активных форм кислорода, что на фоне дефицита антиоксидантов является дополнительным фактором, способствующим окислительному повреждению клеточных и молекулярных структур в альвеолярном пространстве [1]. В связи с этим актуальным является изучение возможности усиления синтеза и секреции эндогенного сурфактанта, а также защиты его компонентов от окислительного повреждения в легких в условиях гипероксии.

Природные антиоксиданты, в частности витамины Е ( $\alpha$ -токоферол) и А (ретинол), являются важными компонентами локальной системы антиоксидантной защиты в легких, включаются альвеолоцитами II типа в состав легочного сурфактанта и защищают его ненасыщенные липидные фракции от повреждения оксидантами [2]. Витамин А, помимо антиоксидантных свойств, имеет важное значение для процессов созревания легких, формирования альвеол, синтеза и секреции компонентов сурфактанта [3]. Возможность коррекции фосфолипидного состава сурфактанта путем ингаляционного введения этих антиоксидантов у новорожденных ранее не изучалась. По нашему мнению, ингаляционный путь является предпочтительным при необходимости доставки препаратов непосредственно в легкие, а его неинвазивность повышает возможности его применения у новорожденных. Учитывая липофильную природу ретинола и  $\alpha$ -токоферола, а также невозможность использования органических растворителей для их солюбилизации для применения *in vivo*, мы сочли наиболее рациональным подходом приготовление липосомных форм данных препаратов для их введения ингаляционным путем.

Цель исследования – изучить влияние липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол и ретиноиды, при ингаляционном введении на фосфолипидный состав сурфактанта в условиях экспериментальной гипероксии.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили с соблюдением этических норм и правил работы с лабораторными животными. При проведении исследования использовались новорожденные морские свинки вивария БГМУ. Животные контрольных групп дышали обычным воздухом, животных из групп «гипероксия» в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70% (температура 20-25°C, относительная влажность 50-80%). Длительность наблюдения составляла 3 и 14 суток. Контрольные животные дышали обычным воздухом. Каждая экспериментальная группа включала 8-10 животных.

Для ингаляционного введения липосом использовали компрессорный небулайзер Comp Air (NE-C28-E, Omron, Китай). Ингаляции проводили 1 раз в два дня. Липосомы готовили стандартным методом механического диспергирования, в качестве основного липидного компонента использовали дипальмитоилфосфатадилхолин (ДПФХ). В группе «гипероксия +  $\alpha$ -токоферол» для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь многослойных липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол (12,5 мг/кг), ДПФХ (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. Группа «гипероксия + ретиноиды» получала ингаляции свежеприготовленных многослойных липосом, содержащих ретинол (6 мг/кг), ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг), дипальмитоилфосфатадилхолин (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4. Для анализа влияния основного компонента липосом (ДПФХ) на изучаемые показатели были сформированы отдельные группы животных (n=4 в каждом сроке наблюдения), которые получали ингаляции «пустых» липосом, не содержащих витамины.

По окончании эксперимента животных наркотизировали и получали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (БАЛЖ) для исследования. В бесклеточном супернатанте БАЛЖ определяли общий белок (по Лоури) и основные фракции сурфактантных фосфолипидов – фосфатадилхолин (ФХ) и его преобладающую форму в сурфактанте – динасыщенный фосфатадилхолин (ДНФХ); суммарную фракцию фосфатадилэтаноламина (ФЭА), включающую также фосфатадилглицерол, фосфатадилинозитол и фосфатадилсерин; сфингомиелин (СМ); лизофосфатадилхолин (лизоФХ). Липиды разделяли методом двумерной тонкослойной хроматографии и проводили количественный учет фракций по содержанию липидного фосфора.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 10,0. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический тест Манна-Уитни для независимых выборок. Отличия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (25% - 75%).

**Результаты и обсуждение.** Введение липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол, на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) сопровождалось нормализацией уровня всех фракций фосфолипидов в БАЛЖ, о чем свидетельствует отсутствие достоверных отличий показателей с соответствующей группой «контроль» (таблица 1). Введение липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол, на фоне длительной гипероксии (14 суток) характеризовалось сохранением низкого уровня СМ, суммарного ФХ, ДНФХ и общего липидного фосфора в БАЛЖ новорожденных морских свинок.

Введение липосом, содержащих ретиноиды, на фоне непродолжительной гипероксии (3 суток) сопровождалось увеличением уровня фосфолипидов в БАЛЖ, которое было еще более выраженным, чем у животных, подвергавшихся изолированному действию гипероксии: в этой группе уровень суммарного

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

фосфатидилхолина превышал уровень контроля на 235% (в группе «гипероксия» увеличение составляло 98%), дианасыщенного фосфатидилхолина – на 307% (в группе «гипероксия» – 115%), различия с группой «гипероксия» статистически достоверны; отмечался также рост уровня фосфатидилэтаноламина на 76% ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем). Введение липосом, содержащих ретиноиды, на фоне длительной гипероксии (14 суток) препятствовало снижению уровня фосфолипидов в БАЛЖ, которое наблюдалось при действии изолированной гипероксии. В целом показатели всех фракций фосфолипидов в этой группе приближались к значениям в группе контроля и достоверно от них не отличались.

При введении «пустых» липосом на фоне гипероксии достоверных изменений уровней фосфолипидов в БАЛЖ по сравнению с соответствующими группами «гипероксия» выявлено не было.

**Таблица 1.** – Содержание фосфолипидов в БАЛЖ новорожденных морских свинок, подвергавшихся гипероксии, при ингаляционном введении липосом с ретиноидами и  $\alpha$ -токоферолом

Показатель	Контроль	Гипероксия	Гипероксия + ретиноиды	Гипероксия + $\alpha$ -токоферол
Срок наблюдения 3 суток				
ЛизоФХ	18,5 (4,1 – 29,6)	0 (0 – 39,7)	53,8 (15,3 – 82,9)	52,1 (16,8 – 68,9)
СМ	11,3 (1,0 – 39,7)	11,0 (0 – 17,5)	27,3 (1,0 – 52,9)	30,7 (12,7 – 33,9)
ФЭА	97,9 (60,6 – 142,5)	97,2 (57,8 – 181,8)	172,2 (150,2 – 228,6)*	129,9 (110,7 – 140,9)
ДНФХ	220,2 (121,7–301,1)	473,6 (352,4 – 513,1)*	897,2 (726,7 – 960,5)*^#	345,2 (266,2 – 482,1)
ФХ сумм.	406,3 (293,5 – 514,7)	805,0 (598,2 – 978,4)*	1362,9 (881,5 – 1547,7)*^#	557,4 (466,4 – 632,3)
ОЛФ	538,1 (388,2 – 780,3)	981,4 (898,2 – 1235,2)*	1576,1 (1142,9 – 1817,3)*#	757,9 (721,2 – 831,6)
Срок наблюдения 14 суток				
ЛизоФХ	55,4 (19,4 – 70,7)	0 (0 – 20,1)*	43,4 (25,3 – 74,7)^	36,8 (30,5 – 43,1)^
СМ	74,5 (0 – 123,9)	0 (0 – 12,8)*	56,1 (48,6 – 72,0)^#	4,8 (0 – 6,0)*
ФЭА	190,5 (84,1 – 458,8)	37,5 (0 – 100,5)*	176,1 (163,2 – 183,8)^#	79,0 (65,6 – 92,4)

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

ДНФХ	811,1 (703,6 – 920,4)	295,1 (209,3 – 326,1)*	683,1 (610,4 – 736,2)^#	306,6 (256,1 – 422,4)*
ФХ сумм.	1300,4 (921,6 – 1645,6)	405,2 (311,2 – 749,2)*	977,5 (947,4 – 1087,3)^ #	437,2 (387,5 – 486,8)*
ОЛФ	1841,6 (932,5 – 2293,6)	539,3 (443,4 – 1016,2)*	1270,3 (1214,6 – 1370,6)^#	553,0 (483,6 – 622,4)*

Примечание – Содержание фосфолипидов представлено в нмоль фосфора/мг белка. ЛизоФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ДНФХ – динасыщенный фосфатидилхолин, ФХ сумм. – суммарная фракция фосфатидилхолина, ОЛФ – общий липидный фосфор. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «контроль»; ^ -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «гипероксия»; # -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «гипероксия + токоферол».

Обнаруженные эффекты согласуются с данными литературы о наличии у  $\alpha$ -токоферола противовоспалительных эффектов, проявляющихся *in vitro* и *in vivo* при относительно непродолжительном действии повреждающего агента [4, 5], однако при более пролонгированном действии гипероксии липосомы с токоферолом оказались неэффективными в плане предотвращения резкого снижения уровня сурфактантных фосфолипидов в БАЛЖ. Можно предположить, что для нормализации состава сурфактанта при гипероксии требуется наличие у препаратов не только антиоксидантных свойств. Эффект «заместительной терапии» при введении липосом, содержащих ДПФХ, также не был выявлен, что подтверждается отсутствием достоверных изменений показателей при введении «пустых» липосом на фоне гипероксии. В нашем исследовании впервые было показано, что ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом *in vivo* способствует достоверному увеличению уровня сурфактантных фосфолипидов в легких как при кратковременном, так и при продолжительном действии гипероксии, в отличие от  $\alpha$ -токоферола, что может быть обусловлено стимулирующим действием ретиноевой кислоты на синтез сурфактанта и пролиферацию клеток альвеолярного эпителия [3].

Таким образом, в условиях трехдневной гипероксии ингаляционное введение липосом, содержащих  $\alpha$ -токоферол, способствует нормализации уровня сурфактантных фосфолипидов в эксперименте, но не оказывает такого влияния при более продолжительном действии гипероксии (14 суток). Ингаляционное введение липосом с ретиноидами в условиях 3- и 14-суточной гипероксии сопровождается выраженным увеличением уровня фосфолипидов в легких новорожденных морских свинок.

**Список литературы**

1. Cienczewicki J. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases / J. Cienczewicki, S. Trivedi, S. R. Kleeberger // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2008. – Vol. 122, N. 3. – P. 456–470.
2. Kolleck I. Vitamin E as an antioxidant of the lung. Mechanisms of vitamin E delivery to alveolar type II cells / I. Kolleck, P. Sinha, B. Rustow // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2002. – Vol. 166. – P. S62 – S66.
3. George, U.M. Effect of tobacco extract on surfactant synthesis and its reversal by retinoic acid – role of cell–cell interactions in vitro / U.M. George, U. Ashna, S.S. Pradeep Kumar, A.M. Nandkumar // *In vitro Cell.Dev.Biol.- Animal*. – 2013. – Vol. 49. – P. 260-269
4. Ekstrand-Hammarstrom B. Vitamin E down-modulates mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- $\kappa$ B and inflammatory responses in lung epithelial cells / B. Ekstrand-Hammarstrom, C. Osterlund, B. Lillienhook, A. Bucht // *Clin. Experim. Immunol*. – 2006. – Vol. 147. – P. 359-369.
5. Hyberston B.M. Aerosol-administered  $\alpha$ -tocopherol attenuates lung inflammation in rats given lipopolysaccharide intratracheally / B.M. Hyberston, J.H. Chung, M.A. Fini, Y.M. Lee, J.D. Allard [et al.] // *Exp. Lung Res*. – 2005. – Vol. 31, N. 3. – P. 283-294.



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

## **ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ**

**Кочнева Е. М.**

*студентка V курса химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова  
г. Москва, Россия  
katerina80103@gmail.com;*

**Созарукова М. М.**

*к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории синтеза  
функциональных материалов и переработки минерального сырья Института  
общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук,  
г. Москва, Россия  
s\_madinam@bk.ru;*

**Проскурнина Е. В.**

*д. м. н., доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной  
биологии Медико-генетического научного центра имени академика  
Н.П. Бочкова, г. Москва, Россия  
proskurnina@gmail.com;*

*Перспективы биомедицинского применения наночастиц  $\text{CeO}_2$  делают необходимым анализ их взаимодействия с биомолекулами, в том числе с белками. Сывороточный альбумин человека (САЧ) является одним из наиболее важных белков плазмы крови и содержит в структуре природные флуорофоры — тирозин и триптофан. Целью работы был анализ влияния наночастиц  $\text{CeO}_2$  (3 нм) на флуоресцентные свойства САЧ. Получено дозозависимое снижение интенсивности флуоресценции белка в присутствии нанодисперсного диоксида церия. Рассчитаны константы Штерна-Фольмера и скорости тушения флуоресценции, а также параметры связывания (константа и число сайтов связывания).*

**Ключевые слова:** наночастицы диоксида церия; нанозимы; сывороточный альбумин человека; транспортные свойства; флуоресценция

## **FLUORESCENCE PROPERTIES OF HUMAN SERUM ALBUMIN IN THE PRESENCE OF CERIUM OXIDE NANOPARTICLES**

**Kochneva E. M.**

*5th year student of the Faculty of Chemistry  
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
katerina80103@gmail.com;*

**Sozarukova M. M.**

*Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory for the  
advanced materials synthesis and minerals processing  
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia  
s\_madinam@bk.ru;*

**Proskurnina E. V.**

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of  
Molecular Biology  
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia  
proskurnina@gmail.com;*

*The prospects of biomedical applications of CeO<sub>2</sub> nanoparticles make it necessary to analyze their interaction with biomolecules, including proteins. Human serum albumin (HSA) is one of the most important blood plasma proteins containing natural fluorophores — tyrosine and tryptophan. The aim of the work was to analyze the effect of CeO<sub>2</sub> nanoparticles (3 nm) on the fluorescent properties of HSA. A dose-dependent decrease in protein fluorescence intensity in the presence of cerium dioxide nanoparticles was obtained. The Stern-Volmer constant and fluorescence quenching rate constant, as well as binding parameters (binding constant and number of binding sites) were calculated.*

**Key words:** *cerium dioxide nanoparticles; nanozymes; human serum albumin; transport properties; fluorescence*

Наночастицы CeO<sub>2</sub> являются представителем нового класса нанозимов, неорганических материалов с ферментоподобной активностью. Перспективы биомедицинского применения нанодисперсного CeO<sub>2</sub> делают необходимым детальный анализ его взаимодействия с биомолекулами, в том числе с сывороточным альбумином человека (САЧ) [1]. САЧ выполняет в плазме множество функций, среди которых антиоксидантная и транспортная. В структуре САЧ находятся природные флуорофоры — тирозин и триптофан. Таким образом, целью работы был анализ флуоресцентных свойств сывороточного альбумина человека в присутствии наночастиц CeO<sub>2</sub>.

#### **Материалы и методы исследования.**

**Модификация наночастиц CeO<sub>2</sub> сывороточным альбумином человека.** В работе использовали золь CeO<sub>2</sub>, полученный термогидролизом водного раствора гексанитратоцерата(IV) аммония [2]. Готовили серию золь диоксида церия ( $c_{\text{исх.}} = 6.5$  мкМ), модифицированного САЧ ( $c_{\text{исх.}} = 65$  мкМ) [1]. Были получены золи САЧ: CeO<sub>2</sub> со следующими соотношениями компонентов (по молям): 1:1, 2:5, 1:5, 1:10 и 1:20.

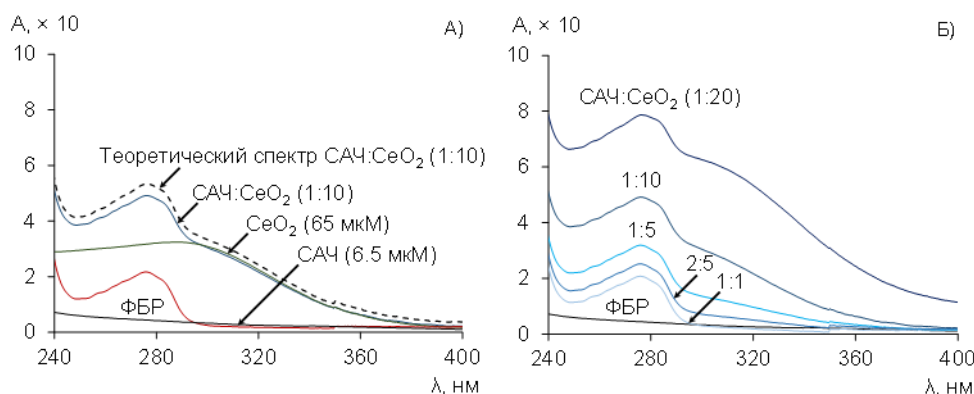
#### **Физико-химический анализ золь CeO<sub>2</sub>, модифицированных САЧ.**

Рентгенофазовый анализ наночастиц CeO<sub>2</sub> проводили с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (CuK $\alpha$ -излучение, геометрия  $\theta$ – $2\theta$ ). Для расшифровки рентгенограмм использовали банк данных ICDD PDF2. Концентрацию золя CeO<sub>2</sub> определяли термогравиметрическим методом. Средний гидродинамический диаметр частиц коллоидного раствора CeO<sub>2</sub> оценивали методом динамического рассеяния света с помощью анализатора Photocor Complex. Физико-химическое взаимодействие наночастиц CeO<sub>2</sub> с альбумином исследовали спектрофотометрическим и спектрофлуориметрическим методами. Для регистрации спектров поглощения золь CeO<sub>2</sub>, в том числе модифицированных САЧ, и индивидуального раствора

белка использовали спектрофотометр Cary 4000 (Agilent). Измерение флуоресценции исследуемых образцов проводили на приборе FluoroLog 3 (Horiba Jobin Yvon). По данным флуоресцентного анализа рассчитывали константы Штерна-Фольмера и скорости тушения флуоресценции, с помощью модифицированного уравнения Хилла — константу и число сайтов связывания нанодисперсного  $\text{CeO}_2$  с САЧ.

**Результаты и обсуждение.** В результате синтеза по методике, основанной на термогидролизе гексанитратоцерата(IV) аммония [2], был получен электростатически стабилизированный золь нанодисперсного диоксида церия. Концентрация полученного золя, по данным термогравиметрического анализа, составила 23 г/л (0.13 М по  $\text{CeO}_2$ ). Размер частиц  $\text{CeO}_2$ , определенный по соотношению Шеррера, был равен 3 нм. Величина среднего гидродинамического диаметра наночастиц  $\text{CeO}_2$  соответствовала 10–11 нм.

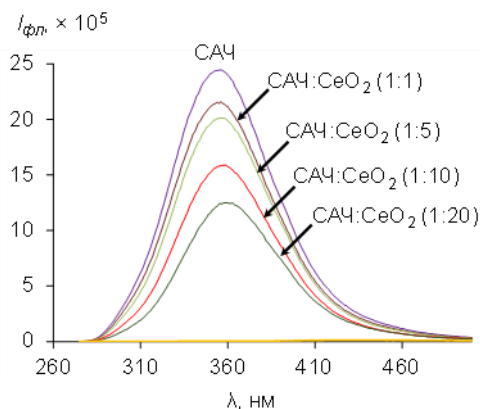
После синтеза и физико-химического анализа наночастиц  $\text{CeO}_2$  проводили функционализацию их поверхности сывороточным альбумином человека — основным белком плазмы крови. Спектры поглощения зольей  $\text{CeO}_2$ , в том числе модифицированных САЧ, и индивидуального белка приведены на рис. 1А, Б.



**Рисунок. 1.** А) Экспериментальные спектры поглощения золя  $\text{CeO}_2$ , в том числе модифицированного альбумином (САЧ: $\text{CeO}_2$ , 1:10, 6.5:65 мкМ), раствора индивидуального белка, и теоретический спектр золя САЧ: $\text{CeO}_2$  (1:10) (математическая сумма спектров 6.5 мкМ САЧ и 65 мкМ золя  $\text{CeO}_2$ ). Б) Спектры поглощения золя  $\text{CeO}_2$ , модифицированного САЧ в различных мольных соотношениях (САЧ: $\text{CeO}_2$  1:1, 1:5, 2:5, 1:10, 1:20).

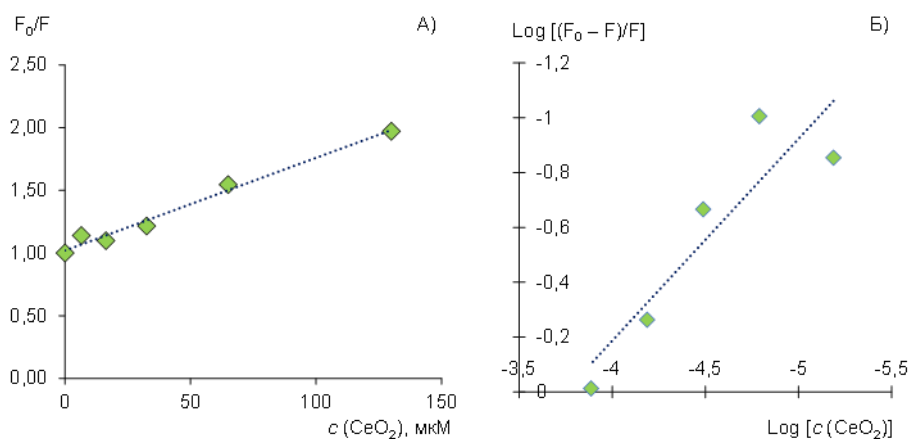
Спектр золя САЧ: $\text{CeO}_2$  (1:10) имеет максимум поглощения при длине волны, соответствующей амплитуде оптической плотности индивидуального раствора САЧ (275 нм), плечо на спектре обусловлено наночастицами  $\text{CeO}_2$  (рис. 1А). Это подтверждается теоретическим спектром золя САЧ: $\text{CeO}_2$  (1:10), являющегося математической суммой спектров немодифицированных наночастиц  $\text{CeO}_2$  и стабилизатора (рис. 1А). Полученные данные позволяют предположить функционализацию наночастиц  $\text{CeO}_2$  альбумином. Из рис. 1Б видно, что изменения спектров зольей САЧ: $\text{CeO}_2$  в зависимости от мольных соотношений отражают вклад нанодисперсного диоксида церия и белка.

Сывороточный альбумин человека содержит в своей структуре природные флуорофоры — тирозин и триптофан. Так, на следующем этапе работы регистрировали спектры флуоресценции зольей, выбранная длина волны возбуждения ( $\lambda_{ex} = 260$  нм), соответствовала тирозин-триптофановой флуоресценции САЧ (рис. 2).



**Рисунок 2.** Спектры флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 260$  нм) зольей САЧ:  $\text{CeO}_2$  в различных соотношениях (по молям).

Титрование САЧ при комнатной температуре различными концентрациями наночастиц  $\text{CeO}_2$  приводило к дозозависимому тушению флуоресценции белка. Зависимость снижения интенсивности флуоресценции САЧ от концентрации нанодисперсного  $\text{CeO}_2$  была построена в координатах Штерна-Фольмера и модифицированного уравнения Хилла (рис. 3А, Б).



**Рисунок 3.** Изменение флуоресценции САЧ ( $\lambda_{ex} = 260$  нм) при различных концентрациях наночастиц  $\text{CeO}_2$ , мкМ в координатах: А) Штерна-Фольмера ( $F_0/F = ((0.0074 \pm 0.0005) \times c (\text{CeO}_2, \text{мкМ}) + (1.02 \pm 0.06))$ ,  $r = 0.991$ ), Б) модифицированного уравнения Хилла ( $\text{Log} ((F_0 - F)/F) = (1.12 \pm 0.04) \times \text{Log} [c (\text{CeO}_2, \text{мкМ})] + (4.4 \pm 0.2)$ ).

С помощью полученных зависимостей были рассчитаны константы Штерна-Фольмера ( $K_{SV} = 7.39 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) и скорости тушения флуоресценции ( $k_q = 7.39 \times 10^{11} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ). Полученные данные позволили сделать

предположение о том, что снижение интенсивности аналитического сигнала альбумина при связывании с наночастицами  $\text{CeO}_2$  происходит по механизму статистического тушения. С использованием модифицированного уравнения Хилла были определены константа связывания ( $K_b = 5.73 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ) и число сайтов связывания ( $n = 0.74$ ). Полученные в настоящей работе значения параметров связывания отличаются от литературных данных. Это можно объяснить природой нанодисперсного диоксида церия, физико-химические характеристики (размер частиц, морфология,  $\zeta$ -потенциал и др.) которого, как известно, существенно зависят от метода синтеза и определяют его свойства.

**Заключение.** В настоящей работе исследовано влияние наночастиц  $\text{CeO}_2$  на флуоресцентные свойства одного из наиболее важных белков плазмы крови — сывороточного альбумина человека. Получено дозозависимое снижение интенсивности флуоресценции альбумина с увеличением концентрации золя  $\text{CeO}_2$  (3 нм) при длине волны возбуждения 260 нм. Рассчитанные значения константы Штерна-Фольмера и скорости тушения флуоресценции позволили предположить, что связывание белка с наночастицами  $\text{CeO}_2$  происходит по механизму статистического тушения. Выявлено, что на параметры связывания с белком оказывает влияние природа наночастиц  $\text{CeO}_2$ .

**Финансирование работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-00251).

#### Список литературы

1. Roudbaneh, S. Z. K. Albumin binding, antioxidant and antibacterial effects of cerium oxide nanoparticles / S. Z. K. Roudbaneh, et al. // *J. Mol. Liq.* — 2019. — V. 296. — P. 111–839.
2. Shcherbakov, A. B. Facile method for fabrication of surfactant-free concentrated  $\text{CeO}_2$  sols / A. B. Shcherbakov, et al. // *Mater. Res. Express.* — 2017. — V. 4, № 5. — P. 055008.
3. Добрецов, Г. Е. Альбуминовый флуоресцентный тест: результаты клинических исследований / Г. Е. Добрецов, Т. И. Сырейщикова, Н. В. Смолина, Г. В. Родоман, М. Г. Узбеков // *Эфферентная и физико-химическая медицина.* — 2009. — Т. 1. — С. 16–26.

**МАРКЕРЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ COVID-19  
АССОЦИИРОВАННЫХ ЛИМФАДЕНИТАХ**

**Людчик Т.Б.**

*к. м. н., доцент кафедры челюстно-лицевой хирургии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Беларусь  
tatyana.lud@mail.ru;*

**Артюшкевич А.С.**

*д.м.н.,*

*профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Беларусь  
ms.belmaro@mail.ru;*

**Степанова Ю.И.**

*к. м. н., доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Беларусь  
st.juli@tut.by;*

**Насибянец Н.В.**

*к. м. н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Беларусь  
natalia.nas@rambler.ru;*

**Матюшев Л.И.**

*врач отделения челюстно-лицевой хирургии учреждения здравоохранения «11-я клиническая больница г.Минска», г. Минск, Беларусь  
leonosh1991@gmail.com;*

**Перепелица М.С.**

*младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Беларусь  
perepelitsam@yandex.ru*

*В данной статье представлен анализ состояния углеводного обмена у пациентов с подтвержденной коронавирусной инфекцией COVID-19 и лимфаденитом челюстно-лицевой области. Изучали следующие маркеры маркеры углеводного метаболизма: уровень инсулина, глюкозы, гликированного гемоглобина, индекс инсулинорезистентности НОМА-IR. Установлено нарушение состояния углеводного обмена у пациентов с COVID-19 ассоциированным лимфаденитом без патологии углеводного метаболизма в анамнезе, что проявлялось развитием транзиторной гипергликемии и*

изменением инсулинорезистентности. Выявленные нарушения ведут к дисбалансу углеводного обмена и развитию не только транзиторной стрессовой гипергликемии, но и метаболического синдрома.

**Ключевые слова:** лимфаденит; коронавирусная инфекция; SARS-CoV-2; углеводный обмен; инсулинорезистентность; гликированный гемоглобин

## MARKERS OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN COVID-19 ASSOCIATED LYMPHADENITIS

**Lyudchik T.B.**

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Maxillofacial Surgery of the State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Belarus  
tatyana.lud@mail.ru;*

**Artyushkevich A.S.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Maxillofacial Surgery of the State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Belarus  
ms.belmapo@mail.ru;*

**Stepanova J.I.**

*I. Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, leading researcher of the research Laboratory of the State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Belarus  
st.juli@tut.by;*

**Nasibyants N.V.**

*Candidate of Medical Sciences, Leading researcher at the Research Laboratory of the State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Belarus  
natalia.nas@rambler.ru;*

**Matyushev L.I.**

*Doctor of the Department of Maxillofacial Surgery of the healthcare institution "11th Clinical Hospital of Minsk", Minsk, Belarus  
leonosh1991@gmail.com;*

**Perepelitsa M.S.**

*Junior Researcher at Research Laboratory of the State Educational Institution "Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Belarus  
perepelitcam@yandex.ru*

*This article presents an analysis of the state of carbohydrate metabolism in patients with confirmed coronavirus infection COVID-19 and lymphadenitis of the maxillofacial region. The following markers of carbohydrate metabolism were studied: the level of insulin, glucose, glycated hemoglobin, the HOMA-IR insulin resistance index. A violation of the state of carbohydrate metabolism was found in patients with COVID-19 associated lymphadenitis without a history of pathology of carbohydrate metabolism, which was manifested by the development of transient hyperglycemia and*

*changes in insulin resistance. The revealed disorders lead to an imbalance of carbohydrate metabolism and the development of not only transient stress hyperglycemia, but also metabolic syndrome.*

**Key words:** *lymphadenitis; coronavirus infection COVID-19; SARS-CoV-2; carbohydrate metabolism; insulin resistance; glycated hemoglobin*

Коронавирусная инфекция (COVID-19), вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, оказывает плеiotропное повреждающее действие на организм человека, что обусловлено цитотоксическим механизмом действия патогенного агента. Известно, что ангиотензинпревращающий фермент 2 типа (АПФ2), который экспрессируется в большинстве тканей, в том числе и в поджелудочной железе, является рецептором и «местом входа» в клетку для коронавирусов [1]. В настоящее время особенности патогенеза COVID-19 и влияния его на организм широко обсуждаются в отечественной и зарубежной литературе, поэтому представляет научно-практический интерес изучение состояния углеводного обмена при COVID-19 ассоциированных лимфаденитах.

**Цель** – изучить маркеры углеводного обмена у пациентов с COVID-19 ассоциированными лимфаденитами.

**Материалы и методы.** Обследовано 34 пациента с диагнозом острый лимфаденит челюстно-лицевой области, из них 18 женщин и 16 мужчин, средний возраст  $42,3 \pm 15,7$  г., которые были госпитализированы в отделение челюстно-лицевой хирургии 11-й ГКБ г. Минска. Основную группу составили 19 пациентов, у которых был диагностирован неodontогенный лабораторно подтвержденный COVID-19 ассоциированный лимфаденит; 15 чел. с неodontогенным серозным лимфаденитом не уточненной этиологии составили группу сравнения. Критерием включения в исследование явилось отсутствие сахарного диабета I, II типа, терапии стероидными препаратами в анамнезе. Все пациенты дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. В контрольную группу вошло 37 практически здоровых лиц, из них 21 женщина и 16 мужчин, средний возраст  $41,8 \pm 12,6$  лет. У всех пациентов на 7-10 сутки госпитализации определяли следующие показатели крови, взятой из кубитальной вены натошак: уровень инсулина, глюкозы и гликированного гемоглобина ( $HbA_{1c}$ ). Для комплексной оценки состояния углеводного обмена в качестве маркера инсулинорезистентности рассчитывали индекс НОМА-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance). Использовали количественные методы лабораторного исследования: иммуноферментный анализ проводили на анализаторе Ф300 («Витязь», РБ), фотометрический – на анализаторе Dialab (Австрия). Для статистического анализа полученных данных, представленных в виде медианы и интервала между 25 и 75 перцентилями, применяли программу Statistica 10.0.

**Результаты.** Группы пациентов были сопоставимы как по возрастному ( $p > 0,05$ ), так и по гендерному составу ( $p > 0,05$ ). В группе пациентов с острым неodontогенным серозным COVID-19 ассоциированным лимфаденитом при



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

осмотре наблюдался односторонний отек поднижнечелюстной области, пальпировался увеличенный болезненный лимфатический узел, не спаянный с окружающими тканями. В анамнезе пациенты болели или переболели COVID-19 (сроки развития лимфаденита от нескольких дней до месяцев после перенесенной коронавирусной инфекции).

У пациентов группы сравнения наблюдался острый неodontогенный (тонзиллогенный) серозный лимфаденит, при осмотре выявлялся односторонний отек в поднижнечелюстной области, пальпируется увеличенный болезненный лимфатический узел, не спаянный с окружающими тканями, кожные покровы физиологической окраски, в складку берутся, в анамнезе обычно 5-7 дней назад пациент перенес острую респираторную вирусную инфекцию, в полости рта воспалительных явлений нет, в области небной миндалины справа или слева имеется гиперемия и отёк, она увеличена в размерах, покрыта белесоватым налётом. Результаты исследования маркеров углеводного обмена в сыворотке крови у пациентов основной группы и группы сравнения представлены в таблице. У пациентов группы сравнения показатели углеводного обмена находились в пределах контрольных величин.

У пациентов основной группы наблюдалась гипергликемия на уровне 6,8 (5,9; 7,6) ммоль/л в сравнении как с данными группы сравнения ( $p_1=0,038$ ), так и относительно нормального уровня ( $p=0,025$ ). Содержание инсулина и индекс НОМА-IR у пациентов с COVID-19 составили соответственно 16,2 (11,4; 19,7) мкЕд/мл и 4,8 (3,9; 5,7) ед., что превышало соответствующие значения группы сравнения ( $p_1=0,021$  и  $p_1=0,031$  соответственно), а также нормальные величины.

**Таблица – Маркеры углеводного обмена в сыворотке крови у пациентов основной группы, группы сравнения и контроля, Ме (25%;75%)**

Показатель	Контрольная группа, n=37	Основная группа, n=19	p	Группа сравнения, n=15	$p_1$
Глюкоза, ммоль/л	5,2 (4,4; 6,1)	6,8 (5,9; 7,6)	0,025	5,9 (4,7; 6,8)	0,038
Инсулин, мкЕд/мл	10,2 (6,1; 14,0)	16,2 (11,0; 19,7)	0,012	11,4 (8,2; 14,8)	0,021
HbA <sub>1c</sub> , %	4,9 (4,2; 5,5)	5,5 (4,6; 6,0)	НЗ	5,0 (4,4; 5,8)	НЗ
НОМА-IR, ед.	2,6 (1,8; 3,7)	4,8 (3,9; 5,7)	0,001	3,1 (2,4; 4,5)	0,030

Примечания. HbA<sub>1c</sub> – гликированный гемоглобин, НОМА-IR – индекс инсулинорезистентности, p – достоверность различий между группами наблюдения и контролем,  $p_1$  – достоверность различий между данными основной группы и группы сравнения, НЗ – различия между группами незначимы

При COVID-19 ассоциированном лимфадените выявлено увеличение значений HOMA-IR до 4,8 (3,9; 5,7) ед., что отражает развитие инсулинорезистентности – снижения чувствительности инсулинозависимых клеток к действию инсулина с последующим нарушением метаболизма глюкозы. При этом повышается риск возникновения сахарного диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, нарушения обмена веществ и метаболического синдрома. Однако уровень HbA<sub>1c</sub> не отличался от такового в группе сравнения и находился в пределах контрольных значений. Это свидетельствует о преходящем характере гипергликемии у пациентов в основной группе наблюдения, так как гликированный гемоглобин является высокоспецифическим соединением гемоглобина с глюкозой, концентрация которого отражает среднее содержание глюкозы в крови за период до 2-3 месяцев. Так, в литературе, посвященной изучению потенциально возможного воздействия SARS-CoV-2 на углеводный обмен описаны случаи стрессовой гипергликемии на фоне COVID-19 [2].

Повреждающее действие SARS-CoV-2 сопровождается окислительным повреждением клеточных мембран, увеличением содержания активных форм кислорода и выбросом лизосомальных протеаз. Это может индуцировать апоптоз и пироптоз  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, и, в случае недостаточности компенсаторно-адаптивных процессов, гипергликемия может носить не только транзиторный характер [3]. Помимо прямого цитотоксического воздействия вследствие репликации вируса, возможно и опосредованное повреждение панкреатических  $\beta$ -клеток, обусловленное снижением экспрессии АПФ2 на их поверхности после проникновения в них SARS-CoV-2, что может провоцировать снижение функциональной активности панкреатической ткани [4]. Интернализация рецепторов АПФ-2 в сосудистой эндотелии способствует развитию эндотелиальной дисфункции и воспалению, что повышает риск развития атеросклероза и сахарного диабета [5].

**Заключение.** Установлено нарушение состояния углеводного обмена у пациентов с COVID-19 ассоциированным лимфаденитом без эндокринной патологии в анамнезе, что проявлялось развитием транзиторной гипергликемии и инсулинорезистентности. Выявленные нарушения могут вести к дисбалансу углеводного метаболизма и развитию не только транзиторной стрессовой гипергликемии, но и метаболического синдрома, что обуславливает необходимость дальнейшего изучения механизмов влияния COVID-19 на нейрогуморальную регуляцию метаболизма в организме человека.

### Список литературы

6. Liu F., Long X., Zhang B. et al. ACE2 Expression in Pancreas May Cause Pancreatic Damage After SARS-CoV-2 Infection// Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2020. – Vol. 18(9). P. 2128-2130.
7. Brufsky A. Hyperglycemia, hydroxychloroquine, and the COVID-19 pandemic// J. Med. Virol. – 2020. – Vol. 92(7). – P.770-775.

8. Iacobellis G., Penaherrera C.A., Bermudez L.E. et al. Admission hyperglycemia and radiological findings of SARS-CoV2 in patients with and without diabetes// *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2020. – Vol.164. – P.108-185.

9. Zou X., Chen K., Zou J. et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection// *Front Med.* – 2020. – Vol. 14(2). P.185-192.

10. South A.M., Diz D.I., Chappell M.C. COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences// *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2020. – Vol.318(5). – P. H1084-H1090.

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ИНДЕКСОВ РИТМОВ  
ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ ПРИ ПОТРЕБЛЕНИИ ПИЩИ**

**Чегрейко М. С.**

*выпускник биологического факультета Белорусского Государственного  
Университета, Минск*

**Люзина К. М.**

*доцент биологического факультета Белорусского Государственного  
Университета, Минск*

*liuzina@bsu.by*

*Рассматривается анализ электроэнцефалографических изменений во время эпизодов первой (условно-рефлекторной) и второй фазы пищеварения (по И. П. Павлову). В качестве потребляемой пищи использовали содержащие и не содержащие мясо продукты. Выявили следующие особенности изменения индексов ритмов электроэнцефалограммы: при потреблении не содержащей мясо пищи наблюдалось наибольшее изменение индекса тета-ритма, а при потреблении мясной пищи — индекса высокочастотного бета-ритма.*

**Ключевые слова:** *электроэнцефалограмма; индексы ритмов; мясная пища*

**ELECTROENCEPHALOGRAM RHYTHM INDEXES CHANGES TO  
FOOD CONSUMPTION**

**Chergeiko M. S**

*graduate of the Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk*

**Liuzina K. M.**

*associate Professor, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk*

*liuzina@bsu.by*

*The analysis of electroencephalographic changes during episodes of the first and second phases of digestion is considered. Meat-containing and non-meat-containing products were used as consumed food. With the consumption of non-meat food, the greatest change in the theta rhythm index was observed, and with the consumption of meat food, the index of the high-frequency beta rhythm.*

**Key words:** *electroencephalogram; rhythm indices; meat food*

По рекомендации методических руководств [1] испытуемым необходимо отказаться от приема пищи за пару часов до электроэнцефалографического обследования. Процесс приема продуктов питания связан с активацией вегетативной и соматической нервной системы, а также с формированием акцептора результата действия складывающейся функциональной системы потребления пищи, по П. К. Анохину [2]. Формирование представлений о приеме пищи или реальное потребление продуктов приводят к изменению активности нейронов коры больших полушарий, что сказывается на показателях электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Изменения частотно-амплитудных паттернов волн ЭЭГ в связи с активностью пищеварительной системы мало изучено в

научной литературе. Целью данной работы является исследование изменений электроэнцефалограмм добровольцев при потреблении продуктов питания, содержащих и не содержащих мясо.

В качестве испытуемых в исследовании принимали участие 8 здоровых студентов, 19-22 лет. Исследование проводили с применением комплекса «НС-ПсихоТест» (скрининг-тест пищевого поведения, стрессоустойчивость) [3]. Электроэнцефалограммы (биполярно в 8 симметричных отведениях, закрытые глаза) записывали на электроэнцефалографе «Нейрон-Спектр» производства фирмы «Нейрософт». Фоновая запись проводилась в состоянии голода (12 часов), далее доброволец образно представлял потребление продукта (1 этап), затем реально ощущал запах продукта (2 этап), и последняя запись (3 этап) производилась сразу же после потребления добровольцем продукта (после прекращения жевания и глотания). Мясо содержащий продукт – котлета по-киевски, не содержащая мясо пища – овощной салат с капустой.

Ни у одного из добровольцев не было выявлено нарушение пищевого поведения, в эксперименте участвовали люди с высокой степенью стрессоустойчивости (по результатам тестирования на «НС-ПсихоТест»). Все добровольцы ранее с аппетитом употребляли предложенные в эксперименте продукты. Анализируя полученные данные по ЭЭГ, можно отметить, что не всегда происходило одинаковое изменение частотно-амплитудных паттернов волн ЭЭГ при употреблении пищи, в зависимости от содержания мяса в ней. При образном представлении пищи преобладает высокочастотный бета-ритм и дельта-ритм, также происходит снижение индекса тета-ритма. Известно, что бета-ритм наиболее выражен при переходе от состояния покоя к состоянию напряжения и фокусировании внимания [4], что и происходило с добровольцами на первом этапе в состоянии натошак. Также на записях ЭЭГ можно наблюдать артефакты, полученные при сглатывании слюны во время представления потребления пищи. Так как добровольцы принимали участие в эксперименте на «голодный желудок», представление пищи без ее реального предъявления по результатам анализа ЭЭГ можно определить как мозговую фазу пищеварения по И. П. Павлову. Тета-ритм возникает в спокойном сонливом состоянии, однако он также связан с эмоциональным, умственным напряжением и поисковым поведением (стресс-ритм) [5]. Выраженность медленных частот (тета- и дельта-ритма) ЭЭГ на втором этапе может отражать адаптивные перестройки в функционировании мозга [6]. Последние исследования позволяют предположить, что тета-ритм ответственен за извлечение информации из долговременной памяти [7]. При анализе запаха не содержащей мясо пищи можно наблюдать увеличение амплитуды тета-ритма и уменьшение амплитуды дельта-ритма. При анализе запаха мясной пищи происходит увеличение индексов бета- и дельта-ритма. После потребления пищи в обоих случаях наблюдается снижение амплитуды альфа-ритма, возрастание амплитуды тета-ритма в случае с потреблением не содержащей мясо пищи. Анализ действия содержащей мясо пищи указывает на преобладание высокочастотного бета-ритма. Изменения

дельта-ритма в мозговой ткани под электродами на третьем этапе не выявили значимой связи с потребляемыми продуктами.

Таким образом изменения волн электроэнцефалографического сигнала, сопровождающие представления о еде или реальное потребление продуктов питания, указывают на возможность использования ЭЭГ методов для анализа аппетитивного поведения человека.

### Список литературы

1. Aminoff's Electrodiagnosis in Clinical Neurology - 6th Edition. E-Book. ISBN 9781455726769.
2. Анохин П. К. Очерки по физиологии функциональных систем. М.: Медицина, 1975. - 448 с.
3. Руководство пользователя НС-Психотест. NET программное обеспечение / РП10.02.003.000 «Нейрософт» – 2014. – 278 с.
4. Lee JH, Whittington MA, Kopell NJ. Top-down beta rhythms support selective attention via interlaminar interaction: a model. PLoS Comput Biol. 2013;9(8):e1003164. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003164. Epub 2013 Aug 8. PMID: 23950699; PMCID: PMC3738471.
5. Quaedflieg CWEM, Schneider TR, Daume J, Engel AK, Schwabe L. Stress Impairs Intentional Memory Control through Altered Theta Oscillations in Lateral Parietal Cortex. J Neurosci. 2020 Sep 30;40(40):7739-7748. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2906-19.2020. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32868459; PMCID: PMC7531551.
6. Wurm F, Ernst B, Steinhauser M. The influence of internal models on feedback-related brain activity. Cogn Affect Behav Neurosci. 2020 Oct;20(5):1070-1089. doi: 10.3758/s13415-020-00820-6. PMID: 32812148; PMCID: PMC7497542.
7. Деривативное электронное издание на основе печатного аналога: Мозг, познание, разум: введение в когнитивные нейронауки: в 2 ч. Ч. 1 / под ред. Б. Баарса, Н. Гейдж; пер. с англ. под ред. проф. В. В. Шульговского. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 541 с.

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ IL-10 КАК ФАКТОР РИСКА  
РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

**Макаревич В.В.,**

*ассистент кафедры биологической химии*

**Хотько Е. А.,**

*ассистент кафедры биологической химии*

*Белорусский государственный  
медицинский университет,*

*г. Минск, Беларусь*

*vasilinamkrvch@gmail.com*

*В статье приведен анализ взаимосвязи полиморфизма rs1800896 гена цитокинового рецептора интерлейкина-10 (IL-10) с риском развития хронической обструктивной болезни легких среди населения Республики Беларусь. При исследовании рассматривали пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и здоровых лиц, с учетом их статуса курения. В ходе работы показано наличие связи данного полиморфного локуса с развитием хронической обструктивной болезни легких.*

**Ключевые слова:** *хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ); полиморфизм; IL-10; курение*

**GENETIC POLYMORPHISM OF IL-10 AS A RISK FACTOR FOR  
DEVELOPING CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

**Makarevich V.V.**

*assistant of the department of biological chemistry*

**Khotko E. A.,**

*assistant of the department of biological chemistry*

*Belarusian State Medical University,*

*Minsk, Belarus*

*vasilinamkrvch@gmail.com*

*This article introduces the rs1800896 polymorphism of the cytokine receptor interleukin-10 (IL-10) gene with the risk of developing chronic obstructive pulmonary disease in residents of the Republic of Belarus. The study examined patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy people, taking into account their smoking status. In the course of the work, it was shown that this polymorphic locus is associated with the development of chronic obstructive pulmonary disease.*

**Keywords:** *chronic obstructive pulmonary disease (COPD); polymorphism; IL-10; smoking*

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – бронхолегочное прогрессирующее заболевание, характеризующееся ограничением воздушного потока в дыхательных путях, что может привести к летальному

исходу. Согласно данным ВОЗ ХОБЛ находится на одной из лидирующих позиций по распространенности в мире. Несмотря на разработку и внедрение новых методик для проведения диагностики и лечения заболевания, число пациентов с ХОБЛ продолжает расти [1-3]. По данным 2019 года в Республике Беларусь числились около 43 670 пациентов, страдающих ХОБЛ [4].

Развитие ХОБЛ сопровождается понижением уровня ряда противовоспалительных цитокинов, одним из которых является интерлейкин-10 (IL-10). Наиболее значимым является полиморфизм rs1800896 (A1082G) гена цитокинового рецептора IL-10. Он характеризуется заменой аденина (A) на гуанин (G) в промоторной области. Позиция промотора 1082 связана с негативной регуляцией продукции IL-2, повышенная экспрессия которого может стать причиной воспаления. Это позволяет предположить, что носительство аллели A влияет на усиление продукции IL-2 [5,6].

Принимая во внимание распространенность данного заболевания на территории Республики Беларусь и сложность его диагностики и лечения рассмотрение генного полиморфизма в контексте углубления имеющихся знаний о молекулярных механизмах развития ХОБЛ представляет высокую актуальность.

**Цель:** изучение ассоциации полиморфизма rs1800896 гена IL-10 с развитием ХОБЛ среди населения Республики Беларусь.

**Материалы и методы.** Для исследования был выбран следующий полиморфизм: rs1800896 (A1082G) гена IL-10, который характеризуется заменой аденина (A) на гуанин (G) в промоторной области гена.

Клиническое обследование и диагностика проводились базе учреждения здравоохранения «Минский консультационно-диагностический центр». Количество обследованных составило 190 человек, из которых 95 человек – пациенты с установленным диагнозом ХОБЛ, 95 – клинически здоровые лица, не имевшие в анамнезе патологии бронхолегочной системы и других хронических заболеваний. Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из лейкоцитов крови. Выделение ДНК осуществлялось с использованием набора NucleoSpin Blood для очистки ДНК из образцов крови согласно методике производителя (MACHERY-NAGEL, Германия). Полученные пробы ДНК хранились при температуре -20°C. Определение полиморфизма генов проводилось методом полимеразной цепной реакции «в реальном времени» с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322 («ДНК-Технология», РФ) с использованием TaqMan-зондов. Регистрация «дикой» или «мутантной» аллели проводилась с использованием программы q-PCR на основании появления флуоресценции не позже 32 цикла амплификации.

Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга провели с использованием пакета программ Microsoft Excel. Выборки сравнивали путем составления таблиц сопряженности и вычисления



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

критерия хи-квадрат. Риск развития ХОБЛ в зависимости от носительства аллели или генотипа оценивали с помощью показателя отношения шансов (ОШ). Значения доверительного интервала 95% (ДИ95%) не пересекали 1. Результаты считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ . Сила связи данного полиморфного локуса с развитием ХОБЛ оценивалась с помощью критерия Крамера (V) с использованием программы SPSS Statistics 23.

**Результаты и их обсуждение.** При анализе распределения частот генотипов полиморфизма rs1800896 IL-10 выявлено, что контрольная группа здоровых лиц (таблица 1) и группа пациентов с ХОБЛ (таблица 2) соответствует распределению Харди-Вайнберга, что указывает на репрезентативность исследуемых выборок.

**Таблица 1.** - Результаты теста Харди-Вайнберга для контрольной группы

Генотип	Здоровые лица	HWE	$\chi^2$	P
AA	21,0%	18,1%	1,36	0,2434 > 0,05
AG	43,2%	48,9%		
GG	35,8%	32,9%		

**Таблица 2.** - Результаты теста Харди-Вайнберга для пациентов с ХОБЛ

Генотип	Здоровые лица	HWE	$\chi^2$	P
AA	42,1%	37,9%	3,084	0,07904 > 0,05
AG	39,0%	47,3%		
GG	18,9%	14,7%		

Определена частота аллелей А и G и генотипов полиморфизма rs1800896 гена IL-10 в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц (таблица 3). Показано, что среди пациентов с ХОБЛ преобладают носители аллели А (30,8%) по сравнению с группой здоровых лиц (21,3%). Среди здоровых лиц преобладают носители аллели G (28,7%) по сравнению с пациентами с ХОБЛ (19,2%).

**Таблица 3.** - Частота аллелей и генотипов полиморфизма rs1800896 гена IL-10 у обследуемых лиц

Носительст во аллелей и генотипов	Пациенты с ХОБЛ, n (%)	Здоровые лица, n (%)	$\chi^2$	P	V	ОШ	95% ДИ
А	117 (30,8%)	81 (21,3%)	13,80	0,0002	0,19	2,16	1,43- 3,25

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

G	73 (19,2%)	109 (28,7%)				0,21	0,30- 0,70
AA	40 (42,1%)	20 (21,0%)	12,0	0,002	0,249	2,72	1,43- 5,17
AG	37 (39,0%)	41 (43,2%)				0,84	0,47- 1,49
GG	18 (18,9%)	34 (35,8%)				0,42	0,2- 0,81

Расчет показателя отношения шансов указывает, что носительство гомозиготного генотипа AA цитокинового рецептора IL-10 увеличивает риск возникновения ХОБЛ в 2,72 раз ( $p=0,002$ ; ОШ=2,72; 95%ДИ>1). Генотип GG является протективным и его носительство уменьшает вероятность развития ХОБЛ в 2,38 раз ( $p=0,002$ ; ОШ=0,42; 95%ДИ>1). Сила связи данного полиморфного локуса с развитием ХОБЛ оценивалась как средняя ( $V=0,249$ ).

Далее анализировали риск возникновения ХОБЛ у обследуемых лиц в зависимости от статуса курения (таблица 5). У курящих лиц носительство гомозиготного генотипа AA было ассоциировано с увеличением вероятности возникновения ХОБЛ в 2,89 раза ( $p=0,023$ ; ОШ=2,89; 95%ДИ=1,23-6,68). В отношении носительства генотипа GG у курящих лиц не было определено статистически значимой ассоциации с риском развития ХОБЛ ( $p=0,023$ ; ОШ=0,45; 95%ДИ=0,20-1,01). Связь между полиморфным локусом rs1800896 и заболеванием у курильщиков определена как средняя ( $V=0,28$ ).

**Таблица 5.** - Носительство генотипов у обследуемых лиц в зависимости от курения

Курение	Гено-тип	Статус		$\chi^2$	p	V	ОШ	95% ДИ
		Пациенты с ХОБЛ, n (%)	Здоровые лица, n (%)					
Курящие	AA	24 (36,90%)	10 (16,90%)	7,5 5	0,02 3	0,2 8	2,89	1,23- 6,68
	AG	28 (43,10%)	28 (47,50%)				0,83	0,41- 0,70
	GG	13 (20,0%)	21 (35,60%)				0,45	0,20- 1,01

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Некурящие	AA	16 (53,3%)	10 (27,8%)	5,2 6	0,07 2	0,2 4	2,97	1,06- 8,26
	AG	9 (30%)	13 (36,1%)				0,75	0,26- 2,13
	GG	5 (16,7%)	13 (36,1%)				0,35	0,11- 1,15

При анализе носительства генотипов исследуемого полиморфизма среди некурящих здоровых лиц и пациентов с ХОБЛ статистически значимых различий в исследуемой подгруппе выявлено не было ( $p>0,05$ ).

**Заключение.**

1. Носительство гомозиготного генотипа AA полиморфизма rs1800896 гена IL-10 у белорусов ассоциировано с повышенным риском развития ХОБЛ в 2,72 раза. Генотип GG является протективным и его носительство уменьшает вероятность развития ХОБЛ в 2,38 раз.

2. У курящих лиц носительство гомозиготного генотипа AA полиморфизма rs1800896 ассоциировано с увеличением вероятности возникновения ХОБЛ в 2,89 раза. В отношении носительства генотипа GG у курящих лиц не было определено статистически значимой ассоциации с риском развития ХОБЛ.

3. Среди двух факторов – носительства генотипа AA полиморфного локуса rs1800896 гена IL-10 и курения, ведущее значение принадлежит генетической предрасположенности.

**Список литературы**

1. Salvi S.S., Barnes P.J. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. // *Lancet*. – 2009. – № 374. – P. 733–743.
2. Журавков, Ю. Л. Современные подходы к диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких с позиций GOLD 2017 года / Ю. Л. Журавков, А. А. Королева // *Военная медицина*. – 2017. – № 4. – С. 90 – 92.
3. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2019 report) // *GOLD assembly*. – 2019. – P. 4–13.
4. Давидовская, Е. И. В группе риска – пациенты с астмой и ХОБЛ. // *Медицинский вестник* – 2020. – № 16. – С. 8 – 9.
5. Хотько, Е. А., Таганович, А. Д. Полиморфизм генов рецепторов и их лигандов при хронической обструктивной болезни легких. // *Медицинский журнал*. – 2016. – № 3. – С. 36 – 42.
6. Dutta J., Fan Y., Gupta N., Fan G. Gelinas C Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- $\kappa$ B // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – P. 6800-6816.

**ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ АКРИЛАМИДНЫХ СОПОЛИМЕРОВ С  
НАНОАЛМАЗАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО  
РАЗЛОЖЕНИЯ**

**Макаревич Д. А.**

*ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной биохимии Института  
биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
demkarevich@yandex.ru*

**Рябцева Т. В.**

*научный сотрудник научной группы «Гемо- и лимфосорбции» научно-  
исследовательской части УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»*

**Ковганко Н. Н.**

*к. х. н., доцент кафедры биологической химии УО «Белорусский  
государственный медицинский университет»*

**Штемплук Р. Г.**

*Научный сотрудник НП ЗАО «Синта», Минск, Беларусь*

*Изучена гемосовместимость ультрадисперсных наноалмазов и их сополимеров с полиакриламидным гелем. Главной проблемой исследования является изучение влияния качества углеродных наночастиц, а именно, их степени окисленности, на безопасность их применения в медицине. В данной работе представлены результаты лабораторных исследований степени гемолиза эритроцитов и процента изменения клеточного состава крови после взаимодействия с полимером с включением наноалмазов. В статье авторы делают вывод о прямой зависимости степени гемолиза эритроцитов от степени окислительного разложения наноалмазов. При этом была обнаружена обратная зависимость неспецифической адгезии клеток крови человека от присутствия окисляемых форм углерода на поверхности наноалмазов. Тем самым была показана возможность применения углеродных наночастиц в изделиях медицинского назначения для прямого контакта с кровью.*

**Ключевые слова:** наноалмазы; акриламидный сополимер; окислительное разложение; гемосовместимость.

**HEMOCOMPATIBILITY OF ACRYLAMIDE COPOLYMERS WITH  
NANODIAMONDS DEPENDING ON DEGREES OF OXIDATIVE  
DECOMPOSITION**

**Makarevich D.A.**

*Leading Researcher, Laboratory of Applied Biochemistry, Institute of Bioorganic  
Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

**Ryabceva T. V.**

*The post-graduate student, the Department of Biological Chemistry, the Belarusian  
State Medical University, Minsk, Belarus*

**Kauhanka M. M.**

*candidate of chemical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus  
Shtempliuk R.G.  
Researcher at SP CJSC "Sinta", Minsk, Belarus*

*The article is devoted to the study of hemocompatibility of nanodiamonds and their copolymers with polyacrylamide gel. The main problem of the research is the influence of the quality of carbon nanoparticles, namely, their oxidation state, on their safety using in medicine. This paper presents the results of laboratory studies of the hemolysis degree and the percentage of changes in the cellular composition of blood after interaction with a polymer including nanodiamonds. The authors conclude that the degree of erythrocytes hemolysis is directly dependent on the degree of oxidative decomposition of nanodiamonds. At the same time, it was found an inverse dependence of the nonspecific adhesion blood cells on the presence of oxidizable carbon forms on the nanodiamonds surface. Thus, it was shown the possibility of using carbon nanoparticles in medical products for direct contact with blood.*

**Key words:** *nanodiamonds; acrylamide copolymer; oxidative degradation; hemocompatibility.*

**Введение.** Среди всех углеродных материалов, представляющих интерес для разработки новых методов лечения в медицине наиболее перспективными, являются наноалмазы. Их низкая токсичность и высокая удельная поверхность, обеспечивает максимальную биодоступность и является главным преимуществом перед фуллеренами, нанотрубками и графеном [1,2]. Средний диаметр наноалмазов детонационного синтеза (дНА) составляет 4 nm, они имеют все физические и химические свойства алмаза, и разветвленную поверхность с различными активными поверхностными группами (CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R, CH<sub>x</sub>, C-N, C=N, C-O-O, OH, CO, C<sub>6</sub>H<sub>x</sub>). Благодаря модифицированной поверхности дНА используют в биологии и медицине в качестве носителя лекарственных или диагностических агентов. В перспективе, нДА могут быть использованы в качестве лигандов для связывания биохимических молекул, накапливающихся при различных патологических состояниях [1,3,4].

Особый интерес представляет окисленная поверхность НА так как это место проведения на поверхности НА различных реакций. Тем более, что окисление используют для дополнительной очистки поверхности наноалмаза, которое может проводиться как в жидкой, так и в газовой фазе. При этом возможно получить дНА с различной степенью окисления и как следствие различным составом химически активных групп поверхности. Различные способы окисления поверхности могут изменять, гидрофильность и инертность поверхности наноалмаза а значит и влиять на гемосовместимость при контакте с кровью. Поэтому важно исследовать гемосовместимость сополимеров нДА

различной степени окисленности, в целях выбора оптимального материала для создания гемосовместимых изделий медицинского назначения.

**Цель** – изучить влияние степени окисленности наноалмазов, иммобилизованных на полиакриламидный гель на гемосовместимость и изменение клеточного состава крови в экспериментах *in vitro*.

**Материал и методы исследования.** В план изучения гемосовместимости включили 4 типа углеродных наночастиц. УДА-СП (тип ζ+) и УДА-ГО-СП (30 и 100 нм) - наноалмаз глубокой очистки – сухой порошок серого цвета (содержание окисляемых форм углерода 1,2%; степень окислительного разложения: 0,98; химические функциональные поверхностные группы: CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R, CH<sub>x</sub>, C-N, C=N, C-O-O, OH, CO). УДА-ЧОШ-СП – наноалмаз селективного окисления, сухой порошок черного цвета (количество окисляемых форм углерода 38,4%, степень окислительного разложения: 0,28; функциональные поверхностные группы: CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>R, CH<sub>x</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>x</sub>).

Иммобилизацию проводили методом радикальной полимеризации акриламида с N,N-метиленбисакриламидом [5]. Протокол изучения гемосовместимости включал исследование количества клеток крови и определение степени гемолиза в плазме донорской крови после контакта с исследуемыми наноалмазами (суспензия) и образцами сополимеров полиакриламида с наноалмазами. Показатель гемолиза эритроцитов в плазме описывали в процентах от степени гемолиза 100 мкл цельной крови в 100 мкл дистиллированной воды (100% гемолиз). Оценку степени гемолиза проводили по оптической плотности при длине волны 540 нм. Использовали две модификации эксперимента по определению уровня гемолиза эритроцитов. 1. Инкубировали суспензию наноалмазов (10 мг/мл) с цельной кровью в равных объемах при комнатной температуре 1, 30 и 60 минут. После центрифугирования определяли оптическую плотность надосадочной жидкости. 2. Два миллилитра сополимера полиакриламида содержащего 10мг наноалмазов, инкубировали с 1 мл цельной крови доноров (2 минуты). После перфузии крови через полиакриламидный сополимер кровь центрифугировали и оценивали уровень гемолиза.

Для оценки количества клеток крови после контакта с сополимером содержащим наноалмазы, после инкубации цельной крови в течении 2 минут отбирали пробы до и после контакта с гелем. Клеточный состав крови исследовали на автоматическом геманализаторе Cell-DynRuby (Abbot, Германия). Статистический анализ проводили методами непараметрической статистики, результаты описывали в виде медианы, 25 и 75 перцентилей.

**Результаты.** Результаты оценки гемолиза после контакта с суспензией наноалмазов показали достаточно высокую степень гемолиза только в случае образца УДА-ЧОШ-СП: 14,24%. Установленный показатель гемолиза остальных образцов наноалмазов был незначителен и составил от 0,5% до 1,8% к 60-й минуте инкубации. По-видимому, высокий процент гемолиза в случае с маркой наноалмазов УДА-ЧОШ-СП связан с наличием в составе различных примесей в

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

виде окисляемых форм углерода. Установлено, что включение наноалмазов в полиакриламидную матрицу повышает гемосовместимость образцов полимера. Так, после инкубации крови и сополимера содержащего нДА максимальное значение показателя гемолиза составило лишь 0,48% и отмечалось только для полиакриламидного гидрогеля без лиганда. Наноалмазы УДА-ГОСП и УДА-СП в составе полиакриламид не вызывали повышения значений гемолиза: 0,18% и 0,14% соответственно.

При взаимодействии клеток крови с полиакриламидом без лиганда происходит незначительное, до 10%, снижение абсолютного числа клеток крови (Таблица 1). При взаимодействии сополимером нДА установлено более выраженное уменьшение концентрации клеток крови, чем с полиакриламидом без лиганда. Наиболее значительное изменение наблюдали в количестве лейкоцитов и тромбоцитов при взаимодействии с УДА-СП30. Таким образом для дальнейших исследований по изучению сорбционных характеристик сополимеров нДА можно рекомендовать УДА-ЧОШ-СП-ПААГ и УДА-СП-ПААГ.

**Таблица 1.** - Процент изменения абсолютного количества клеток крови после контакта с сополимерами нДА

Образец	Лейкоциты	Лимфоциты	Эритроциты	Тромбоциты
УДА-ЧОШ-СП-ПААГ	8,33 (5,21-9,18) *	4,58 (3,38-5,40) *	1,81 (1,65-2,01)	12,17 (8,95-13,81) *
УДА-ГО-СП-ПААГ	8,57 (6,44-10,07) *	4,16 (3,24-4,70) *	2,76 (2,19-3,58)*	11,87 (8,87-14,16) *
УДА-СП30 - ПААГ	7,54 (6,43-11,07) *	5,26 (4,08-5,83) *	3,71 (2,62-6,05) *	14,51 (12,98-15,86) *
УДА-СП100-ПААГ	9,43 (0,09-9,73) *	5,55 (3,12-8,26) *	2,80 (1,99-3,25) *	11,18 (8,21-11,56) *
ПААГ	4,05 (2,73-4,92)	2,08 (1,05-3,67)	1,43 (1,04-2,02)	5,88 (4,35-8,88)

Примечание: \*разница достоверна с  $p \leq$ , тест Манна-Уитни

**Выводы.** Выявлена зависимость степени гемолиза эритроцитов в ответ на воздействие наноалмазов с различной степенью окислительного разложения. Наибольший процент гемолиза ( $14,24 \pm 2,12\%$ ) наблюдали после воздействия на цельную кровь наноалмазов со степенью разложения 0,28; наименьший процент гемолиза ( $1,8 \pm 0,5\%$ ) фиксировали после контакта крови с наноалмазами со степенью окислительного разложения 0,98.

Кроме того, определили обратную зависимость неспецифической адгезии клеток крови человека после контакта с сополимером полиакриламида и наночастиц углерода в зависимости от присутствия окисляемых форм углерода

на поверхности наноалмазов. При увеличении количества окисляемых форм углерода на дНА (около 38,4%) клеточная адгезия уменьшается.

**Список литературы:**

1. Surface functionalization of detonation diamond suitable for biological applications / Krüger, A. [et al.] // (2006). *J. Mater. Chem.* – 2006. – Vol. 16, N. 24. – P. 2322–2328.
2. Shenderova, O. A. Carbon nanostructures / O.A. Shenderova, V.V. Zhirnov, D.W. Brenner // *Critical reviews in solid state and materials sciences.* 2002. – Vol. 27, N. 3-4. – P. 227–356.
3. Mogil'naya O. Comparative study of antibacterial properties of Lysozyme upon its adsorption and covalent binding to nanodiamonds / O. Mogil'naya, V. Bondar. // *Nanotechnol.* 2012. – Vol. 7. – P. 658–665.
4. Bogatyreva, G. P. Diamond – an adsorbent of a new type / G.P. Bogatyreva, M.A. Marinich, V.L. Gvyazdovskaya // *Diamond Relat. Mater.* 2000. – Vol. 9, N. 12. – P. 2002–2005.
5. ОФС 1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле / МЗ Российской Федерации, общая фармакопейная статья.



**МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПОДОБИЕ 6-ТЕТРАГИДРОГАРМОЛА И  
ТАБЕРНАНТАЛОГА, СИНТЕТИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА  
СЕРОТОНИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА**

**Марцинкевич А. Ф.,**

*к. б. н., доцент кафедры общей и клинической биохимии учреждения  
образования «Витебский государственный медицинский университет», г.*

*Витебск, Беларусь  
argentum32@gmail.com;*

**Фомченко Г. Н.,**

*к. б. н., доцент, заведующий кафедрой общей и клинической биохимии  
учреждения образования «Витебский государственный медицинский  
университет», г. Витебск, Беларусь*

*gfomchenko25@gmail.com;*

**Буянова С. В.,**

*к. б. н., доцент, доцент кафедры общей и клинической биохимии  
учреждения образования «Витебский государственный медицинский  
университет», г. Витебск, Беларусь*

*bu\_lana@mail.ru*

*В работе приводится краткий обзор свойств алкалоидов растения ибоба,  
а также высказывается предпосылка о схожести ибобаина и эндогенно  
синтезируемого 6-тетрагидрогармола. Последующий анализ молекулярных  
дескрипторов и фармакофора серотонинового транспортера показал, что 6-  
тетрагидрогармол может быть использован для рационального дизайна  
лекарственных веществ, обладающих способностью ингибировать обратный  
захват серотонина.*

**Ключевые слова:** *серотонин; ибобаин; 6-тетрагидрогармол; алкоголь*

**MOLECULAR SIMILARITY OF 6-TETRAHYDROHARMOL AND  
TABERNANTHALOG, SYNTHETIC INHIBITOR OF THE SEROTONIN  
TRANSPORTER**

**Martsinkevich A. F.,**

*Candidate of Biology, Associate Professor of the Department of General and  
Clinical Biochemistry of the Educational Institution “Vitebsk State Medical  
University”, Vitebsk, Belarus,*

*argentum32@gmail.com;*

**Fomchenko G. N.,**

*Candidate of Biology, Associate Professor, Head of the Department of General  
and Clinical Biochemistry of the Educational Institution “Vitebsk State Medical  
University”, Vitebsk, Belarus,*

*gfomchenko25@gmail.com;*

**Buyanova S. V.,**

*Candidate of Biology, Associate Professor of the Department of General and Clinical Biochemistry of the Educational Institution "Vitebsk State Medical University", Vitebsk, Belarus, bu\_lana@mail.ru*

*The paper provides a brief overview of the iboga plant alkaloids properties, as well as the premise of the similarity of ibogaine and endogenously synthesized 6-tetrahydroharmol. Subsequent analysis of the molecular descriptors and pharmacophore of the serotonin transporter showed that 6-tetrahydroharmol can be used for the design of drugs that have the ability to inhibit serotonin reuptake.*

**Key words:** *serotonin; ibogaine; 6-tetrahydroharmol; alcohol*

Серотонинергическая система играет важную роль в регуляции поведенческих реакций человека, опосредуя широкий спектр психоэмоциональных состояний от апатии до агрессии. Известно также, что серотонин участвует в формировании и укреплении различных зависимостей, таких как азартные игры, алкоголизм и наркомания.

Вполне ожидаемым является и то, что метаболизм серотонина является мишенью для многих психоактивных соединений, используемых в качестве лекарственных препаратов или с рекреационной целью. В контексте настоящей работы могут быть примечательны алколоиды растения *ибога* [1], которые наряду с галлюциногенными обладают также и анти-аддитивными свойствами, в частности, снижают тягу к алкоголю [2]. Были предприняты весьма успешные попытки получения синтетических аналогов основного алкалоида ибоги – ибогаина, приведшие к синтезу табернанталога (*англ.* tabernanthalog), обладающего терапевтическим потенциалом, но лишённого галлюциногенных свойств [3]. Предположительно, табернанталог ингибирует серотониновый переносчик (SERT), увеличивая время его нахождения в синаптическом пространстве и пролонгируя действие.

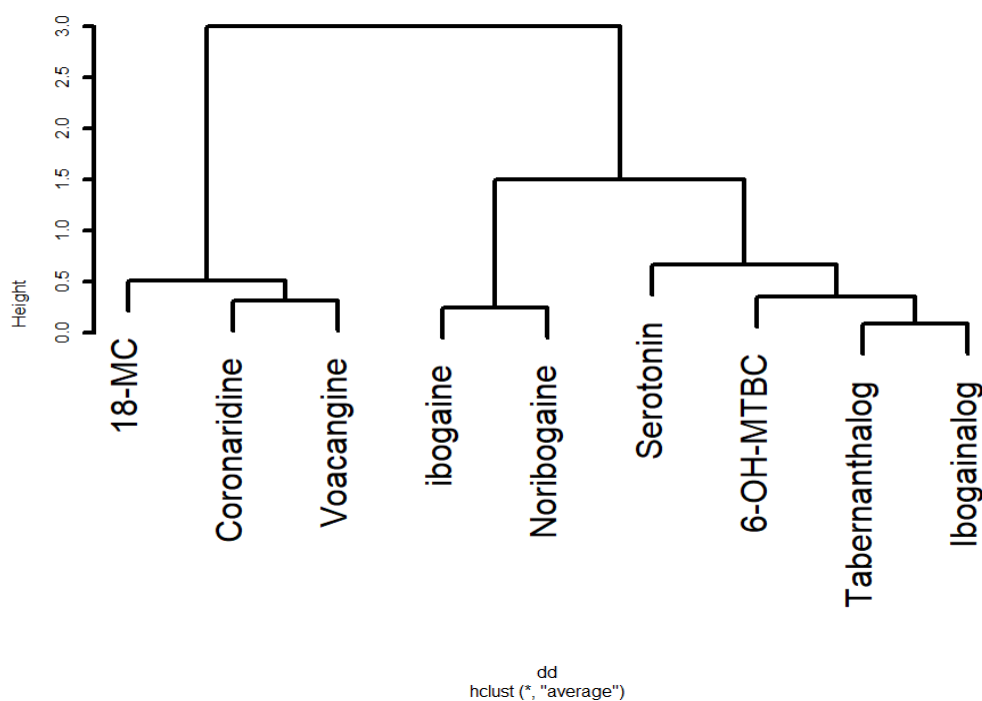
Ибогаин и его аналоги структурно схожи с серотонином, так как основаны на аналогичном индольном фрагменте. Также нельзя не отметить схожесть с производными тетрагидро- $\beta$ -карболина, с тем лишь исключением, что вместо гексагидропиридинового цикла ибогаиноиды имеют семичленное кольцо азепана. Любопытным представляется также и то, что один из тетрагидро- $\beta$ -карболинов, 6-тетрагидрогармол (6-ОН-МТВС, 6-гидрокси-метилтетрагидро- $\beta$ -карболин) может синтезироваться эндогенно после употребления алкоголя. Ацетальдегид, образовавшийся при окислении этанола, вступает с серотонином в реакцию Пиктета-Шпенглера [4], которая может протекать самопроизвольно, без участия ферментов. Однако в доступных литературных источниках активность 6-ОН-МТВС относят как правило к ингибированию моноаминоксидаз, опуская возможную активность по отношению к SERT. По мнению авторов, возможность поддержания достаточного уровня серотонина без активации дофаминовой системы поощрения может быть важным элементом

при лечении синдрома алкогольной зависимости, однако современная фармакология не обладает богатым арсеналом лекарственных препаратов с указанными свойствами.

Таким образом, как и в случае с ибобаином и созданным на его основе табернанталогом, 6-ОН-МТВС также может быть привлекательным «соединением-лидером» для конструирования новых лекарственных соединений, снижающих тягу к алкоголю или иным психоактивным веществам.

Исходя из вышеперечисленного, целью настоящей работы было определение схожести ибобаиноидов и 6-ОН-МТВС на основании молекулярных дескрипторов и структуры фармакофора.

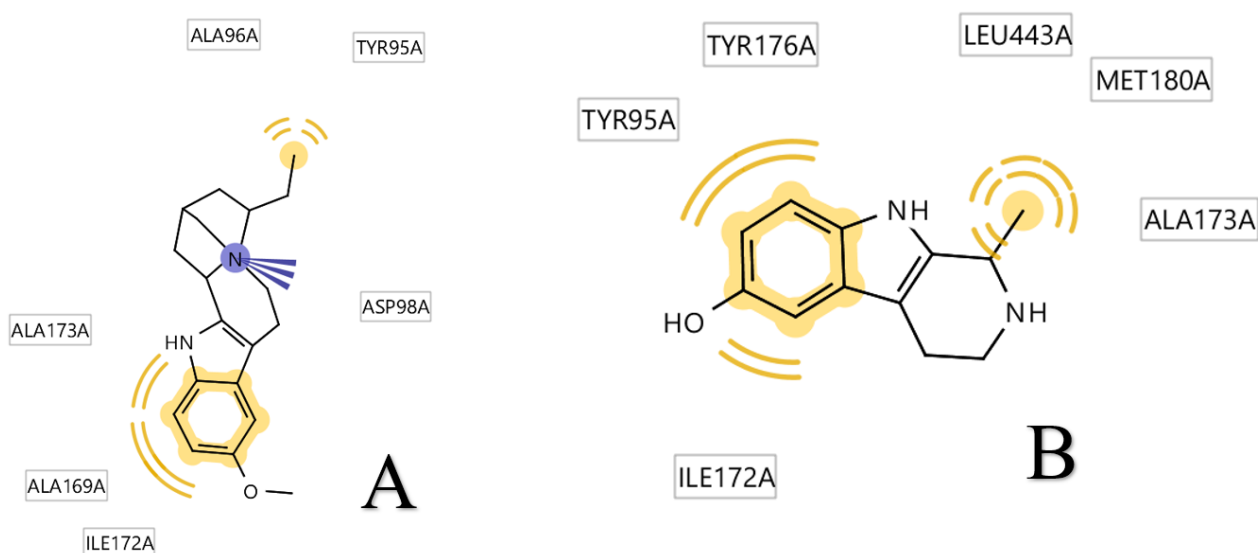
В анализе были использованы структуры 6-ОН-МТВС, а также различные ибобаиноиды, такие как 18-метоксикоронаридин, коронаридин, воакангин, ибобаин и норибобаин, табернанталог и ибобаиналог. В качестве «внутреннего стандарта» использовалось строение серотонина. Для каждой из структур рассчитывали молекулярные дескрипторы BCUT (Eigenvalue Based Descriptor), основанные на взвешенной матрице Бурдена, которая учитывает, как связность, так и атомные характеристики молекулы. Обработка данных выполнена в среде R 3.6.4. В результате иерархической кластеризации было обнаружено три относительно обособленных кластера, в один из которых были отнесены серотонин, 6-ОН-МТВС, табернанталог и ибобаиналог, второй был сформирован 18-метоксикоронаридином, коронаридином, воакангином, а третий состоял из ибобаина и норибобаина (рисунок 1).



**Рисунок 1.** Иерархическая кластеризация по молекулярным дескрипторам BCUT.

В первом кластере наибольшее сходство имели табернанталог и ибобаиналог, а следующим элементом выступал 6-ОН-МТВС.

Таким образом, можно с некоторыми основаниями утверждать о наличии у 6-ОН-МТВС и табернанталога схожего строения. Следующим этапом рационального дизайна является определение молекулярной мозаики участка связывания табернанталога и SERT. Для этого была использована кристаллографическая модель 6DZY из Protein Data Bank, моделирование фармакофора выполнялось при помощи программного обеспечения Ligand Scout, определение оптимальных конформаций – на основании консольной утилиты Auto Dock Vina. Фармакофор, рассчитанный для нативного лиганда содержит в своем составе следующие аминокислоты: Ala96A, Tyr95A, Asp98A, Ile172A, Ala169A, Ala173A (рисунок 2, А). Примечательно, что для 6-ОН-МТВС был определен схожий набор взаимодействий: Tyr95A, Ala137A, Tyr176A, Met180A, Leu443A (рисунок 2, В).



**Рисунок 2.** Фармакофор для ибоганоидов (А) и 6-ОН-МТВС (В)

Причем для некоторых из взаимодействий, специфических для 6-ОН-МТВС была показана ингибирующая активность по отношению к серотониновому транспортеру. Исходя из полученных результатов есть основания полагать, что 6-ОН-МТВС также обладает способностью замедлять обратный транспорт серотонина.

Разумеется, полученных сведений недостаточно для однозначных выводов, но они создают предпосылки для продолжения работы и подтверждают возможность использования 6-ОН-МТВС в качестве «соединения-лидера» для рационального дизайна.

**Список литературы**

1. Wells, G. B. The effects of ibogaine on dopamine and serotonin transport in rat brain synaptosomes / G. B. Wells, M. C. Lopez, J. C. Tanaka // *Brain Res Bull.* – 1999. – № 48(6). – P. 641-647.
2. Rezvani, A. H. Attenuation of alcohol intake by ibogaine in three strains of alcohol-preferring rats / A. H. Rezvani, D. H. Overstreet, Y. W. Lee // *Pharmacol Biochem Behav.* – 1995. – № 52(3). – P. 615-20.
3. A non-hallucinogenic psychedelic analogue with therapeutic potential / L. P. Cameron [et al] // *Nature.* – 2021. – V. 589. – № 7842. – P. 474-479.
4. Beck, O. Serotonin condensation product 5-hydroxymethtryptoline: evidence for in vivo formation from acetaldehyde during intoxication using deuterium labelled ethanol / O. Beck, A. Tyler, K. Faull // *Alcohol Alcohol Suppl.* – 1987. – №1. – P. 743-747.

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ  
ХЕМОКИНА CXCL8 И ЕГО РЕЦЕПТОРА CXCR1 В КРОВИ  
ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**

**Мурашко Д. И.,**

*ассистент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Таганович А.Д.,**

*д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

*УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Ковганко Н. Н.,**

*к.х.н., доцент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»*

**Аркадьев К.А.,**

*студент 3-го курса,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет», г. Минск  
dashaturashka@mail.ru*

*Немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) включает в себя два основных гистологических подтипа: аденокарциному (АК) и плоскоклеточный рак (ПКРЛ). В настоящее время отсутствуют информативные показатели в крови, которые позволили бы судить о наличии и распространенности АК и ПКРЛ. Целью исследования явилось изучение количественных взаимоотношений концентрации хемокина CXCL8 и его рецептора CXCR1 в крови пациентов с АК и ПКРЛ с тем, чтобы на основании полученных результатов оценить целесообразность их использования в диагностике этого заболевания. В результате исследования получены доказательства диагностической ценности определения плотности расположения (MFI) CXCR1 в гранулоцитах у пациентов с I-II стадиями НМКРЛ (диагностическая чувствительность для рассчитанного порогового значения - 98,7%, специфичность – 71,1%) и с III-IV стадиями (чувствительность - 87,5%, специфичность – 93,3%). Пороговое значение уровня показателя 23,9 позволяет выявить II стадию НМКРЛ с чувствительностью 96,6% и специфичностью 57,1%.*

**Ключевые слова:** *немелкоклеточный рак легкого; аденокарцинома; плоскоклеточный рак; кровь; CXCR1; CXCL8*

**DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF DETERMINING THE LEVEL OF  
THE CHEMOKINE CXCL8 AND ITS RECEPTOR CXCR1 IN THE BLOOD  
OF THE PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

**Murashka D.I.,**

*assistant of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Tahanovich A. D.,**

*doctor of medical sciences., professor,  
head of the department of biological chemistry?*

*Belarusian State Medical University,*

**Kauhanka M. M.,**

*candidate of chemical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Arkadyev K. A.,**

*3<sup>rd</sup> year student*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

*dashamurashka@mail.ru*

*Non-small cell lung cancer (NSCLC) includes two main histological types: adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC). Currently, there are no informative blood indicators that would allow us to estimate the presence and prevalence of NSCLC. The aim of the study was to estimate quantitative relationship between blood levels of chemokine CXCL8 and its receptor CXCR1 in AC and SCC patients in order to assess the possibility of its use in NSCLC diagnosis. As the result, there is evidence of high diagnostic value of determining MFI CXCR1 (granulocytes) in patients with stages I-II NSCLC (sensitivity for calculated cutoff value – 98,7%, specificity – 71,1%) and stages III-IV (sensitivity – 87,5%, specificity – 93,3%). Cutoff value of MFI CXCR1 in granulocytes 23,9 can be used to differentiate I and II stages NSCLC.*

**Key words:** *non-small cell lung cancer; adenocarcinoma; squamous cell carcinoma; blood; CXCL8; CXCR1*

В структуре заболеваемости раком легкого 85% принадлежит немелкоклеточному раку (НМКРЛ), который подразделяется на два основных гистологических подтипа: аденокарциному (АК, 40% случаев рака легкого) и плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ, 30% случаев).

По сравнению с АК, ПКРЛ протекает более агрессивно. Пятилетняя выживаемость пациентов с I стадией АК и ПКРЛ составляет 79% и 47% соответственно, и уже на II стадии она снижается более, чем на треть. При IV стадии АК и ПКРЛ выживаемость составляет лишь 6% и 2% соответственно [1].

До настоящего времени нет информативных лабораторных показателей, позволяющих выявить АК и ПКРЛ на ранних стадиях. Чаще других с этой целью определяется концентрация фрагмента цитокератина 19 (CYFRA 21-1). Однако

его диагностическая чувствительность при диагностике НМКРЛ безотносительно гистологического типа составляет лишь 59% [2].

Одной из центральных составляющих онкогенеза является опухолеассоциированное воспаление, оказывающее существенное влияние на рост и метастазирование опухоли. Иммунные клетки микроокружения опухоли продуцируют хемокины, которые принимают участие в пролиферации клеток, ангиогенезе и метастазировании [3].

Интерлейкин-8 (CXCL8) принадлежит к семейству СХС-хемокинов, ответственных за привлечение иммунных клеток в зону воспаления. Взаимодействие CXCL8 с его рецептором CXCR1 усиливает опухолевый рост [4]. Высокая экспрессия CXCR1 в опухолевой ткани ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с НМКРЛ [5].

Синтез провоспалительных хемокинов и их рецепторов клетками характерен не только для опухоли, но и для крови. Логично предположить, что рост их уровня в опухолевой ткани влияет на их концентрацию в крови. Однако в литературе отсутствуют данные об определении уровня CXCL8 и CXCR1 в крови с целью диагностики АК и ПКРЛ.

Целью настоящего исследования явилась оценка уровня CXCL8 и CXCR1 в периферической крови пациентов с АК и ПКРЛ и выяснение целесообразности их определения у пациентов с целью диагностики НМКРЛ.

**Материалы и методы.** Обследовано 109 пациентов с ПКРЛ и 94 пациента с АК при первом поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период 2019-2021 гг. В качестве группы контроля обследовано 40 человек без проявлений заболевания в возрасте 43 – 67 лет. Уровень CXCL8 в сыворотке крови пациентов и здоровых людей определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия) и планшетном фотометре Sirio (Seac, Италия) при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм. Определение рецептора CXCR1 в клетках крови осуществляли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Для всех выборок проверяли гипотезу нормальности распределения по критериям Колмогорова-Смирнова. Анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программных пакетов IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США) и MedCalc (США). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25% - 75%). Для оценки различий между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна-Уитни. О взаимосвязи между определяемыми показателями и стадиями АК и ПКРЛ судили на основании расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

Оценку диагностической информативности биохимических тестов проводили с помощью характеристических кривых (ROC-анализ).

О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и эффективности теста (ДЭ). Пороговое значение диагностического теста



определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении ROC-кривых.

**Результаты.** У пациентов с АК и ПКРЛ уровень CYFRA 21-1 был в 2 раза выше, чем в контрольной группе уже на I стадии заболевания (таблица 2). Доля лимфоцитов с CXCR1 при аналогичном сравнении увеличилась примерно на 20%. Уровень CXCL8 в сыворотке крови пациентов со II стадией АК и ПКРЛ возрастал более чем в два раза. Имелось значительное увеличение интенсивности флуоресценции комплексов антитело/рецептор (MFI), отражающей плотность расположения CXCR1 в мембранах лимфоцитов и гранулоцитов на I-II стадиях АК и ПКРЛ. При III-IV стадиях увеличение MFI было еще более выраженным. В то же время, доля моноцитов, несущих рецептор CXCR1, существенно увеличивалась лишь на поздних стадиях заболевания. Сходным изменениям подвергалась и плотность расположения в них CXCR1, но лишь при ПКРЛ.

Имел место существенный подъем уровня SCC в сыворотке крови пациентов с ПКРЛ, но не АК. Уровень CYFRA 21-1 в сыворотке крови увеличивался на ранних стадиях и в поздний период АК и ПКРЛ.

Для показателей, продемонстрировавших существенное изменение уровня по сравнению со здоровыми людьми и пациентами с гамартомой на ранних стадиях АК и ПКРЛ и еще более – в поздний период, был рассчитан коэффициент корреляции Спирмена (R). Он подтвердил наличие связи со стадиями ПКРЛ и АК уровня CYFRA 21-1 (величина R для ПКРЛ и АК составила 0,469 и 0,329 соответственно), MFI CXCR1 (лимфоциты) (R=0.524 и 0.526 соответственно) и доли лимфоцитов, снабженных CXCR1 (R=0.558 и 0.662, соответственно).

Схожесть изменений уровня компонентов оси CXCL8/CXCR1 при АК и ПКРЛ указывают на возможность дальнейшей оценки их диагностической значимости в общей группе пациентов с НМКРЛ. Результаты ROC-анализа показывают, что 98,1% пациентов с НМКРЛ со значением MFI CXCR1 в гранулоцитах более 10,9 имеют ранние стадии НМКРЛ (специфичность 71,1%, диагностическая эффективность – 82,9%). В то же время, значение этого показателя >44, 2 соответствует поздним стадиям НМКРЛ с чувствительностью 87,5% и специфичностью 93,3% (таблица 4).

Превышение порогового значения (>2,8 нг/мл) CYFRA 21-1 позволяет верно выявить ранние стадии НМКРЛ только в 68,4% случаев с вероятностью истинно отрицательного результата 96,8%. С другой стороны, для отличия поздних стадий от ранних расчетная величина пограничного значения этого показателя составила 4,1 нг/мл (чувствительность 79,2%, специфичность 68,4%).

Уровень CYFRA 21-1 не отличался в группах пациентов с I стадией НМКРЛ по сравнению со II стадией, в то время как MFI CXCR1 (гранулоциты) при значениях этого показателя >23,9 соответствовал II стадии заболевания с чувствительностью 96,6%, но низкой специфичностью (57,1%).

**Заключение.** Результаты проведенного исследования свидетельствуют о существенном увеличении концентрации CYFRA 21-1 у пациентов с ПКРЛ и АК

по сравнению со здоровыми людьми уже на I стадии заболевания и ее возрастание в последующих стадиях. Обнаружена коррелятивная связь средней силы для этого параметра со стадиями заболевания.

Уровень CXCL8 в крови пациентов с НМКРЛ существенно отличался от контрольных значений лишь на поздних стадиях заболевания и по этой причине не был избран для дальнейшей оценки диагностических параметров. Вместе с тем, получены доказательства значительного повышения MFI CXCR1 в гранулоцитах и доли лимфоцитов, снабженных этим рецептором, на I стадии АК и ПКРЛ по сравнению со здоровыми людьми. Рецептор CXCR1 способен связываться не только с CXCL8, но и с другими провоспалительными хемокинами (ИЛ-6). Это может послужить причиной более выраженного изменения его уровня в крови пациентов по сравнению с таковым его лиганда CXCL8.

Отсутствие существенных различий изменения концентрации CXCR1 в клетках периферической крови пациентов с АК и ПКРЛ привели к заключению о возможности проведения анализа диагностической ценности анализируемых параметров безотносительно гистологического типа НМКРЛ.

Согласно результатам ROC-анализа, отсутствует информативность определения CYFRA 21-1 с целью дифференциальной диагностики I и II стадий заболевания, в то время как рассчитанное пороговое значение повышения MFI CXCR1 в гранулоцитах позволяет сделать это с высокой чувствительностью (96,6%), хотя и относительно низкой специфичностью (57,1%). Определение этого показателя также позволяет отличить ранние стадии НМКРЛ от здоровых людей с высокой диагностической чувствительностью (98,7%), значительно превосходящей таковую для измерения концентрации в крови CYFRA 21-1 (68,4%). Однако специфичность теста, напротив, уступала таковой определения уровня CYFRA 21-1 (96,8%).

Наличие значительной разницы уровня CYFRA 21-1 и MFI CXCR1 в гранулоцитах у пациентов с ранними и поздними стадиями НМКРЛ, а также обнаружение коррелятивной связи этих показателей со стадиями заболевания дали основание проанализировать возможность их использования в этом случае с диагностической целью. Эффективность их измерения для отличия ранних стадий от поздних составила 80,6% - для CYFRA 21-1 и 90,0% - для MFI CXCR1 в гранулоцитах.

### **Список литературы**

1. Wang B. The comparison between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in lung cancer patients / B. Wang // J Cancer Res Clin Oncol. – 2020. - Vol. 146, №1. - P. 43 – 52.
2. Wieskopf B. CYFRA 21-1 as a biologic marker of non-small cell lung cancer. Evaluation of sensitivity, specificity and prognostic role / B. Wieskopf [et al] // Chest. – 1995. - Vol. 108, №1. - P. 163–169.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

3. Knight S. B. Progress and prospects of early detection of lung cancer / S. B. Knight [et al] // *Open Biol.* – 2017. - Vol. 7, №9. - P. 170070.
4. Lui Q. The CXCR1/CXCR2 pathways in cancer / Q. Lui [et al] // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2016. - Vol. 31. – P. 61–71.
5. Yang F. CXCR1 correlates to poor outcomes of EGFR-TKI against advanced non-small cell lung cancer by activating chemokine and JAK-STAT pathway / F. Yang [et al] // *Plum Pharmacol Ther.* – 2021. - Vol 67. - P. 102001.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМБИНАЦИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОПУХОЛЕВОГО  
МЕТАБОЛИЗМА В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ  
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО**

**Мурашко Д. И.,**

*ассистент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Таганович А. Д.,**

*д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

*УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Ковганко Н. Н.,**

*к.х.н., доцент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»*

*dashaturashkai@mail.ru*

*Немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований в мире. Поздняя его диагностика существенно сказывается на выживаемости пациентов. При этом, в настоящее время не существует доступных и информативных показателей, позволяющих выявить НМКРЛ, в особенности, на ранних его стадиях.*

***Ключевые слова:** Немелкоклеточный рак легкого; аденокарцинома; плоскоклеточный рак; рецептор; CXCR1; CXCR2; гиалуроновая кислота*

**PROSPECTS OF THE USE OF RELATIVE NUMBER OF  
LYMPHOCYTES CONTAINING CXCR2, FLUORESCENCE INTENSIVITY  
OF CXCR1 IN GRANULOCYTES AND HIALURONIC ACID SERUM  
LEVEL IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER DIAGNOSIS**

**Murashka D.I.,**

*assistant of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Tahanovich A. D.,**

*doctor of medical sciences., professor,  
head of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Kauhanka M. M.,**

*candidate of chemical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

*Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the most widespread malignant neoplasms all over the world. Late diagnosis of this disease significantly worsens its prognosis. Nevertheless, currently there are no available and informative biomarkers which would allow to identify NSCLC, especially, in its early stages.*

**Key words.** *Non-small cell lung cancer; adenocarcinoma; squamous cell carcinoma; receptor; CXCR1; CXCR2; hyaluronic acid*

В 2018 году зарегистрировано 2.1 млн. новых случаев рака легкого (12% от всех диагностируемых случаев рака) [1]. В структуре заболеваемости раком легкого 85% принадлежит немелкоклеточному раку (НМКРЛ), который, в свою очередь, включает в себя два основных гистологических подтипа: аденокарциному (АК) и плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) [2].

В сравнении с ПКРЛ, для АК характерно менее агрессивное течение и значительно лучший прогноз. Так, пятилетняя выживаемость пациентов с установленной I стадией АК и ПКРЛ соответственно составляет 79% и 47% соответственно и снижается более, чем на треть, уже на II стадии НМКРЛ обоих гистологических подтипов. У пациентов с IV стадией АК и ПКРЛ выживаемость составляет лишь 6% и 2% соответственно [3].

В настоящее время не существует информативных и специфичных биомаркеров, позволяющих выявить ранние стадии как АК и ПКРЛ. С целью уточнения диагноза определяют уровень CYFRA 21-1 (фрагмента цитокератина 19) и SCC (антигена плоскоклеточной карциномы) в сыворотке крови пациентов. Однако диагностическая чувствительность определения их невысока.

Рост любой злокачественной опухоли сопровождается развитием воспаления в окружающей ее ткани. Клетки воспалительного микроокружения и стромы опухоли продуцируют большое количество цитокинов, хемокинов и транскрипционных факторов, ответственных за жизнеобеспечение опухоли в условиях интенсивной пролиферации опухолевых клеток и связанной с этим гипоксии [4, 5].

CXCL5 и CXCL8 – провоспалительные хемокины, обладающие ангиогенной активностью. Связывание их с рецепторами CXCR1 и CXCR2 способствует привлечению иммунных клеток в зону воспаления, запускают ангиогенез и метастазирование опухоли [4].

HIF-1 $\alpha$  – индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор, ответственный за экспрессию адгезионного рецептора CD44v6. Его основным лигандом является гиалуриновая кислота (ГК). Взаимодействие ГК с CD44v6 приводит к активации фермента матриксной металлопротеиназы 9, играющей существенную роль в опухолевой инвазии [6].

Целью настоящего исследования явилось установление возможности использования компонентов осей CXCL8/CXCR1, CXCL5/CXCR2, HIF-1 $\alpha$ /CD44v6/ГК в диагностике ПКРЛ и АК, в особенности, на его ранних стадиях.

**Материалы и методы.** Обследовано 107 пациентов с ПКРЛ и 90 пациентов с АК (стадия I по классификации TNM – 21 и 24 пациента

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

соответственно; стадия II – 41 и 27, соответственно; стадия III – 41 и 29, соответственно; IV – 4 и 10, соответственно) при первом поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александра в период 2019-2021 гг. В качестве группы контроля обследовано 40 человек без проявлений заболевания в возрасте 43 - 67 лет.

Определение концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови проводили методом иммунохемилюминесцентного анализа, измерение уровня ГК -методом иммуноферментного анализа. Относительное количество клеток крови, снабженных рецептором CXCR2, и плотность расположения рецептора CXCR1 в них (MFI) в клетках крови определялись методом проточной цитометрии.

Статистическую обработку данных проводили методами непараметрической статистики с использованием программного пакета MedCalc (США). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25% - 75%). Для оценки различий между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна-Уитни. О взаимосвязи между определяемыми показателями и стадиями заболевания судили на основании расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

Оценку диагностической информативности биохимических тестов проводили с помощью построения характеристических ROC-кривых, вычисления площади под ней (AUC), а также расчета диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и эффективности теста (ДЭ). Пороговое значение диагностического теста определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении ROC-кривых.

Построение диагностической модели осуществляли с помощью метода бинарной логистической регрессии.

**Результаты.** Полученные нами ранее результаты определения компонентов осей CXCL8/CXCR1, CXCL5/CXCR2, HIF-1 $\alpha$ /CD44v6/ГК свидетельствуют о значительном повышении уровня некоторых из них в крови пациентов с АК и ПКРЛ (таблица 1). Проведенный корреляционный анализ подтвердил наличие связи средней силы упомянутых показателей со стадиями заболевания (R > 0,3).

**Таблица 1.** - Уровень CYFRA 21-1, ГК, CXCR1 и CXCR2 в крови пациентов с НМКРЛ и здоровых людей

Показатель	Контроль	ПКРЛ (стадии)			
		I	II	III-IV	R
MFI CXCR1 гранулоциты	25,5 [20,1;49,0]	32,7 * [18,3;47,2]	47,2 *# [28,9;47,4]	53,9*#† [41,8;87,7]	<b>0,524</b>
CXCR2, лимфоциты %	9,5 [6,3;14,5]	19,2* [16,0;21,2]	24,9*# [15,1;25,9]	31,2*#† [24,0;34,4]	<b>0,689</b>

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

ГК, нг/мл	8,4 [7,1;18,0]	15,1* [10,7;31,1]	22,4 *# [20,7;40,5]	31,7 *#† [29,7;43,3]	<b>0,518</b>
СУFRA-21-1, нг/мл	1,5 [1,2;1,9]	3,1 * [2,2;4,6]	3,6 * [2,1;5,9]	5,6 *#† [4,2;12,3]	<b>0,469</b>
<b>Показатель</b>	<b>Контроль</b>	<b>АК (стадии)</b>			
		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III-IV</b>	<b>R</b>
MFI CXCR1 гранулоцит	25,5 [20,1;49,0]	32,1 * [22,9;50,6]	47,1 *# [41,2;65,7]	56,9 *#† [49,9;66,9]	<b>0,526</b>
CXCR2, лимфоциты	9,5 [6,3;14,5]	16,6* [10,7;21,5]	20,9*# [14,1;34,4]	32,5*#† [24,3;34,3]	<b>0,683</b>
ГК, нг/мл	8,4 [7,1;18,0]	22,4 * [15,0;24,6]	28,7 *# [23,8;32,2]	30,2 *#† [27,0;33,6]	<b>0,567</b>
СУFRA-21-1, нг/мл	1,5 [1,2;1,9]	1,9 * [1,5;4,3]	2,6 * [2,1;3,8]	4,3 *#† [2,8;7,2]	<b>0,329</b>

Примечание: \* - достоверность разницы у пациентов с НМКРЛ и здоровых людей; # - достоверность разницы у пациентов со II стадией НМКРЛ и другими его стадиями; † - достоверность разницы у пациентов с III-IV стадией НМКРЛ и I его стадией.

Несмотря на сходные закономерности изменения показателей в крови пациентов с различными гистологическими типами НМКРЛ, результаты проведенного ROC-анализа свидетельствуют о различной диагностической ценности их определения при АК и ПКРЛ. Диагностические параметры их определения в крови пациентов с АК и ПКРЛ указаны в таблице 2.

С целью повышения диагностической ценности показателей для выявления ранних стадий АК и ПКРЛ, дифференцирования их от поздних стадий, а также различия I и II стадий были созданы математические модели, разработанные на основе информативных лабораторных показателей в виде регрессионных уравнений.

Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, уровень ГК в сыворотке крови, а также плотность расположения CXCR1 в гранулоцитах оказались наиболее значимыми факторами, указывающими на наличие у пациента какой-либо из ранних (I - II) стадий ПКРЛ.

$$Y_1 = \frac{\exp(-31,4 + 0,29 * [\text{ГК}] + 1,45 * [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}] + 0,09 * [\text{MFI CXCR1(гранулоциты)}])}{1 + \exp(-31,4 + 0,29 * [\text{ГК}] + 1,45 * [\text{CXCR2, лимфоциты, \%}] + 0,09 * [\text{MFI CXCR1(гранулоциты)}])}$$

Здесь и далее: Y - вероятность прогнозирования у испытуемого искомого признака, exp – показательная функция, равная e<sup>x</sup>, где e - основание натурального логарифма (≈2,718).

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Диагностическая эффективность регрессионной модели, включающей вышеупомянутые показатели, возрастает на 11,1 – 18,5% в сравнении с таковой определения каждого из них в отдельности (таблица 2). Пороговое значение  $Y_1$  составила 0,59. Это значит, что у испытуемых со значением результативной переменной более 0,59, с соответствующей чувствительностью прогнозируется ПКРЛ, а при  $Y_1$  менее 0,59 можно исключить ПКРЛ с вероятностью, равной диагностической специфичности модели.

Те же самые показатели также вошли в регрессионную модель, позволяющую со сравнительно высокой эффективностью дифференцировать III-IV стадии ПКРЛ от I-II его стадии (уравнение  $Y_2$ , таблица 2).

$$Y_2 = \frac{\exp(-41,9 + 0,14 * [ГК] + 1,35 * [CXCR2, лимфоциты, \%] + 0,06 * [MFI CXCR1(гранулоциты)])}{1 + \exp(-41,9 + 0,14 * [ГК] + 1,35 * [CXCR2, лимфоциты, \%] + 0,06 * [MFI CXCR1(гранулоциты)])}$$

Совместное определение в крови пациентов уровня ГК и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, позволяет отличить II стадию ПКРЛ от I с чувствительностью 91,3% и специфичностью 95,8% при  $Y_3$ , равном 0,34 (таблица 4.3).

$$Y_3 = \frac{\exp(-23,2 + 0,21 * [ГК] + 0,87 * [CXCR2, лимфоциты, \%])}{1 + \exp(-23,2 + 0,21 * [ГК] + 0,87 * [CXCR2, лимфоциты, \%])}$$

В связи со значительными расхождениями в чувствительности и специфичности определяемых показателей при диагностике разных гистологических типов НМКРЛ, были разработаны отдельные диагностические модели для установления у пациентов АК. В регрессионное уравнение  $Y_4$ , позволяющее определить наличие у испытуемых I-II стадий АК, так же, как и в случае ПКРЛ, были включена доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, плотность расположения CXCR1 в гранулоцитах. и концентрация в сыворотке крови CYFRA 21-1 (таблица 2)

$$Y_4 = \frac{\exp(-22,2 + 4,9 * [CYFRA 21 - 1] + 0,66 * [CXCR2, лимфоциты, \%] + 0,15 * [MFI CXCR1(гранулоциты)])}{1 + \exp(-22,2 + 4,9 * [CYFRA 21 - 1] + 0,66 * [CXCR2, лимфоциты, \%] + 0,15 * [MFI CXCR1(гранулоциты)])}$$

Комбинация уровня CYFRA 21-1 в сыворотке крови испытуемых и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, также продемонстрировала высокую диагностическую эффективность при дифференцировании ранних и поздних стадий АК (уравнение  $Y_5$ , таблица 2).

$$Y_5 = \frac{\exp(-12,3 + 0,37 * [CYFRA 21 - 1] + 0,39 * [CXCR2, лимфоциты, \%])}{1 + \exp(-12,3 + 0,37 * [CYFRA 21 - 1] + 0,39 * [CXCR2, лимфоциты, \%])}$$



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

В то же время, доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, в сочетании с уровнем ГК в сыворотке крови, так же, как и при ПКРЛ, оказались наиболее информативны при отличии I и II стадий АК (таблица 2).

$$Y_6 = \frac{\exp(-27,3 + 2,41 * [ГК] + 1,35 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}])}{1 + \exp(-27,3 + 2,41 * [ГК] + 1,35 * [CXCR2, \text{лимфоциты, \%}])}$$

**Таблица 2.** - Диагностическая значимость индивидуального и комбинированного определения уровня ГК, MFI CXCR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, и CYFRA 21-1 в крови здоровых людей и пациентов с НМКРЛ

I-II стадии ПКРЛ/здоровые					
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
CXCR2 лимфоциты, %	9,4	77,8	98,4	0,837	83,9
MFI CXCR1, гранулоциты	10,9	98,3	61,1	0,799	76,6
ГК, нг/мл	19,1	76,0	94,7	0,883	84,0
<b>Комбинация (Y1)</b>	<b>0,59</b>	<b>95,7</b>	<b>93,7</b>	<b>0,954</b>	<b>95,1</b>
I-II стадии ПКРЛ/III-IV стадии ПКРЛ					
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
CXCR2 лимфоциты, %	22,5	68,9	98,4	0,800	81,1
MFI CXCR1, гранулоциты	44,2	87,5	90,3	0,876	87,0
ГК, нг/мл	23,2	97,6	66,7	0,764	76,2
<b>Комбинация (Y2)</b>	<b>0,64</b>	<b>93,1</b>	<b>93,3</b>	<b>0,956</b>	<b>93,5</b>
I стадия ПКРЛ/II стадия ПКРЛ					
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
CXCR2 лимфоциты, %	15,2	80,0	98,7	0,817	82,9
ГК, нг/мл	26,4	90,8	66,7	0,764	81,4
<b>Комбинация (Y3)</b>	<b>0,34</b>	<b>94,4</b>	<b>87,5</b>	<b>0,924</b>	<b>90,3</b>
I-II стадии АК/здоровые					
Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %
CXCR2 лимфоциты, %	9,5	93,2	52,4	0,815	76,8
MFI CXCR1, гранулоциты	10,9	98,3	61,1	0,799	76,6

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

СУFRA 21-1, нг/мл	2,8	72,2	89,7	0,808	82,3
<b>Комбинация (У4)</b>	<b>0,61</b>	<b>91,2</b>	<b>94,7</b>	<b>0,978</b>	<b>93,4</b>
<b>4.5</b>		I-II стадии АК/ III-IV стадии АК			
<b>Показатель</b>	<b>ПЗ</b>	<b>ДЧ, %</b>	<b>ДС, %</b>	<b>AUC</b>	<b>ДЭ, %</b>
СХСR2 лимфоциты, %	22,1	78,9	79,6	0,780	79,1
СУFRA 21-1, нг/мл	4,1	79,6	63,0	0,737	78,6
<b>Комбинация (У5)</b>	<b>0,15</b>	<b>94,7</b>	<b>91,2</b>	<b>0,923</b>	<b>90,1</b>
<b>4.6</b>		I стадия АК/II стадия АК			
<b>Показатель</b>	<b>ПЗ</b>	<b>ДЧ, %</b>	<b>ДС, %</b>	<b>AUC</b>	<b>ДЭ, %</b>
СХСR2 лимфоциты, %	11,8	98,2	41,7	0,667	66,8
ГК, нг/мл	25,1	61,5	94,6	0,785	76,2
<b>Комбинация (У6)</b>	<b>0,46</b>	<b>88,2</b>	<b>91,3</b>	<b>0,941</b>	<b>90,2</b>

Полученные результаты свидетельствуют о различной прогностической ценности определяемых показателей при разных гистологических типах НМКРЛ. Так, СУFRA 21-1 в комплексном использовании с другими показателями демонстрирует большую информативность в диагностике ранних стадий АК, в то время как MFI СХСR1 в гранулоцитах – при ПКРЛ.

Уровень ГК в сыворотке крови и MFI СХСR1 в гранулоцитах существенно повышают эффективность определения доли лимфоцитов, снабженных СХСR2, у пациентов с поздними стадиями ПКРЛ, в то время как при III-IV стадиях АК для достижения сопоставимой диагностической ценности достаточно комбинации этого показателя с уровнем в крови СУFRA 21-1.

Комбинация уровня в крови ГК и доли лимфоцитов, снабженных СХСR2, может использоваться в дополнительной оценке распространенности опухолевого процесса на ранних стадиях заболевания при обоих гистологических типах НМКРЛ.

### Список литературы

1. Brett C Bade. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology and Prevention // Clin Chest Med. 2020. Vol. 41, № 1. P. 1 – 24.
2. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances // Transl Lung Cancer Res. 2016. Vol. 5, № 3. P. 288-300.
3. Wang B. The comparison between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in lung cancer patients // J Cancer Res Clin Oncol. 2020. Vol 146, №1. P. 43 – 52.

4. Lui Q. The CXCR1/CXCR2 pathways in cancer // Cytokine Growth Factor Rev. 2016.Vol. 31. P. 61–71.

5. Sean Blandin Knight. Progress and prospects of early detection of lung cancer // Open Biol. 2017.Vol. 7, №9. P. 170070.

6. Pirinen R. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small cell lung cancer: increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma // Int J of Cancer, 2001. Vol. 95, №1. P. 2 – 17.

**КОВАЛЕНТНЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА:  
МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МИШЕНЯМИ, КВАНТОВО-  
МЕХАНИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ СВОЙСТВ**

**Мурина М. А.**

*д. м. н., профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия*  
*marina\_murina@mail.ru*

**Буравлёва К. В.**

*руководитель лаборатории экспресс-диагностики Медицинского научно-образовательного центра, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*  
*k.buravleva@bk.ru*

**Аносов А. К.**

*к. б. н., доцент кафедры общей и медицинской биофизики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*  
*aleksandr-anosov54@mail.ru*

**Рошчупкин Д. И.**

*д. м. н., профессор кафедры общей и медицинской биофизики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*  
*roshchupkin\_di@rsmu.ru*

*Обнаружен новый класс содержащих активный хлор соединений антиагрегатного и антитромботического действия, влияние которых на тромбоциты опосредуется химической модификацией серосодержащих групп плазматической мембраны. В число таких соединений, в частности, входят хлораминовые производные аминокислот, таурина и ряда его структурных аналогов. С помощью квантово-механической системы расчета параметров структуры содержащих активный хлор соединений предложены несколько новых веществ этой группы, являющихся структурными аналогами хлорамина аденозина. Рассчитаны предполагаемые параметры связывания этих аналогов с рецепторами АДФ тромбоцитов.*

**Ключевые слова:** *тромбоциты; ковалентные ингибиторы; структурные аналоги хлорамина аденозина; квантово-механические расчеты*

**COVALENT PHARMACOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES:  
MECHANISM OF INTERACTION WITH TARGETS, QUANTUM-  
MECHANICAL CALCULATION OF PROPERTIES**

***Murina M. A.***

*Doctor of Biological Sciences, Professor, Federal Research and Clinical  
Centre of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of the  
Russian Federation, Moscow, Russia  
marina\_murina@mail.ru*

***Buravleva K. V.***

*Head of the laboratory of express diagnostics Medical Research and Education  
Center of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
k.buravleva@bk.ru*

***Anosov A. K.***

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of  
General and Medical Biophysics, Federal State Budgetary Educational Institution of  
Higher Education "Russian National Research Medical University named after N.I.  
Pirogov "Ministry of Health of the Russian Federation", Moscow, Russia  
aleksandranosov54@mail.ru*

***Roshchupkin D.I.***

*Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of General and  
Medical Biophysics, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher  
Education "Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov  
"Ministry of Health of the Russian Federation", Moscow, Russia  
roshchupkin\_di@rsmu.ru*

*A new class of compounds containing active chlorine with antiaggregate and  
antithrombotic action was discovered, the effect of which on platelets is mediated by  
chemical modification of sulfur-containing groups of the plasma membrane. These  
compounds, in particular, include chloramines derivatives of amino acids, taurine and  
a number of its structural analogs. Using a quantum-mechanical system for calculating  
the structure parameters of compounds containing active chlorine, several new  
substances of this group have been proposed, which are structural analogs of  
adenosine chloramine. The estimated parameters of binding of these analogs to platelet  
ADP receptors were calculated.*

*Keywords: platelets; covalent inhibition; structural analogs of chloramine  
adenosine; quantum mechanical calculations*

Для борьбы с сердечно-сосудистыми болезнями огромное значение имеет предупреждение внутрисосудистого тромбообразования. Начальным моментом артериального тромбоза выступает процесс активации и агрегации тромбоцитов. В настоящее время для предупреждения артериальных тромбозов широко используются лекарственные соединения ковалентного (химического) типа действия. Это ацетилсалициловая кислота (аспирин), которая необратимо

инактивирует циклооксигеназу 1 путем ацилирования остатка серина 530 в активном центре [1], а также тиенопиридины (клопидогрел, прасугрел), метаболиты которых химически модифицирует тиольную группу пуринового рецептора P2Y<sub>12</sub>, который специфически связывает индуктор агрегации тромбоцитов АДФ [2]. Важно отметить особенности действия ковалентных ингибиторов, во-первых, модификация молекулярных мишеней носит перманентный характер, во-вторых, для ингибиторов характерно сложение дробных доз, поэтому терапевтический эффект достигается применением небольших количеств, это обеспечивает ослабление побочного действия.

Нами обнаружен новый класс ковалентных антиагрегантов, в структуру которых входит активный хлор: хлораминовые производные аминокислот, таурина и ряда его структурных аналогов (N-ацильные и N-алкильные аналоги N-хлортаурина, N-ацетильное производное N-хлор-2,2-диметилтаурина и др.) [3-5]. Аминокислотные хлорамины являются соединениями природного типа. Они образуются активированными фагоцитами: в реакции, катализируемой миелопероксидазой, синтезируется гипохлорит (в равновесии с хлорноватистой кислотой), который реагирует с соединениями, имеющими аминогруппу. Хлораминовые соединения обладают выраженной способностью химически модифицировать серосодержащие группы аминокислот, пептидов и белков. Установлено, что многие поверхностные рецепторы тромбоцитов содержат серосодержащие группы. В частности, в пуриновом (P2Y<sub>1</sub> и P2Y<sub>12</sub>) рецепторах имеются тиольные (сульфгидрильные) группы, целостность которых критична для активации тромбоцитов и их последующей агрегации. Поэтому можно полагать, что антиагрегантное действие органических хлораминов сопряжено с модификацией серосодержащих групп атомов пуриновых рецепторов. Мы предположили, что эффективность действия хлораминового антиагреганта резко увеличится, если он вначале специфически связывается с мембраной и уже в этом состоянии необратимо модифицирует тромбоцит. Целью нашей работы было выяснение возможности создания хлораминового ингибитора тромбоцитов повышенной эффективности, которая обусловлена первичным связыванием с клетками. В связи с этим предположением мы обратились к аденозиновым соединениям, так как известно, что тромбоциты имеют на внешней поверхности специфически рецепторы к аденозину. В работе была поставлена задача: разработать расчетные квантово-механических критерии реакционной способности новых структурных аналогов хлорамина аденозина.

Проведено компьютерное вычислительное исследование физико-химических свойств синтезированных хлораминов и ряда экспериментально еще неполученных аналогов. Во всех расчетах использовали пакет программ ChemBio 3D Ultra 14.0 (Cambridgesoft). С помощью модуля GAMESS (General Atomic and Molecular Electronic Structure System) изучали свойства, обусловленные электронным строением молекул. В этом случае проводили оптимизацию геометрии и полной энергии молекул квантово-механическим *ab initio* методом B3LYP (вариант общего метода DFT)/6-31G(d,p); водное окружение

моделировали поляризуемым континуумом. Расчеты площадей поверхностей молекул и трехмерные поверхности, доступные для растворителя, осуществляли программами, интегрированными в общий пакет. При этом пространственные структуры молекул были вначале оптимизированы, как сказано выше. Для расчета коэффициентов распределения исследуемых соединений в системе октанол-вода использовали модуль CLogP Driver. Получено, что коэффициент распределения в системе октанол-вода у хлораминовых производных существенно ниже, чем у родительских соединений. Другими словами, хлораминовая группа повышает гидрофильность соединений. Можно предполагать, что у хлораминовых производных структурных аналогов аденозинов сохранится, а может быть усилится способность к связыванию с соответствующими рецепторами тромбоцитов, так как этот процесс происходит в наружной полярной части рецептора. Рассчитанные площади молекулярной поверхности, доступные для растворителя, у аденозиновых соединения и их хлораминовых производных отличаются мало. Выходит, что и этот структурный показатель не отвергает возможность взаимодействия исследуемых хлораминовых соединений с клеточными рецепторами.

Представляет большой интерес поиск расчетных молекулярных характеристик, которые могли бы предсказывать реакционную активность изучаемых хлораминов. В этом направлении была изучена корреляция молекулярных дипольных моментов и зарядов на атоме хлора с константами скоростей реакции с дитиотреитолом (удобная модель тиолов). Расчеты проводили после оптимизации геометрии и полной энергии молекул. Специальный анализ показал, что дипольные моменты хлораминов аденозиновых соединений и аденозинфосфатов никак не коррелируют с величинами констант скоростей. Наблюдается, но слабая, корреляция с собственной молекулярной массой.

Получены данные расчетов малликеновых зарядов на атомах хлора в хлораминах адениновых аденозиновых соединений. Наблюдается общая закономерность: величина заряда при введении в аминогруппу алкильного заместителя уменьшается, а при ее ацилировании – увеличивается. Между измеренными величинами констант скоростей и расчетными величинами зарядов наблюдается существенная корреляция в виде экспоненциальной зависимости.

Для группы соединений, включающей ряд структурных аналогов хлораминов аденозинов, уравнение корреляции имеет вид:

$$k = 0,9 \exp(113,3q); R^2 = 0,98.$$

В случае хлорамина таурина и его структурных аналогов, которые ранее нами были изучены в иных условиях и которые имеют константу скорости меньше  $25000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , получено уравнение

$$k = 50,9 \exp(60,1q); R^2 = 0,9773.$$

В приведенных уравнениях  $k$  – численное значение константы скорости реакции хлораминовых соединений с дитиотреитолом (единица измерения  $1 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ );  $q$  – численное значение расчетного малликенового заряда на атоме хлора.

Можно заключить, что на основе квантовомеханического расчета заряда на атоме хлора получаем возможность целенаправленно синтезировать хлораминовые соединения с нужной реакционной активностью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00532).

This work was partially supported by Russian Foundation for Basic Research, a grant no. 20-04-00532.

### Список литературы

1. Undas A., Brummel-Ziedins K.E., Mann K.G. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood*, 2007, 109 (6), 2285-2292.
2. Ferri N., Corsini A., Bellosta S. Pharmacology of the New P2Y12 Receptor Inhibitors: Insights on Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties. *Drugs*. 2013, 73, 1681–1709.
3. Рощупкин Д.И., Кондрашова К.В., Мурина М.А. Молекулярные характеристики структурных аналогов хлорамина таурина и предсказание их реакционных свойств. *Биофизика*, 2014, 59 (6), 1045-1050.
4. Рощупкин Д.И., Буравлева К.В., Мурина М.А., Сергиенко В.И. Флуорометрическое изучение модификации сывороточного альбумина структурными аналогами хлорамина таурина. *Биофизика*, 2017, 62 (1), 31-38.
5. Рощупкин Д.И., Сорокин В.Л., Семенкова Г.Н., Буравлева К.В., Мурина М.А. Свойства биологически значимых хлораминовых оксидантов: реакционная активность и ее зависимость от структуры функциональной группы атомов. *Биофизика*, 2019, 64 (2), 213–224.



**ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ОКИСЛЕНИЕМ И  
НЕКОТОРЫМИ МОРФОМЕТРИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ  
СЛИЗИСТОЙ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ  
ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ В ДОЗЕ 1 ГР**

*Мышковаец Н.С.*

*ассистент кафедры биологической химии учреждения образования  
«Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Беларусь  
jasjan@mail.ru;*

*В данной статье описаны результаты исследования по влиянию внешнего облучения в дозе 1 Гр на уровень митохондриального окисления кишечной слизи. Изучена взаимосвязь между изменением интенсивности эндогенного дыхания и морфометрическими характеристиками слизи тонкого кишечника в разные сроки после однократного внешнего облучения в дозе 1Гр. Показано негативное влияние на изучаемые параметры внешнего облучения.*

***Ключевые слова:** тонкий кишечник; митохондриальное окисление; толщина кишечной слизи; внешнее облучение*

**THE RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIAL OXIDATION  
AND SOME MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE SMALL  
INTESTINE MUCOSA AT VARIOUS TIMES AFTER IRRADIATION AT A  
DOSE OF 1 GY**

*Myshkovets N.S.*

*Assistant of the Department of Biological Chemistry of the educational  
institution "Gomel State Medical University",  
Gomel, Belarus jasjan@mail.ru;*

*This article describes the results of a study on the effect of external radiation at a dose of 1 Gy on the level of mitochondrial oxidation of the intestinal mucosa. The relationship between changes in the intensity of endogenous respiration and morphometric characteristics of the small intestine mucosa at different times after a single external irradiation at a dose of 1 G was studied. The negative influence on the studied parameters of external irradiation is shown.*

***Keywords:** small intestine; mitochondrial oxidation; intestinal mucosa thickness; external irradiation*

Многие диагностические и лечебные процедуры включают методики, связанные с облучением брюшной полости. Одной из наиболее радиочувствительных тканей при этом оказывается слизистая тонкого кишечника. Поскольку кишечный эпителий обладает высокой пролиферативной активностью, относится к тканям с интенсивным кровоснабжением и оксигенацией. Высокий уровень пролиферации способен обеспечить

непрерывное обновление энтероцитов и их внутриклеточных структур. Однако, при облучении возможно повреждение также криптогенных клеток слизистой, в связи с чем происходит неполное восстановление эпителиального слоя, результатом могут явиться нарушения основных функций кишечной слизистой. Эффективность репаративных процессов, являющаяся исключительно энергозатратным механизмом, зависит от состояния митохондриального окисления ткани. Уровень эндогенного дыхания любой ткани считается интегральным показателем, позволяющим оценить целостность митохондриальных мембран, количественное соотношение внутримитохондриальных субстратов тканевого дыхания, активность транспортных систем и дегидрогеназ дыхательной цепи.

Соответственно целью исследования явилось изучение уровня эндогенного дыхания препаратов тонкого кишечника и некоторых морфометрических показателей кишечной слизистой: толщина слизистой оболочки (ТСО), глубина крипт, высота покровного эпителия и собственная пластинка слизистой оболочки в разные сроки после воздействия однократного внешнего облучения в дозе 1 Гр. В данной статье рассмотрена взаимосвязь между уровнем эндогенного дыхания и толщиной слизистой оболочки тонкого кишечника в различные сроки после внешнего  $\gamma$ -облучения в дозе 1 Гр.

Исследование проводилось на 75 беспородных крысах самцах массой 180 – 200 г, разделенных на контрольную и опытную группы. Опытную группу животных однократно облучили на установке «ИГУР-1», источник  $^{137}\text{Cs}$  в дозе 1 Гр, мощность дозы 0,92 Гр в минуту. Контрольная группа животных содержалась в стандартных условиях вивария. При проведении экспериментов были соблюдены принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского сообщества и Хельсинкской декларации, и требования правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Животных декапитировали на 3-е, 10, 30, 40, 60 и 90 сутки после облучения. Исследуемые образцы получали из тонкой кишки, которую изолировали (первые 10 см от желудка), выворачивали «наизнанку», отмывали охлажденным физиологическим раствором, делили на равные отрезки (1,5 – 2 мм). Изучение параметров тканевого дыхания проводили полярографическим методом на устройстве Record 4 (РФ) в ячейке объемом 2 мл закрытым платиновым электродом Кларка при 25 °С [1]. Скорость дыхания фрагментов кишечника на эндогенных субстратах ( $V_{\text{энд}}$ ) выражали в нмоль атом кислорода за 1 минуту на мг белка. Содержание белка в препаратах тонкого кишечника определяли биуретовым методом. Гистологические срезы, окрашенные по общепринятым методикам, исследовались современными морфометрическими программами. Статистически результаты обрабатывали с использованием непараметрических критериев (программы GraphPad Prism 4 и Excel).

Полученные в результате исследования данные по влиянию внешнего  $\gamma$ -облучения в дозе 1 Гр на изучаемые показатели представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Уровень эндогенного дыхания фрагментов тонкого кишечника и толщина слизистой оболочки в различные сроки после внешнего  $\gamma$ -облучения в дозе 1 Гр

Сутки после внешнего $\gamma$ -облучения в дозе 1Гр	Уровень эндогенного дыхания, нмоль $O_2$ /мин $\times$ мг белка		Толщина слизистой оболочки, мм	
	Контрольная группа (n = 25)	Опытная группа (n = 50)	Контрольная группа (n = 25)	Опытная группа (n = 50)
3 – ие	10,08 $\pm$ 2,07	<b>6,46 <math>\pm</math> 0,92*</b>	2,36	2,50
10 – ые		<b>14,87 <math>\pm</math> 3,84</b>		2,59
30 – ые		<b>7,16 <math>\pm</math> 1,19</b>		2,34
40 – ые		<b>13,96 <math>\pm</math> 1,49*</b>		1,88
60 – ые		<b>13,33 <math>\pm</math> 1,91</b>		2,92
90 – ые		<b>14,66 <math>\pm</math> 1,76*</b>		2,76

Примечание: \* -  $p < 0,05$

Проведённое исследование показало высокий уровень дыхательной активности препаратов кишечника контрольной группы животных ( $V_{энд}$  10,08  $\pm$  2,07 нмоль  $O_2$ /мин $\times$ мг белка). Важно отметить, что эксперимент проводился на тканевых фрагментах, показатели тканевого дыхания которых наиболее точно соответствуют физиологическим условиям функционирования органа. Высокий уровень эндогенного дыхания ткани свидетельствует в пользу интактности препарата [2].

В течение первых дней после облучения в тонкой кишке развивается ряд метаболических нарушений: расстройства микроциркуляции, изменения в строении ворсинок и крипт, структуре и свойствах апикальной и базолатеральной мембранх энтероцитов, что может привести к некрозу и возникновению эрозий [3]. На 3 сутки после радиационного воздействия в дозе 1 Гр скорость дыхательной активности на эндогенных субстратах достоверно снижалась ( $V_{энд}$  6,46  $\pm$  0,92 нмоль  $O_2$ /мин $\times$ мг белка) по сравнению с контролем. При этом у облучённых животных наблюдалось некоторое утолщение слизистой оболочки: с 2,36 мм в контроле до 2,50 мм в опытной группе. Угнетение скорости митохондриального окисления может быть связано, по нашему мнению, с истощением внутриклеточных субстратов эндогенного дыхания или собственно количества энтероцитов под действием внешнего  $\gamma$ -облучения в дозе 1 Гр. Наблюдаемое при этом увеличение ТСО может являться адаптационной реакцией, необходимой для компенсации дефицита эндогенных субстратов.

На 10 сутки наблюдалась стимуляция дыхательной активности ( $V_{энд}$  14,87  $\pm$  3,84 нмоль  $O_2$ /мин $\times$ мг белка), что может объясняться усилением репаративных процессов и соответственно увеличением кровоснабжения и оксигенации кишечника в указанные сроки после облучения. Предположительно при данном

воздействии в значительной мере активизируется фагоцитоз, который сопровождается «респираторным взрывом» – резким (2-х – 3-х кратным) увеличением потребления кислорода фагоцитирующими клетками [4].

На 40 сутки отмечалась достоверная стимуляция митохондриального окисления, при этом уровень дыхания на эндогенных субстратах составил  $13,96 \pm 1,49$  нмоль  $O_2$ /мин $\times$ мг белка. Данная тенденция сохранялась и в более поздние сроки эксперимента: изучаемый показатель оставался повышенным через два и три месяца после радиационного воздействия. Также отмечалось дальнейшее утолщение ТСО до 2,92 мм максимально на 60 сутки эксперимента. Минимальная толщина слизистой оболочки составила 1,88 мм на 40-е сутки после облучения, что указывает на значительные морфологические изменения именно в данный период после облучения. Статистически достоверных отличий ТСО в эксперименте не было выявлено. Однако можно предположить, что наблюдаемое утолщение кишечной слизистой на определённых этапах эксперимента является определённым морфологическим признаком активации компенсаторно-приспособительных механизмов тонкой кишки, направленных на увеличение и усиление кишечного барьера.

Важным звеном радиационно-индуцированного повреждения энтероцитов является нарушение процессов митохондриального окисления, что обусловлено исключительно высокой энергозатратностью репаративных процессов. Наблюдаемые после облучения в дозе 1 Гр изменения уровня эндогенного дыхания и морфометрических параметров фрагментов кишечной слизистой с течением времени носят немонотонный характер: выявлено двухфазное увеличение митохондриальной активности на 10 и 40 сутки.

### **Список литературы**

1. Франк Г. М. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., 1973.
2. Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.]; под ред. проф. А. А. Чиркина. – Минск: Выш. шк., 2013. – 491 с.
3. Хижняк С. В. [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39, №6. С. 644-647.
4. Droge W. // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82, №1. P. 47-95.

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ТИМОЦИТОВ  
КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПРИ ДЕЙСТВИИ  
ПЕРОКСИНИТРИТА**

**Никитина И.А.,**

*к. б. н., заведующая кафедрой биологической химии учреждения  
образования «Гомельский государственный медицинский университет», г.  
Гомель, Беларусь  
nikkitina@gmail.com;*

**Грицук А.И.**

*д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и технологии  
лекарств Одесского национального университета имени И.И. Мечникова, г.  
Одесса, Украина;*

*Для выяснения роли возрастных особенностей ответной реакции клеток  
иммунной системы на действие провоспалительного (окисляющего) агента,  
изучено влияние пероксинитрита (30 мкМ) на процессы тканевого дыхания  
timoцитов у крыс 3- и 8-месячного возраста. С помощью полярографического  
метода было установлено, что воздействие экстремального стресс-  
вызывающего фактора – окисляющего агента пероксинитрита – вызывает  
различный отклик в системах утилизации кислорода в тимоцитах крыс разного  
возраста.*

*Ключевые слова: тимоциты; возраст; пероксинитрит; цитоскелет;  
воспаление*

**AGE RELATED ALTERATION OF ENERGY METABOLISM IN  
THYMOCYTES OF RATS UNDER EXPOSURE TO PEROXYNITRITE**

**Nikitina I.A.,**

*Candidate of Biological Sciences, Head of the Department of Biological  
Chemistry of the Educational Institution "Gomel State Medical University", Gomel,  
Belarus*

*nikkitina@gmail.com;*

**Gritsuk A.I.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of  
Pharmacology and Drug Technology of the Odessa I.I. Mechnikov National  
University, Odessa, Ukraine;*

*Influence of peroxy nitrite (30 μM) on tissue respiration in thymocytes of 3- and  
8-month rats was studied with aim to reveal importance of ageing processes in changes  
of immune system cells response to proinflammatory (oxidizing) agent. Polarography  
method allows us to establish that extreme stress factor – oxidizing agent peroxy nitrite  
– induce discrepant response in the oxygen utilization systems of rats with different  
age.*

*Key words: thymocyte, age, peroxy nitrite, cytoskeleton, inflammation*

Гипотеза D.C. Wallace о том, что эффективная функциональная активность тканей возможна лишь при адекватном их энергообеспечении подтверждается многими авторами [2, 7, 11, 12, 15, 17], а также работами, согласно которым возрастная иммуносупрессия и нарушение клеточного звена иммунитета при воздействии стрессовых факторов сопровождается существенным снижением активности митохондриального окисления тимуса и других иммунокомпетентных органов [9, 10, 11, 13].

Митохондрии являются не только основным поставщиком АТФ в клетке, но и главным продуцентом активных форм кислорода (АФК) и их разновидностей – активных форм азота (АФА) [1, 8], вызывающих повреждение митохондриальной ДНК, нарушение дыхательной активности ткани и другие негативные последствия. Пероксинитрит, взаимодействует с диоксидом углерода, концентрация которого в матриксе довольно высока, образуя радикалы  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  и  $\text{NO}_2$ , принимающие активное участие в развитии митохондриальной дисфункции, проявлением которой является деэнергизация клетки, нарушение гомеостаза ионов кальция, открытие пор повышенной проводимости и инициация апоптоза [13, 14, 15].

Очевидным проявлением старения является развитие иммунодепрессии, ведущую роль, в формировании которой играют возрастные нарушения в сфере энергетического гомеостаза организма [3]. Проблема возрастных изменений в системе митохондриального окисления иммунокомпетентных клеток остается малоизученной [11, 17], несмотря на ее исключительный научно-практический интерес, обусловленный перспективой разработки и использования эффективных средств иммунокоррекции.

**Цель работы:** проанализировать особенности ответной реакции системы тканевого дыхания тимоцитов крыс разного возраста (3 и 8 месяцев) на действие пероксинитрита.

**Материалы и методы.** Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 года.

Исследования проводили на белых беспородных крысах двух возрастных групп: 3 месяца и 8 месяцев. Суспензии клеток обрабатывали пероксинитритом в концентрации 30 мкМ в течение 3 минут с последующей отмывкой. Пероксинитрит получали в реакции  $\text{NaNO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в кислых водных растворах с последующим быстрым их защелачиванием [16].

В клеточных препаратах изучали показатели тканевого дыхания (ТД) и окислительного фосфорилирования (ОФ) на установке Record 4 (ИТЭБ РАН, Пущино, Россия) в ячейке объемом 1 мл с закрытым платиновым электродом Кларка при температуре 27°C в растворе Хэнкса [4]. Образцы суспензии клеток тимуса каждого животного исследовали в трехкратной повторности. Скорость

поглощения кислорода тканевыми препаратами выражали в нмоль  $O_2$  за 1 мин  $\times 10^7$  клеток. Определение количества клеток производили стандартным методом подсчета в камере Горяева. Так как многие используемые в эксперименте субстраты не могут свободно проникать сквозь клеточную мембрану [17], в эксперименте использовали тимоциты, предварительно пермеабилizированные дигитонином (2 мМ). Состояние энергетического обмена исследуемой ткани определяли по скорости потребления кислорода тимоцитами на эндогенных субстратах ( $V_{энд}$ ), а также с использованием субстратов дыхания: сукцинат, 5 мМ ( $V_{як}$ ) и глутамат 5 мМ ( $V_{глу}$ ). Также оценивали параметры митохондриального дыхания при ингибировании первого комплекса дыхательной цепи амиталом (5 мМ). Для оценки дыхательного контроля добавляли АДФ в концентрации 50 мМ. Вклад митохондриального дыхания в общее потребление кислорода клеткой определялся путем титрования азидом натрия ингибирующей дыхательную цепь митохондрий на уровне цитохромоксидазы. Азид натрия вносился титрометрически 4-5 порциями, непосредственно в полярографическую ячейку, до максимального падения уровня потребления кислорода [5]. «Остаточный», резистентный к азиду, кислород составляет немитохондриальный поток клеточного кислорода (не используемый для работы дыхательной цепи митохондрии). Разница между общим потреблением кислорода на эндогенных субстратах и кислородом, потребление которого сохраняется после ингибирования азидом натрия, является вкладом митохондриальной электрон-транспортной цепи в утилизацию кислорода.

Данные представлены с использованием медианы и границ верхнего и нижнего квартилей. Оценку достоверности различий между средними выборочными значениями проводили с помощью критерия Манна–Уитни (для независимых переменных). Различия между средними выборочными значениями признавали достоверным при  $p < 0,05$ .

**Полученные результаты.** Средняя скорость эндогенного дыхания тимоцитов у 3-месячных крыс составила 5,8; 5,0–7,1 нмоль  $O_2$ /мин  $\times 10^7$  клеток и практически не отличалась от соответствующего показателя у 8-месячных животных 5,7; 4,6–6,7 нмоль  $O_2$ /мин  $\times 10^7$  клеток. При этом величины верхнего и нижнего квартилей указывают на наличие тенденции к снижению с возрастом скорости митохондриального дыхания иммунокомпетентных клеток. Этот факт согласуется с известными данными литературы [17].

При добавлении к суспензии клеток глутамата натрия – восстанавливающего первый комплекс электротранспортной цепи, дыхательная активность тимоцитов 3-месячных животных возрастает более чем на 35%, тогда как в тимоцитах 8-месячных животных изменения незначительны. Полученные данные косвенно указывают на возрастную разницу в активности глутаматдегидрогеназы в условии избыточного количества субстрата в клетках тимуса. В то же время, ранние исследования Cittadini и др. [6] показали отсутствие стимулирующего действия глутамата на тканевое дыхание

тимоцитов крысы, которое, по нашему мнению, связано с использованием непермеабилезованных клеток, обладающих, как известно, более медленным мембранным транспортом глутамата. Добавление в среду инкубации АДФ изменяет соотношение АТФ/АДФ, но не вызывает значимого увеличения уровня дыхательной активности в тимоцитах как 3-х, так и 8-месячных животных. Ответ системы ТД и ОФ в тимоцитах на введение АДФ менее выражен, чем ответ на действие солей глутаминовой кислоты. При этом сохраняются достоверные различия в уровне митохондриального дыхания тимоцитов 3- и 8-месячных животных после последовательного введения АДФ.

Ингибиторный анализ с использованием амитала позволил количественно оценить функциональную активность первого комплекса дыхательной цепи. В присутствии амитала уровень митохондриального дыхания уменьшается на 49% и 43% соответственно для 3-х и 8-месячных крыс, что отражает несколько более высокий вклад первого комплекса в систему митохондриального дыхания тимоцитов молодых животных.

Введение сукцината на фоне ингибирования первого комплекса дыхательной цепи дает возможность косвенно оценить обеспеченность эндогенными субстратами, а также активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и второго дыхательного комплекса. Полученный результат указывает на относительно высокую активность СДГ в тимоцитах животных старшей возрастной группы. Таким образом, субстратный и ингибиторный анализ митохондриального окисления косвенно указывают на относительно большую активность первого комплекса в тимоцитах 3-месячных животных и второго дыхательного комплекса – в тимоцитах 8-месячных.

Пероксинитрит уменьшает уровень эндогенного дыхания в тимоцитах 3-месячных животных почти на 17%. При этом, несмотря на уменьшение скорости потребления кислорода, система тканевого дыхания тимоцитов 3-месячных животных сохраняет «запас прочности» и способность увеличивать уровень дыхания в ответ на добавление глутамата и АДФ. Так, введение экзогенного глутамата повышает потребление кислорода тимоцитами 3-месячных животных на 40%, а изменение отношения АТФ/АДФ приводит к росту интенсивности тканевого дыхания еще на 5%.

Интенсивность тканевого дыхания тимоцитов 8-месячных животных в ответ на действие пероксинитрита практически не изменяется и составляет 5,9; 5,0–6,4 нмоль  $O_2$ /мин на  $10^7$  клеток. Необходимо отметить, что рост потребления кислорода тимоцитами данной группы животных в ответ на введение экзогенного глутамата соизмерим с таковым в одновозрастном контроле и остается в 5 раз ниже по сравнению с аналогичными показателями у 3-месячных животных. Воздействие пероксинитрита приводит к тому, что стимулирование дыхательной активности АДФ на фоне избыточного содержания субстратов первого комплекса у 8-месячных животных на 8% ниже, чем у контрольных животных. В тимоцитах 3-месячных крыс после обработки пероксинитритом воздействие амитала приводит к уменьшению уровня тканевого дыхания на 45%,



а у 8-месячных – на 61%. Воздействие пероксинитрита приводит к возрастанию роли сукцината в обеспечении работы дыхательной цепи, что выражается в увеличении дыхательной активности клеток при его введении в среду. У 8-месячных животных этот показатель возрастает на 25% (в 2,5 раз выше, чем в одновозрастном контроле), а у 3-х месячных на 28% (более чем в четыре раза выше в сравнении с контрольными значениями той же возрастной группы).

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии возрастных изменений общего уровня энергетического метаболизма тимоцитов крыс. В то же время, после увеличения нагрузки на электрон-транспортную систему, путем введения АДФ и субстратов первого и второго дыхательных комплексов, появляется разница в ответной реакции.

**Заключение.** Скорость митохондриального дыхания интактных тимоцитов 3- и 8-месячных животных не имеет значимых различий. Методами субстратного и ингибиторного анализа выявлено возрастное снижение вклада в дыхательную активность тимоцитов первого комплекса дыхательной цепи митохондрий и увеличение – второго. Обработка изолированных тимоцитов 3- и 8-месячных животных 30 мкМ ONOO<sup>-</sup>, инициирующего провоспалительный эффект, стимулирует в них активность II комплекса дыхательной цепи.

### Список литературы

1. Андреев, А.Ю., Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарера, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70, №2. – С. 246–264.
2. Грицук, А.И. Влияние инкорпорированных радионуклидов цезия на ультраструктуру и процессы тканевого дыхания митохондрий кардиомиоцитов / А. И. Грицук [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси Сер. мед.-биол. Наук. – 2002. – № 2. – С 63–70.
3. Дильман, В.М. Большие биологические часы / В. М. Дильман. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М. : Знание, 1986. – 256 с.
4. Кондрашова М.Н., Ананенко А. А. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М., 1973. – 119 с.
5. Brown, G.C. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells / G. C. Brown // The Biochem. J. – 1992. – Vol. 284, pt. 1. – P. 1–13.
6. Cittadini, A. Energy metabolism of isolated rat thymus cells / A. Cittadini [et al.] // Molecular and Cellular Biochemistry. – 1975. – Vol. 8, № 1. – P. 49–57.
7. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function / W. Dröge // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47-95.
8. Elfering, S.L. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase / S.L. Elfering, T.M Sarkela, C.J. Giulivi // Biol Chem. – 2002. – Vol. 277(41), № 11. – P. 38079–38086.
9. Gnaiger, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control / E Gnaiger. – 1st edition. – Innsbruck: OROBOROS INSTRUMENTS GmbH, 2007. – P. 98.

10. Gagnon, Ch. Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes and lymphocytes challenged with lipopolysaccharide / Ch. Gagnon, A.L. Francois, G.F. Jaènos // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 431. – P. 107-110.
11. Mather, M. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria / M. Mather, H. Rottenberg // Biochem Biophys Res Commun. – 2000. – Vol. 273(2), №5. – P. 603-608.
12. Pon, L.A. Mitochondria / L.A. Pon, E.A. Schon // Methods in Cell Biology. – 2007. – Vol. 80. – P. 451–464.
13. Radi, R. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria / R. Radi [et al.] // Free Radical Biology & Medicine. – 2002. – Vol. 33, №11. – P. 1451–1464.
14. Radi, R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. / R. Radi, A. Cassina, R. Hodara // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 383. – P. 401–409.
15. Radi, R. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria / R. Radi [et al.] // Free Radical Biology & Medicine. – 2002. – Vol. 33, №11. – P. 1451–1464.
16. Robinson, K.M. Synthesis of Peroxynitrite from Nitrite and Hydrogen Peroxide / K.M. Robinson, J.S. Beckman // Methods in Enzymology. – 2005. – Vol. 396. – P. 207–214.
17. Rottenberg, H. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition. / H. Rottenberg, S. Wu. // Biochem Biophys Res Commun. – 1997. – Vol. 240 (1), № 7. – P. 68-74.

**НОВЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ  
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСТВОРИМОГО  
РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА**

***Пашкова О.Л.***

*старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии антител и цитокинов государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь  
pashkova@blood.by;*

*В данной статье рассмотрена технология разработки иммуноферментной тест-системы на основе использования пары собственных мышиных моноклональных антител к растворимому рецептору трансферрина человека. Показана эффективность и чувствительность данного набора реагентов для количественного определения растворимого рецептора трансферрина, сравнимость с коммерческим набором.*

***Ключевые слова:*** *растворимый рецептор трансферрина; моноклональное антитело; иммуноферментный анализ; дифференциальный диагноз; анемия*

**A NEW IMMUNO-ENZYMATE SET OF REAGENTS FOR  
QUANTITATIVE DETERMINATION OF SOLUBLE TRANSFERRIN  
RECEPTOR**

***Pashkova O.L.***

*Senior Researcher of the Laboratory of Biotechnology of Antibodies and Cytokines of the State Institution "Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus  
pashkova@blood.by;*

*This article discusses the technology for the development of an immunoassay test system based on the use of a pair of own mouse monoclonal antibodies to the soluble human transferrin receptor. It was shown the efficacy and sensitivity of this reagent kit for the quantitative determination of the soluble transferrin receptor as well as its comparable to the commercial kit.*

***Key words:*** *soluble transferrin receptor; monoclonal antibody; linked immunosorbent assay; differential diagnosis; anemia*

Любое заболевание, патологический процесс, а также ряд физиологических нарушений в организме человека в той или иной степени отражаются как на количественных характеристиках, так и на физико-химических свойствах компонентов крови и биологических жидкостей. Поэтому поиск специфических биомаркеров патологического процесса, которые позволили бы проводить не только диагностику того или иного заболевания, но и дифференцировать патогенетически близкие патологии, является актуальной задачей. На сегодняшний день, к такому специфическому иммунохимическому

биомаркеру относят растворимый рецептор трансферрина (sTfR). sTfR – это 85 кДа олигопептидная цепь, продуцируемая в результате протеолитического расщепления трансмембранного рецептора трансферрина 1 (190 кДа гликопротеина), который, в первую очередь, экспрессируется на поверхности клеток (в 80% случаев на эритроцитах), нуждающихся в железе. Считается, что концентрация sTfR в сыворотке крови отражает плотность рецепторов трансферрина на поверхности клеток и их общее количество, поэтому они тесно связаны с потребностями клеток в железе и скоростью пролиферации эритроидных клеток [1]. Таким образом, растворимый рецептор трансферрина становится одним из альтернативных параметров для оценки “статуса железа”, который, в отличие от классических биомаркеров – ферритина и трансферрина, в большинстве случаев не проявляет зависимости от наличия воспаления или хронических заболеваний, которые могут отягощать этиопатогенез анемий разной нозологии.

Несмотря на то, что о существовании рецептора трансферрина известно довольно давно, только сейчас определение его концентрации входит в лабораторную практику. Широкое распространение лабораторных тестов для выявления sTfR в Республике Беларусь сдерживается высокой стоимостью импортных диагностических наборов, а отечественного диагностикума нет. Тогда как в странах Евросоюза, США и России данный тест широко востребован и используется как для диагностики железодефицитной анемии, так и для дифференциальной диагностики данного типа анемии и анемии хронических заболеваний [2].

Целью нашего исследования явилась разработка отечественной иммуноферментной диагностической тест-системы для количественного определения растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови человека на основе использования пары мышинных моноклональных антител к sTfR.

Чтобы сделать количественный анализ растворимого рецептора трансферрина доступным для клинико-диагностических лабораторий, мы остановили свой выбор на иммуноферментном анализе (ИФА) из-за уникальной специфичности иммунохимической реакции, т.е. моноклональные антитела (МКА) связываются исключительно с определёнными антигенами. Имеет значение высокая стабильность реагентов, простота методов регистрации, возможность создания каскадных систем усиления различных химических сигналов, относительно низкая цена и удобство использования в клинико-лабораторной практике.

В ходе исследования были использованы инбредные линии мышей Balb/c из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пущино, Россия). Мышей иммунизировали нативным растворимым рецептором трансферрина человека (“Биалекса”, Россия) в присутствии полного и неполного адьюванта Фрейнда (“Sigma”, США) при первой и последующих иммунизациях, соответственно. Мышинные моноклональные антитела были получены с помощью гибридомной технологии слиянием иммунных спленоцитов мыши с клетками

несекретирующей ГАТ-чувствительной плазмацитомы P3X63/Ag8.653. Скрининг первичных гибридомных клонов, полученных при гибридизации спленоцитов, проводили методом прямого ИФА на антигене – sTfR. Очистку антител изотипа G из асцитной жидкости проводили методом аффинной хроматографии на колонке с белок-A-сефарозой («Amersham Biosciences», Англия). Вторые жидкофазные МКА для «сэндвич»-ИФА получали с помощью реагента NHS-биотин («Pierce», США) согласно инструкции производителя. ИФА разрабатывали по принципам, изложенным в [3]. В результате нами была получена диагностическая тест-система, принцип определения в которой основан на «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием пары моноклональных антител к растворимому рецептору трансферрина человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируются в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами мыши. Имеющийся в образцах и калибраторах sTfR связывается с иммобилизованными на твердой фазе антителами. Связавшийся sTfR взаимодействует при инкубации со вторыми биотинилированными антителами. На второй стадии связавшийся комплекс взаимодействует при инкубации с стрептовидин пероксидазой хрена. Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетра-метилбензидина (ТМБ). Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими растворимый рецептор. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации sTfR в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольном образце.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация sTfR в анализируемых образцах. Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

Большой пласт работы был направлен на снижение «нулевого» сигнала и увеличение соотношения значимого сигнала к «нулевому» с сохранением максимально возможного линейного участка кривой. Поставленная задача решалась путем оптимизации разных этапов ИФА, включая следующие составляющие:

- концентрация иммобилизованных антител и условия сорбции;
- состав блокирующего и стабилизирующего буферных растворов и время инкубации для блокирования на пластике свободных мест связывания;
- состав буфера для промывки планшетов, время и количество промывок на разных этапах;
- состав инкубационного буфера;
- состав буфера для разведений образцов;

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

- количество биотинилированных жидких антител, специфичных к sTfR человека.

В ходе всех работ нами был получен диагностический набор реагентов со следующими характеристиками (таблица 1).

**Таблица 1.** - Перечень характеристик разработанного набора реагентов для определения растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа

Характеристики набора реагентов	Показатели
Специфичность	к нативному и рекомбинантному sTfR человека
Воспроизводимость	не превышает 10 %
Чувствительность	не превышает 10 нг/мл
Диапазон измерений	0,03-2 мкг/мл
Линейность	±10,0% в диапазоне концентраций 0,06-2 мкг/мл
Точность (процент «открытия»)	90-110%

Для проведения сравнительного анализа разработанного отечественного набора к sTfR с коммерческим, был использован диагностикум зарубежного производства «Quantikine IVD Soluble Transferrin Receptor ELISA» (“R&D Systems Inc.”, США). Принцип работы последнего основан также на «сэндвич»-иммуноферментном анализе с использованием 2-х различных моноклональных антител, специфичных к растворимому рецептору трансферрина. В качестве биологического материала была взята сыворотка крови практически здоровых лиц (n=15) – доноров отделения переливания крови Минского НПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии, обследованных предварительно согласно действующей инструкции по освидетельствованию доноров. Результаты уровня концентрации растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови доноров, оцененного с помощью двух разных диагностикумов, представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** - Средние, минимальные и максимальные значения концентрации sTfR в сыворотке крови доноров, измеренные с использованием отечественного и коммерческого наборов

Концентрация sTfR, мг/л	
Разрабатываемая тест-система	Коммерческий набор R&D, США
2,34 (1,41-4,49)	2,63 (1,51-4,4)

Согласно литературным данным, значения концентрации sTfR в сыворотке крови у здоровых мужчин старше 18 лет находятся в диапазоне 2,2-5 мг/л, у женщин – 1,9-4,4 мг/мл [4]. Таким образом, полученные в ходе измерений значения концентрации растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови условно здоровых доноров сравнимы, как в случае использования разрабатываемой тест-системы, так и в случае применения коммерческого набора. Более того, проведенный статистический анализ между значениями концентрации sTfR в сыворотке крови (n=15), полученными с помощью разрабатываемой ИФА тест-системы и коммерческого набора, выявил сопоставимость результатов двух выборок с коэффициентом корреляции 0,95 (R=0,95).

Таким образом, в процессе выполнения исследования была разработана отечественная тест-система по количественному определению растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Она представляет собой твердофазный «сэндвич»-вариант ИФА к sTfR человека, в котором используются мышинные моноклональные антитела собственного производства: одно, иммобилизовано на твердой поверхности лунок стрипованного планшета, второе, конъюгировано с биотином. Продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность набора реагентов, а также возможность определять исследуемый биомаркер в широком диапазоне концентраций, сопоставимый со значениями, получаемыми при использовании коммерческого набора.

*Работа выполнена в рамках ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи», подпрограмма «Внутренние болезни».*

### **Список литературы**

1. Marijn, M. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor / M. Marijn [et al.] // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 2010. – Vol. 47, iss. 5-6. – P. 213-228.
2. WHO guideline on use of ferritin concentrations to assess iron status in individuals and populations [Electronic resource]: WHO guidelines. – Mode of access: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000124>. – Date of access: 12.03.2021.
3. Tijssen, P. Practice and theory of enzyme immunoassays / P. Tijssen.; ed.: R.H. Burdon, P.H. Knippenberg. – Amsterdam, 1985. – 549 p.
4. Ярец, Ю.И. Биохимические тесты в практической медицине. Часть II: практическое пособие для врачей / Ю.И. Ярец. – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2016. – 66 с.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

**БИОХИМИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ В  
ОСТРОМ ПЕРИОДЕ АНЕВРИЗМАТИЧЕСКИХ  
СУБАРАХНОИДАЛЬНЫХ КРОВОИЗЛИЯНИЙ**

**Пашковская И. Д.**

*к. б. н., доцент, ведущий научный сотрудник  
лаборатории клинической патофизиологии нервной системы  
государственного учреждения «Республиканский научно-практический  
центр неврологии и нейрохирургии», г. Минск, Беларусь  
irenapass@mail.ru*

**Нечипуренко Н. И.**

*д. м. н., профессор, заведующий лабораторией  
клинической патофизиологии нервной системы  
государственного учреждения «Республиканский научно-практический  
центр неврологии и нейрохирургии», г. Минск, Беларусь  
prof\_nin@mail.ru*

**Степанова Ю. И.**

*к. м. н., доцент, ведущий научный сотрудник  
научно-исследовательской лаборатории учреждения образования  
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»  
г. Минск, Беларусь  
st.juli@tut.by*

**Сидорович Р. Р.**

*д. м. н., доцент, директор государственного  
учреждения «Республиканский научно-практический  
центр неврологии и нейрохирургии», г. Минск, Беларусь  
info@neuro.by*

**Ахремчук А. И.**

*врач-нейрохирург нейрохирургического отделения № 2  
государственного учреждения «Республиканский научно-практический  
центр неврологии и нейрохирургии», г. Минск, Беларусь  
ahremen@mail.ru*

**Прокопенко Т. А.**

*младший научный сотрудник лаборатории клинической  
патофизиологии нервной системы государственного  
учреждения «Республиканский научно-практический центр  
неврологии и нейрохирургии», г. Минск, Беларусь  
tatiananovitskaya1108@mail.ru*

*В данной статье рассмотрены особенности биохимических нарушений в венозной крови у пациентов на 8-е (6; 10) сутки после разрыва церебральных аневризм. В дооперационном периоде у пациентов установлены изменения показателей кислотно-основного состояния, кислородтранспортной функции крови, вторичного гемостаза, эндотелийзависимой вазодилатации и вазоконстрикции. Выявленные метаболические нарушения позволяют уточнить*



*некоторые патогенетические звенья субарахноидального кровоизлияния вследствие разрыва церебральных аневризм.*

**Ключевые слова:** *церебральная аневризма; субарахноидальное кровоизлияние; метаболизм*

**BIOCHEMICAL DISTURBANCES IN VENOUS BLOOD IN PATIENTS  
DURING THE ACUTE PERIOD OF ANEURISMATIC SUBARACHNOIDAL  
HEMORRHAGE**

***Pashkouskaya I. D.***

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,  
Leading Researcher laboratory of clinical pathophysiology  
of the nervous system state institution "Republican scientific  
and practical center of neurology and neurosurgery", Minsk, Belarus  
irenapass@mail.ru*

***Nechipurenko N. I.***

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of  
Clinical Pathophysiology nervous system of a public institution  
"Republican Scientific and Practical Center of Neurology and  
Neurosurgery", Minsk, Belarus  
prof\_nin@mail.ru*

***Stepanova J. I.***

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,  
Leading Researcher of research laboratory of an educational Institution  
"Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education" Minsk, Belarus  
st.juli@tut.by*

***Sidorovich R. R.***

*Doctor of Medical Sciences, Associate Professor,  
director of a public institution "Republican Scientific and Practical  
Center of Neurology and Neurosurgery", Minsk, Belarus  
info@neuro.by*

***Ahremchuk A. I.***

*Neurosurgeon of the neurosurgical department  
№2 state institution "Republican Scientific and Practical  
Center of Neurology and Neurosurgery", Minsk, Belarus  
ahremen@mail.ru*

***Prokopenko T. A.***

*Junior Researcher, Laboratory of Clinical Pathophysiology nervous  
system of a public institution "Republican Scientific and  
Practical Center of Neurology and Neurosurgery", Minsk, Belarus  
tatiananovitskaya1108@mail.ru*

*The features of biochemical disorders in the venous blood in patients on the 8th  
(6; 10) day after the rupture of cerebral aneurysms were examined. Violations of the  
indicators of acid-base state, oxygen transport function of the blood, secondary*

*hemostasis and endothelium-dependent vasodilation and vasoconstriction were found in patients in the preoperative period. The revealed metabolic disorders make it possible to clarify some pathogenetic links of subarachnoid hemorrhage due to rupture of cerebral aneurysms.*

**Key words:** *cerebral aneurysm, intracranial hemorrhage, metabolism*

Субарахноидальное кровоизлияние (САК) представляет собой вариант геморрагического инсульта и характеризуется высокими показателями летальности и инвалидизации. До 80% всех спонтанных САК связаны с разрывом церебральных аневризм [1]. Одним из наиболее опасных осложнений, сопутствующих САК и значительно ухудшающих исходы, является развитие спазма церебральных сосудов с формированием очагов ишемии головного мозга. Патогенез сосудистого спазма и отсроченной церебральной ишемии при разрыве церебральных аневризм включает в себя многочисленные патобиохимические реакции, развивающиеся на фоне энергодифицита, глутаматергической эксайтотоксичности с внутриклеточным повышением  $Ca^{2+}$  в гладкомышечных клетках сосудов и нейронов, обусловленной внутричерепной гипертензией и выбросом большого количества биологически активных веществ в ткани мозга и субарахноидальное пространство [2]. Представляет интерес изучение биохимических нарушений у пациентов с аневризматическим САК, связанных с гипоперфузией головного мозга и развитием ишемических повреждений в нейронах и гладкомышечных клетках сосудов, выбросом биологически активных веществ из разорвавшихся артерий в окружающие ткани головного мозга, таких как монооксид азота (NO), ангиотензин-2, тромбин и пр.

**Цель** – изучить ряд показателей кислотно-основного состояния, кислородтранспортной функции (КТФ) крови, биохимических параметров функционального состояния эндотелия и вторичного гемостаза у пациентов в остром периоде аневризматических САК.

**Материалы и методы исследования.** Обследовано 23 пациента на 8-е (6; 10) сутки после разрыва аневризмы в возрасте  $48,8 \pm 10,3$  лет на момент госпитализации. У пациентов определяли pH и сродство гемоглобина к кислороду по показателю  $p50$ , парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ), сатурацию ( $sO_2$ ) венозной крови на газоанализаторе ABL-800 FLEX («Radiometer» Дания). Концентрацию стабильных продуктов обмена монооксида азота (нитрат/нитритов) в плазме определяли с использованием реактива Грисса. Содержание ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в сыворотке крови – методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA тест-наборами «R&Dsystems» (Канада). Исследовали показатели вторичного гемостаза: активированное парциальное тромбoplastиновое время (АПТВ), протромбиновое время (ПВ), концентрацию фибриногена на анализаторе гемостаза ACL 10000 (США). Нормальные значения изучаемых показателей получены у 26 практически здоровых лиц, в возрасте  $49,4 \pm 14,6$  лет. При статистической обработке данных применяли программу Statistica 10.0.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

**Результаты.** Острая ишемия развилась у 4 (17%) пациентов из этой группы, которая была подтверждена МРТ исследованием головного мозга и клиническими данными. Признаки церебрального вазоспазма обнаружены у 10 (43%) человек по данным транскраниального дуплексного сканирования кровотока по средней мозговой артерии. При исследовании КТФ венозной крови у пациентов с аневризматическим САК установлены значимое повышение рН ( $t=3,7$ ,  $p=0,038$ ) и показателя р50 ( $U=71$ ;  $p=0,034$ ), что приводит к снижению сродства гемоглобина к кислороду относительно здоровых лиц и способствует увеличению потока  $O_2$  в ткани в условиях гипоксии. При этом парциальное давление и сатурация венозной крови оставались в пределах нормальных значений. Важным компонентом дизоксии является нарушение внутриклеточной утилизации кислорода, возникающее вследствие блокады цепи дыхательных ферментов митохондрий под действием оксидантного стресса и медиаторов воспаления при геморрагическом повреждении тканей. Следовательно, повышение р50 при аневризматическом САК свидетельствует о снижении сродства гемоглобина к кислороду и развитию, вероятнее всего, в этот период наблюдения компенсаторной реакции, направленной на улучшение оксигенации ишемизированных тканей головного мозга у пациентов.

Выявлено статистически значимое снижение концентраций нитрат/нитритов на 43% ( $U=19$ ,  $p=0,0001$ ) и АПФ на 30% ( $U=104$ ,  $p=0,042$ ) в крови относительно нормы. По данным литературы, в сосудистой сети ангиотензин II и NO косвенно взаимодействуют в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, влияя на функции друг друга. Ангиотензин II регулирует экспрессию синтазы оксида азота (NOS) и продукцию NO, тогда как NO по обратному механизму регулирует уровень ангиотензина II через рецепторы ангиотензина II типа 1. Обратная связь между NO и ангиотензином II является основой для сохранения нормальной сосудистой структуры и функции [3].

У пациентов обнаружены также достоверные коагуляционные нарушения свертывающей системы крови: укорочение ПВ на 11% ( $t=4,5$ ,  $p=0,0001$ ) и возрастание концентрации фибриногена на 13% ( $t=2,1$ ,  $p=0,047$ ) относительно нормальных данных (таблица).

**Таблица - Показатели вторичного гемостаза у пациентов**

Показатели	Здоровые лица, n=16	Пациенты, n=15	Статистическая значимость различий
АПТВ, сек	29,4±3,7	30,1±4,4	НЗ
ПВ, сек	13,2±1,1	11,7±0,8	$t=4,5$ , $p=0,0001$
Фибриноген, г/л	3,79±0,68	4,5±0,9	$t=2,4$ , $p=0,023$

Гиперкоагуляционный сдвиг внешнего пути свертывания у пациентов обусловлен развившимся у них аневризматическим САК, поддерживаемый

наличием дисфункции эндотелия, с сопутствующим низким уровнем стабильных продуктов обмена NO и АПФ.

**Заключение.** Таким образом, у пациентов на 8-е (6; 10) сутки после разрыва аневризм и развития САК установлены сдвиг pH венозной крови в сторону алкалолитических изменений, повышение p50 со снижением сродства гемоглобина к кислороду, уменьшение концентрации нитрат/нитритов и АПФ, укорочение ПВ и повышение концентрации фибриногена в крови относительно здоровых лиц. Выявленное изменение уровня p50 в данный период наблюдения, по-видимому, можно расценить как компенсаторно-приспособительный механизм для поддержания адекватного уровня содержания кислорода в микроциркуляторном русле, что предупреждает развитие гипоксии мозга после разрыва церебральных аневризм. Обнаруженные нарушения эндогенной регуляции сосудистого тонуса, протекающие с гиперкоагуляционным сдвигом внешнего пути свертывания крови, усугубляет состояние эндотелиальной дисфункции при формировании и разрыве аневризм сосудов головного мозга. Выявленные метаболические нарушения позволяют уточнить некоторые патогенетические звенья субарахноидального кровоизлияния вследствие разрыва церебральных аневризм.

#### **Список литературы**

1. D'Souza, S. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage / S. D'Souza // J. Neurosurg. Anesthesiol. – 2015. – Vol. 27, № 3. – P. 222–240.
2. Крылов, В.В. Патогенез сосудистого спазма и ишемии головного мозга при нетравматическом субарахноидальном кровоизлиянии вследствие разрыва церебральных аневризм / В.В. Крылов, А.А. Калинин, С.С. Петриков // Неврологический журнал. – 2014. – № 5. – С. 4-11.
3. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator / C. Yan, D. Kim, T. Aizawa, B.C. Berk // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2003. – Vol. 23, №1. – 26–36.

## МОДЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КАТАБОЛИЗМА МОЛЕКУЛ

**Пинчук П.Ю.**

*Магистрант кафедры химии и естественнонаучного образования  
учреждения образования «Витебский государственный университет имени  
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
polina\_mileeva@mail.ru*

**Чиркин А.А.**

*д. м. н., профессор кафедры химии и естественнонаучного образования  
учреждения образования «Витебский государственный университет имени  
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
chir@tut.by*

*В статье представлены данные о молекулярно-структурной гомологии 5 лизосомальных ферментов у моллюска (*Biomphalaria glabrata*), мыши (*Mus musculus*) и свиньи (*Sus scrofa domesticus*) по отношению к человеку (*Homo sapiens*). Результаты работы позволяют рекомендовать изученных животных в качестве модельных организмов для исследования возможности получения препаратов для заместительной терапии и использования данных организмов на доклинических стадиях анализа эффективности субстанций для управления катаболизмом молекул в клетках.*

**Ключевые слова:** модельные организмы; пероксиредоксин-б; пальмитоил-протеинтиоэстераза 1, сульфогидролаза; N-ацетилглюкозамин-б-сульфатаза; N-ацетилгалактозамин-б-сульфатаза; фосфорилаза

## MODEL ORGANISMS FOR STUDYING MOLECULE CATABOLISM

**Pinchuk P.Yu.**

*Master student of the Department of Chemistry and Natural Science Education  
of the educational establishment "Vitebsk State University named after P.M.  
Masherov", Vitebsk, Belarus  
polina\_mileeva@mail.ru*

**Chirkin A.A.**

*Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Chemistry and  
Natural Science Education of the Educational Institution "Vitebsk State University  
named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus  
chir@tut.by*

*The article presents data on the molecular-structural homology of 5 lysosomal enzymes in a mollusk (*Biomphalaria glabrata*), a mouse (*Mus musculus*) and a pig (*Sus scrofa domesticus*) in relation to humans (*Homo sapiens*). The results of the work make it possible to recommend the studied animals as model organisms for studying the possibility of obtaining drugs for substitution therapy and using these organisms at the preclinical stages of analyzing the effectiveness of substances for controlling the cellular molecules catabolism.*

**Key words:** *model organisms; peroxiredoxin-6; palmitoyl-protein thioesterase 1; sulphohydrolase; N-acetylglucosamine-6-sulfatase; N-acetylgalactosamine-6-sulfatase; phosphorylase*

**Введение.** Лизосомы — это одномембранные органеллы, содержащие гидролитические ферменты, способные разрушать многие виды биомолекул. В содержимом лизосом поддерживается значение pH ~4,5–5,0, что оптимально для ферментов, участвующих в гидролитическом распаде молекул. Помимо деградации полимеров, лизосомы участвуют в различных клеточных процессах, включая секрецию, восстановление плазматической мембраны, апоптоз, передачу клеточных сигналов и энергетический метаболизм [1,2]. Поэтому лизосомы представляют интерес как объекты, из которых могут быть выделены ферменты для заместительной терапии, а также клетки, содержащие лизосомы (практически все типы кроме эритроцитов) могут использоваться для тестирования биологически активных субстанций в доклинических испытаниях. При этом актуальной задачей является подбор клеточных систем и модельных организмов, обладающих лизосомальными ферментами, близкими по строению и функциям к аналогичным ферментам человека.

При использовании баз данных ExplorEnz - The Enzyme Database, IUBMB Enzyme Nomenclature, ExPASy - ENZYME nomenclature database, BRENDA, the Enzyme Database, KEGG Enzyme были отобраны 5 ферментов, участвующих в распаде различных биополимеров: Peroxiredoxin-6 (EC: 1.11.1.27), Palmitoyl-protein thioesterase 1 (EC: 3.1.2.22), Sulphohydrolase (EC: 3.10.1.1), N-acetylglucosamine-6-sulfatase (EC: 3.1.6.14) и Phosphorylase (EC: 2.4.1.1). Пероксиредоксин-6 является тиол-специфической пероксидазой, которая катализирует восстановление пероксида водорода и органических гидропероксидов до воды и спиртов, соответственно. Кроме того, может восстанавливать короткоцепочечные гидропероксиды органических, жирных кислот и фосфолипидов, обладает фосфолипазной активностью. Эти активности зависят от связывания с фосфолипидами при кислом pH (лизосомы) и с окисленными фосфолипидами при цитозольном значении pH. Участвует в защите клеток от окислительного стресса путем детоксикации пероксидов и в гомеостазе фосфолипидов [3]. Пальмитоилпротеингидролаза/тиоэстераза - это фермент, который удаляет ацильные группы (пальмитат и др.), связанные с остатками цистеина в белках или пептидах во время лизосомальной деградации. Этот фермент катализирует реакцию: пальмитоил[белок] + H<sub>2</sub>O ⇌ пальмитат + белок. Эти ферменты принадлежат к семейству гидролаз, в частности тех, которые действуют на тиоэфирные связи. Систематическое название этого класса ферментов - пальмитоил[протеин] гидролаза. Другие широко используемые названия включают пальмитоил-протеинтиоэстеразу и пальмитоил-(протеин) гидролазу. Эти ферменты участвуют также в удлинении жирных кислот в митохондриях [4,5]. Сульфогидролаза катализирует реакцию N-сульфо-D-глюкозамин + H<sub>2</sub>O → D-глюкозамин + сульфат. N-

ацетилглюкозамин-6-сульфатаза катализирует реакцию N-ацетил-D-глюкозамин-сульфат + H<sub>2</sub>O → N-ацетил-D-глюкозамин + сульфат. Кроме того, фермент осуществляет гидролиз 6-сульфатных групп N-ацетил-D-глюкозамин 6-сульфатных звеньев гепарансульфата и кератансульфата и относится к классу гидролаз, расщепляющих связи сера-азот [8, 9]. Гликогенфосфорилаза - один из ферментов семейства фосфорилазы (EC 2.4.1.1). Гликогенфосфорилаза катализирует лимитирующую стадию гликогенолиза у животных, высвобождая глюкозо-1-фосфат из концевой альфа-1,4-гликозидной связи: (α-1,4-гликогенная цепь)<sub>n</sub> + P<sub>i</sub> ⇌ (α-1,4-гликогенная цепь)<sub>n-1</sub> + α-D-глюкозо-1-фосфат. В гликогене остается на одну молекулу глюкозы меньше, а свободная молекула глюкозы находится в форме глюкозо-1-фосфата. Чтобы использовать его для метаболизма, он должен быть преобразован в глюкозо-6-фосфат ферментом фосфоглюкомутазой. Хотя реакция обратима *in vitro*, внутри клетки фермент работает только в прямом направлении, поскольку концентрация неорганического фосфата намного выше, чем концентрация глюкозо-1-фосфата [10].

Цель работы – выявить процент идентичности (молекулярно-структурной гомологии) лизосомальных ферментов у моллюска (*Biomphalaria glabrata*), мыши (*Mus musculus*) и свиньи (*Sus scrofa domesticus*) по отношению к человеку (*Homo sapiens*).

**Материал и методы.** Поиск и отбор нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки человека, осуществлялся на сервере <https://www.ensembl.org>; поиск гомологичных последовательностей для моллюсков и млекопитающих осуществлялся на сервере <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> при помощи ресурса BLAST; описание белков для человека было взято с ресурса <https://www.uniprot.org>; парное выравнивание и сравнение последовательностей человека и моллюсков выполнено в программе MEGA 5.2.; построение 3D-структур ферментов для моллюсков осуществлялось на сервере <https://swissmodel.expasy.org> по шаблону 3D-структуры ферментов человека и млекопитающих, найденных в банке данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот <http://www.rcsb.org>. В работе использован следующий алгоритм: поиск нуклеотидной последовательности → построение аминокислотных последовательностей сравниваемых белков → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур NS (нуклеотидные последовательности) AAS (аминокислотные последовательности) → оценка третичных структур по архитектуре молекул и их доменной организации [11]. Исследование мотивов и строения активных центров ферментов не входило в задачи данной работы.

**Результаты и их обсуждение.** Предварительно была исследована молекулярно-структурная гомология катаболических ферментов человека и свиньи. Ферменты этих млекопитающих хорошо изучены, о чем свидетельствует высокий процент покрытия как по нуклеотидным последовательностям (94-100%), так и по аминокислотным последовательностям (96-100%). Гомология

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

изученных ферментов по нуклеотидным последовательностям ожидаемо оказалась в пределах 93,3-85,1%, а по аминокислотным последовательностям – в пределах 93,3-87,8%. Полученные данные доказывают, что свинья является наилучшим модельным организмом для человека, однако эти животные дороги по стоимости и условиям содержания.

Поэтому был проведен сравнительный анализ катаболических ферментов человека и общепринятого модельного организма – мыши (*Mus musculus*). При сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей исследованных ферментов человека и мыши выявлен высокий процент покрытия – 92-100%. Это характеризует высокую частоту использования мыши в качестве модельного организма. Гомология изученных ферментов по нуклеотидным последовательностям оказалась в пределах 93,3-82,7%, а по аминокислотным последовательностям – в пределах 94,7-85,6%. Полученные данные доказывают, что мышь также является адекватным модельным организмом для человека, однако по этическим соображениям и стоимости широкое использование высших млекопитающих во всем мире постепенно сокращается. Поэтому актуальным остается поиск более простых и доступных организмов, но имеющих достаточно высокую гомологию ферментов с аналогичными ферментами человека. Кандидатами на такую роль выступают легочные пресноводные моллюски, в частности *Biomphalaria glabrata*, геном которого аннотирован, и который является ближайшим родственным видом, распространенного моллюска в Республике Беларусь *Planorbarius corneus* (таблица 1).

**Таблица 1.** – Сравнительный биоинформатический анализ катаболических ферментов человека и моллюска *Biomphalaria glabrata*

Ферменты	Человек - моллюск		
	Тип последовательности	Покрытие	Гомология
Пероксиредоксин-б	NS	97%	66,67%
	AAS	97%	66,67%
Пальмитоил-протеинтиоэстераза 1	NS	89%	61,45%
	AAS	89%	61,45%
Сульфогидролаза	NS	94%	56,94%
	AAS	98%	56,84%
N-ацетилглюкозамин-б-сульфатаза	NS	51%	58,19%
	AAS	52%	57,93%
Фосфорилаза	NS	80%	69,59%
	AAS	80%	73,10%

При сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей исследованных ферментов человека и моллюска обнаружен более низкий процент покрытия (по нуклеотидным последовательностям 97-51%, по



аминокислотным последовательностям 97-52%), причем нижний предел покрытия характерен только для одного фермента N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы. Для остальных ферментов процент покрытия от 80% до 97%. Молекулярно-структурная гомология ферментов по нуклеотидным последовательностям составила 69,6-56,9%, а по аминокислотным последовательностям 73,1-56,8%. Наиболее высокая гомология отмечена для пероксиредоксина-6, пальмитоил-протеинтиоэстераза 1 и фосфорилазы.

**Заключение.** Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что моллюск *Biomphalaria glabrata* также, как мышь и свинья, может выполнять роль модельного организма при изучении катаболизма молекул в лизосомах человека.

### Список литературы

1. Ohkuma, S. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents / S. Ohkuma, B. Poole // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1978. – Vol. 75 (7). – P. 3327–3331.
2. Settembre, C. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism / C. Settembre [et al.] // Nature Reviews Molecular Cell Biology. - 2013. – Vol, 14 (5). – P. 283–296.
3. Manevich, Y. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with Pi GST / Y. Manevich, S.I. Feinstein, A.B. Fisher // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol.101. – P. 3780-3785.
4. Camp, L.A. Assay and isolation of palmitoyl-protein thioesterase from bovine brain using palmitoylated H-Ras as substrate / L.A. Camp, S.L. Hofmann // Methods Enzymol. 1995. – Vol. 250. – P. 336-475.
5. Verkruyse, L.A. Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase / L.A. Verkruyse, S.L. Hofmann // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271. – P. 15831-15836.
6. Dietrich, C.P. Enzymic degradation of heparin. A sulphamidase and a sulphoesterase from *Flavobacterium heparinum* / C.P. Dietrich // Biochem. J. – 1969. – Vol. 111. – P. :91-95.
7. Mahuran, D. A rapid four column purification of 2-deoxy-D-glucoside-2-sulphamate sulphohydrolase from human liver / D. Mahuran, P. Clements, J. Hopwood // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – Vol. 757. – P. 359-365.
8. Basner, R. N-Acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase from human urine / R. Basner, H. Kresse, K.von Figura // J. Biol. Chem. – 1979. – Vol. 254. – P. 1151-1158.
9. Weissmann, B. A glucosamine O,N-disulfate O-sulfohydrolase with a probable role in mammalian catabolism of heparan sulfate / B. Weissmann, H. Chao, P. Chow // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980. - Vol. 97. – P. 827-833.
10. Fischer, E.H. The structure, function and control of glycogen phosphorylase / E.H. Fischer, A. Pocker, J.C. Saari // In: Campbell, P.N. and Greville, G.D. (Eds.), Essays in Biochemistry. – 1970: Academic Press, London and New York. - Vol. 6, - P. 23-68.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

11. Чиркин, А.А. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А.А. Чиркин [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хим. навук. – 2021. – Т. №. 57, №.2– С. 206-221.

## ОСОБЕННОСТИ КОЙЛА, СПОСОБНОГО К СТРУКТУРНОМУ ПЕРЕХОДУ В ПОЛНОСТЬЮ НЕУПОРЯДОЧЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

**Побойнев В.В.**

*ассистент кафедры общей химии учреждения образования «Белорусский  
государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь  
dremozzew@mail.ru;*

**Хрусталёв В.В.**

*к. б. н., доцент, заведующий кафедрой общей химии учреждения  
образования «Белорусский государственный медицинский университет», г.  
Минск, Республика Беларусь  
vkhrustalev@mail.ru;*

*В данной статье рассмотрены особенности аминокислотного и пентапептидного состава стабильного койла, койла, способного к переходу в полностью неупорядоченное состояние и полностью неупорядоченного состояния белка. Показано, что данные элементы вторичной структуры имеют ряд достоверных отличий. Внутренне неупорядоченные фрагменты белков обогащены глицином, аланином, аспарагиновой кислотой и лизином по сравнению со стабильным койлом и койлом, способным к структурному переходу во внутренне неупорядоченное состояние. Также выявлены конкретные пентапептиды, детерминирующие внутренне неупорядоченное состояние белка: WOOWW, WWOOW, WWOWW, WOOWO, OWOOW.*

**Ключевые слова:** койл; внутренне неупорядоченные белки; аминокислотные остатки; пентапептиды; структурные переходы

## THE FEATURES OF A RANDOM COIL CAPABLE TO STRUCTURAL TRANSITION TO COMPLETELY DISORDERED STATE

**Poboinev V.V.**

*assistant professor of the Department of General chemistry of  
the Educational Institution «Belarusian State Medical University»,  
Minsk, Belarus,  
dremozzew@mail.ru;*

**Khrustalev V.V.**

*PhD, associate professor, Head of the Department of General chemistry of  
the Educational Institution «Belarusian State Medical University»,  
Minsk, Belarus,  
vkhrustalev@mail.ru;*

*In this article the features of the amino acid and pentapeptide content of stable random coil, random coil capable to structural transition to a completely disordered state and a completely disordered state of protein are described. It is shown that these elements of the secondary structure have a number of significant differences. Disordered protein fragments are enriched with glycine, alanine, aspartic acid and lysine compared to stable random coil and random coil capable to structural transition*

*to a completely disordered state. Specific pentapeptides determining the completely disordered state of the protein have also been identified: WOOWW, WWOOW, WWOWW, WOOWO, OWOOW.*

**Keywords:** *random coil; intrinsically disordered proteins; amino acid residues; pentapeptides; structural transition*

Участки белков, не формирующих ни спирали, ни бета-тяжи относятся к койлу (от англ. random coil) или петлям. Данные участки белков не имеют повторяющихся паттернов водородных связей, как в случае образования спиралей или бета-тяжей. Данный элемент вторичной структуры присутствует в белках различных структурных классов: альфа-спиральных, бета-структурных, альфа+бета и альфа/бета. Кроме регулярных элементов вторичной структуры во многих белках встречаются области с отсутствующими сведениями о вторичной структуре, т.е. с так называемыми «разрывами» электронной плотности, которые наблюдаются как во вторичной, так и в третичной структуре белка. Данные белки составляют отдельный тип внутренне неупорядоченных белков (от англ. intrinsically disordered proteins или intrinsically disordered protein regions – IDP/IDPRs) [1, 2]. При этом, к данному типу белков не относятся белки с отсутствием регулярных элементов вторичной структуры. Это, так называемые, *loop* белки, у которых отсутствуют элементы регулярной вторичной структуры (спирали и бета-тяжи), но характерна третичная структура [3]. Данные белки содержат фрагменты (NORS – no regular secondary structure) длиной от 70 аминокислотных остатков, которые не формируют ни спирали, ни бета-тяжи, но при этом имеют чёткую дифракционную картину [3]. «Разрывы» же электронной плотности обусловлены равновесием между различными элементами вторичной структуры, которые формируются одними и теми же аминокислотными остатками, т.е., например, часть молекул имеет альфа-спиральный участок, а часть – койл. Но, при взаимодействии с лигандами, как участки белков с «разрывами» электронной плотности, так и фрагменты NORS белка могут приобрести определённую конформацию или подвергнуться структурному переходу, и при проведении анализа трёхмерной структуры она будет видна, хотя, на самом деле, данный участок белка должен классифицироваться как IDPRs или NORS. Несмотря на отсутствие стабильной вторичной и третичной структуры такие внутренне неупорядоченные белки выполняют важнейшие биологические функции [4]: сигналинг, молекулярное распознавание и регуляцию [5-6]. Белки данного типа также ассоциированы с большим набором заболеваний человека [7]. С каждым годом увеличивается количество известных заболеваний, в патогенез которых вовлечены неструктурированные белки или белки, которые могут совершать структурные переходы.

Огромная практическая значимость особенностей структуры белка подчеркивается и тем фактом, что с каждым годом увеличивается количество публикаций, посвященных фундаментальным аспектом данного вопроса. При этом до сих пор нет ответа на один из наиболее фундаментальных вопросов: есть

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

ли различия между полностью неструктурированным состоянием белка («0») и койлом, который способен переходить в неструктурированное состояние («0С»).

**Цель работы** заключается в установлении особенностей аминокислотного и пентапептидного состава койла, способного к структурному переходу в полностью неструктурированное состояние.

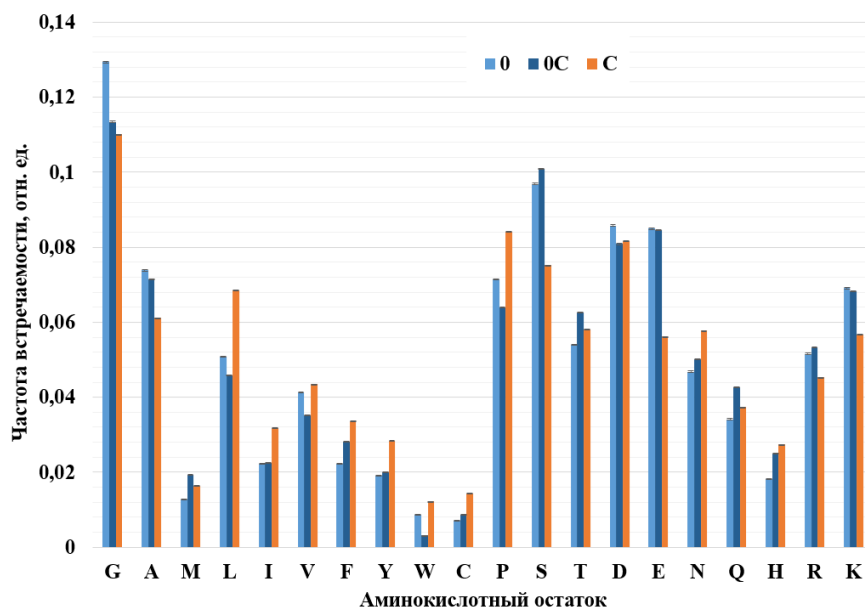
**Материалы и методы исследования.** Материалом для выявления данных отличий послужили белки эукариот четырёх структурных классов: 378 альфа-спиральных структур белков, 355 бета-структурных структур белков, 387 структур белков класса «альфа + бета», 386 структур белков класса «альфа/бета» и 610 бактериальных структур белка. Для оценки границ структурной изменчивости и нестабильности был применен оригинальный подход: сравнивались границы элементов вторичной структуры 2-5 3D структур одного и того же белка и, если на всех 3D структурах аминокислотный остаток принадлежит койлу – мы обозначали его символом «С». Если же на всех 3D структурах аминокислотный остаток входит в состав неструктурированной области – мы обозначали его как «0», если же на одной структуре аминокислотный остаток входит в состав койла, а на другой – в состав неструктурированной области, то он классифицировался как «0С». Таким образом, было проанализировано 59023 случая «С», 1596 – «0С» и 1260 – «0». Все полученные данные подвергались статистической обработке с помощью программ Past 3.0 и MS Excel. Тесты на нормальность распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка (W). Во всех случаях распределение аминокислотных остатков и пентапептидов в различных элементах вторичной структуры белков было нормальным. Достоверность различий в аминокислотном и пентапептидном составе между группами аминокислотных остатков в выборках определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Достоверные различия между «0» и «0С» были выявлены для глицина, аланина, лейцина, валина, триптофана, пролина, аспарагиновой кислоты и лизина. Разница же между стабильным койлом («С») и «0С» заключается в том, частоты встречаемости некоторых гидрофобных аминокислотных остатков (лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина, тирозина, триптофана, цистеина, пролина) и трёх гидрофильных остатков (аспарагина, аспарагиновой кислоты и гистидина) достоверно выше в «С» (Рисунок 1). Также выявлен ряд достоверных отличий между «С» и «0»: в «С» выше частоты встречаемости метионина, лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина, тирозина, триптофана, цистеина, пролина, треонина, аспарагина, глутамина и гистидина. Остальные аминокислотные остатки имеют большие частоты встречаемости в «0».

Таким образом, можно выделить четыре аминокислотных остатка, которые достоверно чаще встречаются в «0» по сравнению с «0С» и «С» (глицин, аланин, аспарагиновая кислота и лизин) и десять аминокислот, которые чаще

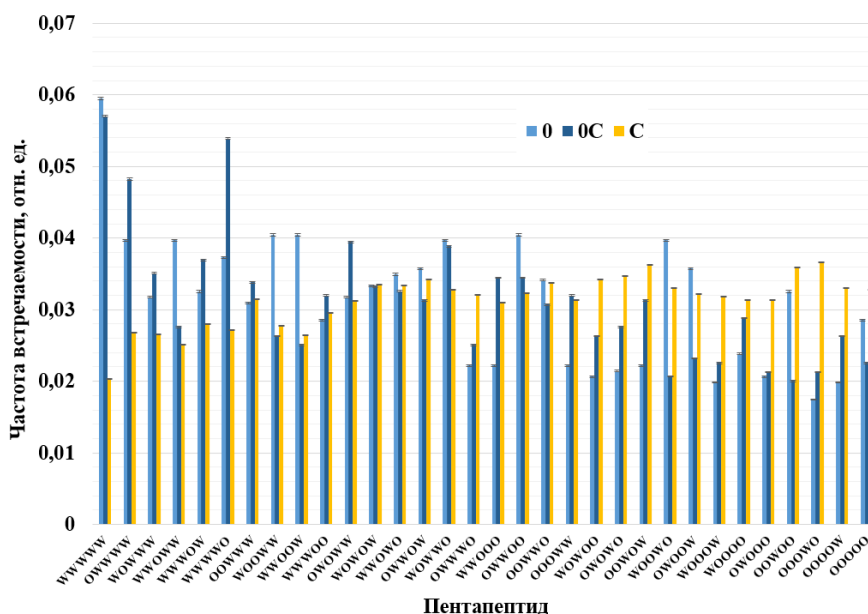
СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

встречаются в «С», чем «0» и «0С» (лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин, тирозин, триптофан, цистеин, пролин, аспарагин и гистидин) (Рисунок 1).



**Рисунок 1** – Частоты встречаемости аминокислотных остатков в стабильном койле («С»), койле, способном к структурному переходу в неструктурированное состояние («0С») и в полностью неструктурированном состоянии белка («0»)

В пентапептидном составе прослеживаются схожие тенденции: «0» и «0С» обогащены гидрофильными пентапептидами по сравнению с «С». Однако пентапептиды OWWW, WWWO, WOWW, WWOW, OOWW, WWOO, WWOO, OOWW и OWOWW имеют большие частоты встречаемости в «0С» по сравнению с «0». Пентапептиды WOOWW, WWOOW, WWOWW; WOOWO и OWOOO достоверно чаще находятся в «0», чем в «0С» и в «С» (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Частоты встречаемости пентапептидов в стабильном койле («С»), койле, способном к структурному переходу в неструктурированное состояние («0С») и в полностью неструктурированном состоянии белка («0»)

**Заключение.** Полностью неструктурированное состояние и койл, который способен к переходу в полностью неструктурированное состояние схожи между собой по аминокислотному составу и в значительной мере отличаются от стабильного койла. Однако, между «0» и «0С» обнаружен ряд значительных отличий в пентапептидном составе: пять пентапептидов (WOOWW; WWOOW; WWOWW; WOOWO; OWOOW) характерны именно для полностью неупорядоченных фрагментов белков.

### Список литературы

1. Wright, P. E. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm / P. E. Wright, H. J. Dyson // *J. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 293. – P. 321-331.
2. Dunker, A. K. Intrinsically disordered protein / A. K. Dunker et al. // *J. Mol. Graph. Model.* – 2001. – Vol. 19. – P. 26-59.
3. Liu, J. Loopy proteins appear conserved in evolution / J. Liu, H. Tan, B. Rost // *J. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 322. – P. 53-64.
4. Cortese, M. S. Intrinsic disorder in scaffold proteins: Getting more from less / M. S. Cortese, V. N. Uversky, A. K. Dunker // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 98. – P. 85-106.
5. Dunker, A. K. Identification and functions of usefully disordered proteins / A. K. Dunker, C. J. Brown, Z. Obradovic // *Adv. Protein Chem.* – 2002. – Vol. 62. – P. 25–49.
6. Dunker, A. K. Intrinsic disorder and protein function / A. K. Dunker et al. // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41. – P. 6573-6582.
7. Uversky, V. N. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept / V. N. Uversky, C. J. Oldfield, A. K. Dunker // *Annu. Rev. Biophys.* – 2008. – Vol. 37. – P. 215-246.

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ С УЧАСТИЕМ ТИОЛОВ

**Пойменова Ю. А.**

*студентка V курса химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова,  
Москва, Россия  
poymenovajul@gmail.com;*

**Созарукова М. М.**

*к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории синтеза  
функциональных материалов и переработки минерального сырья  
Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова  
Российской академии наук, Москва, Россия  
s\_madinam@bk.ru;*

**Проскурнина Е. В.**

*д. м. н., доцент, главный научный сотрудник  
лаборатории молекулярной биологии Медико-генетического научного  
центра имени академика Н.П. Бочкова,  
Москва, Россия  
proskurnina@gmail.com;*

*Наиболее чувствительными к действию свободнорадикального окисления являются тиолсодержащие соединения — одни из ключевых участников многокомпонентной антиоксидантной системы. Целью работы был анализ кинетики свободнорадикального окисления тиолов в присутствии люминола хемилюминесцентным методом с математическим моделированием экспериментальных кривых. Зарегистрированы кинетические кривые для модельных тиолов в системе генерации алкилпероксильных радикалов, включающие латентный период (фаза 1) и прирост хемилюминесценции относительно контрольного уровня свечения (фаза 2). В качестве возможного механизма предложена схема из 4-х реакций, удовлетворительно описывающая кинетику фазы 1, и подобраны константы скоростей, являющиеся количественной мерой антиоксидантной активности тиолов.*

**Ключевые слова:** *окислительный стресс; свободные радикалы; тиолы; антиоксидантная активность; хемилюминесценция; механизм; кинетика реакций, скорость реакции; математическое моделирование*

## COMPUTER SIMULATION THE KINETICS OF FREE-RADICAL REACTIONS INVOLVING THIOLS

**Poymenova Yu. A.**

*5th year student of the Faculty of Chemistry  
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
poymenovajul@gmail.com;*



**Sozarukova M. M.**

*Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory for the advanced materials synthesis and minerals processing  
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia  
s\_madinam@bk.ru;*

**Proskurnina E. V.**

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher  
of the Laboratory of Molecular Biology  
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia  
proskurnina@gmail.com;*

*Thiol-containing compounds, one of the key members of the multicomponent antioxidant system, are the most sensitive to the action of free-radical oxidation. The aim of the work was to analyze the kinetics of free radical oxidation of thiols in the presence of luminol by chemiluminescent method with mathematical modeling of experimental curves. Kinetic curves for model thiols in the system of alkylperoxyl radicals generation were recorded, including the latent period (phase 1) and chemiluminescence enhancement versus control (phase 2). A scheme of 4 reactions, satisfactorily describing phase 1 kinetics, was proposed as a possible mechanism, and rate constants, which are a quantitative measure of thiols antioxidant activity, were selected.*

**Key words:** *oxidative stress; free radicals; thiols; antioxidant activity; chemiluminescence; mechanism; reaction kinetics; reaction rate; computer simulation*

В организме человека постоянно образуется определенное количество свободных радикалов, необходимых для обеспечения нормальной жизнедеятельности. Однако их избыточная продукция приводит к развитию окислительного стресса. Действию свободнорадикального окисления противостоит многокомпонентная антиоксидантная система. Одними из ключевых участников антиоксидантного звена являются сывороточный альбумин и система глутатиона [1]. Все большее значение приобретает поиск специфических биомаркеров и разработка методик оценки тиолового окислительного стресса. Таким образом, целью данной работы был анализ кинетики свободнорадикального окисления тиолов в присутствии люминола хемилюминесцентным методом с последующим математическим моделированием экспериментальных кривых.

#### **Материалы и методы.**

**Анализ антиоксидантных свойств модельных тиолов.** Антиоксидантную активность образцов (глутатион, L-гомоцистеин, L-цистеин) исследовали в молекулярной модели генерации органических радикалов в присутствии люминола хемилюминесцентным методом. В качестве источника свободных радикалов использовали 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП) [2]. Хемилюминесценцию (ХЛ) регистрировали с помощью прибора Lum-1200 (ДИСофт, Россия). Образование

алкилпероксильных радикалов инициировали добавлением смеси АБАП ( $c = 2.5$  мкМ) с люминолом ( $c = 2.0$  мкМ) к предварительно нагретому до  $37^\circ\text{C}$  фосфатному буферному раствору. После выхода экспериментальной кривой на плато в систему вносили аликвоту исследуемого образца. Общий объем системы составлял 1.000 мл.

### Математическое моделирование хемилюминесцентных кривых.

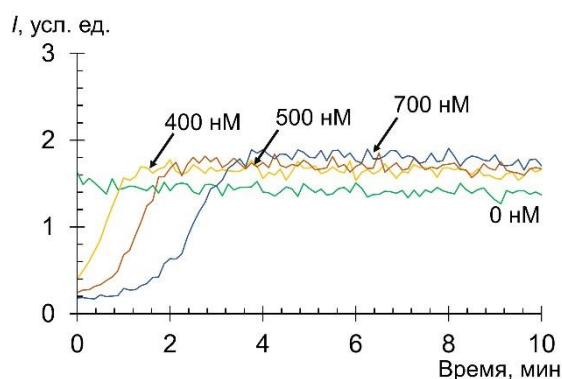
Моделирование кинетики экспериментальных кривых проводили при помощи программы Kinetic Analyzer (разработчик Д.Ю. Измайлов). В данной программе решается прямая задача, а именно предполагается построение математической модели, представляющей собой набор химических реакций, и вычисление значений констант скоростей этих реакций, при которых совпадение теоретической и экспериментальной кривых будет удовлетворительным.

### Результаты и обсуждение.

**Анализ кинетики ХЛ-системы АБАП/Люминол/глутатион.** Типичный вид ХЛ-кривых для глутатиона приведен на рис. 1. Как видно, кинетическая кривая состоит из двух фаз. Первая фаза (фаза 1) представляет собой латентный период (область подавления ХЛ), вторая (фаза 2) — отражает прирост интенсивности свечения ( $I$ ) относительно контрольного уровня ( $I_0$ ). С ростом концентрации GSH происходит дозозависимое увеличение латентного периода и  $\Delta I = I - I_0$ . Наиболее выраженный эффект наблюдали для латентного периода. На основании литературных данных [1, 3] в качестве наиболее вероятной схемы реакции была предложена следующая упрощенная модель:

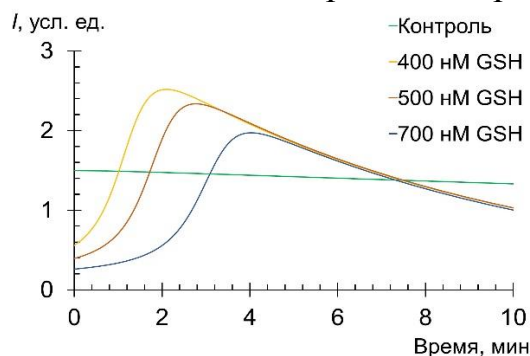
- (1)  $\text{АБАП} \rightarrow 2\text{R}_1\bullet$ ,
- (2)  $\text{R}_1\bullet + \text{Люм} \rightarrow \text{Люм}\bullet$ ,
- (3)  $\text{Люм}\bullet \rightarrow \text{P} + h\nu$  (ХЛ-реакция),
- (4)  $\text{R}_2\text{SH} + \text{R}_1\bullet \rightarrow \text{R}_2\text{S}\bullet \rightarrow \text{продукт окисления}$ ,

где уравнение (1) соответствует термоиндуцированному распаду АБАП с образованием алкилпероксильных радикалов ( $\text{R}_1\bullet$ ), уравнение (2) — образованию радикалов люминола ( $\text{Люм}\bullet$ ), в результате реакции (3) продукт люминола переходит из возбужденного состояния в основное с высвобождением  $h\nu$  (ХЛ-реакция), реакция (4) отражает свободнорадикальное окисление глутатиона ( $\text{R}_2\text{S}\bullet$  является одним из продуктов окисления). Предложенная схема реакций позволила удовлетворительно смоделировать изменение латентного периода. На основании этого, можно сделать вывод о том, что за формирование фазы 2 отвечает набор реакций, отличный от предложенного. Найденные значения констант скоростей были равны:  $k_1 = 9,05 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,



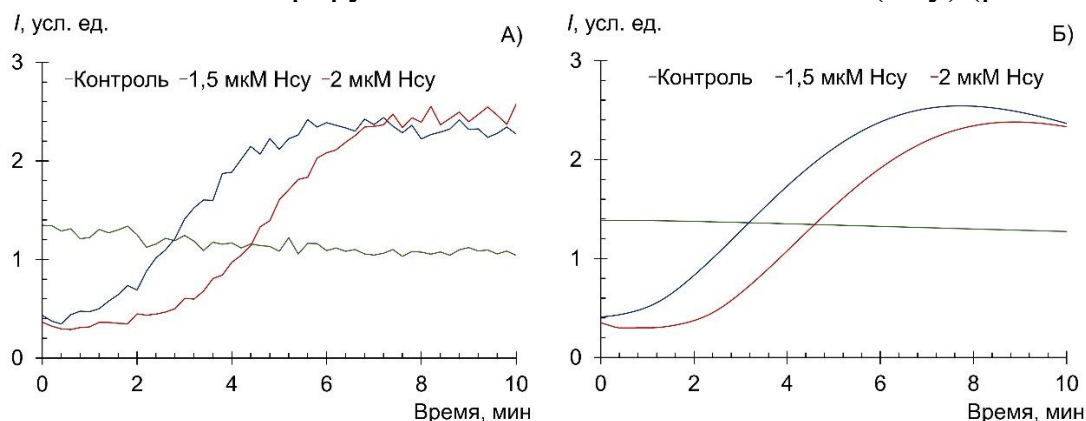
**Рисунок 1. Экспериментальные кривые системы АБАП/Люм/GSH.**

$k_2 = 2,60 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_3 = 3,00 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_4 = 1,20 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ . Кривые, полученные методом математического моделирования, представлены на рис. 2.



**Рисунок 2.** Кинетические кривые системы АБАП/Люм/GSH, полученные при моделировании.

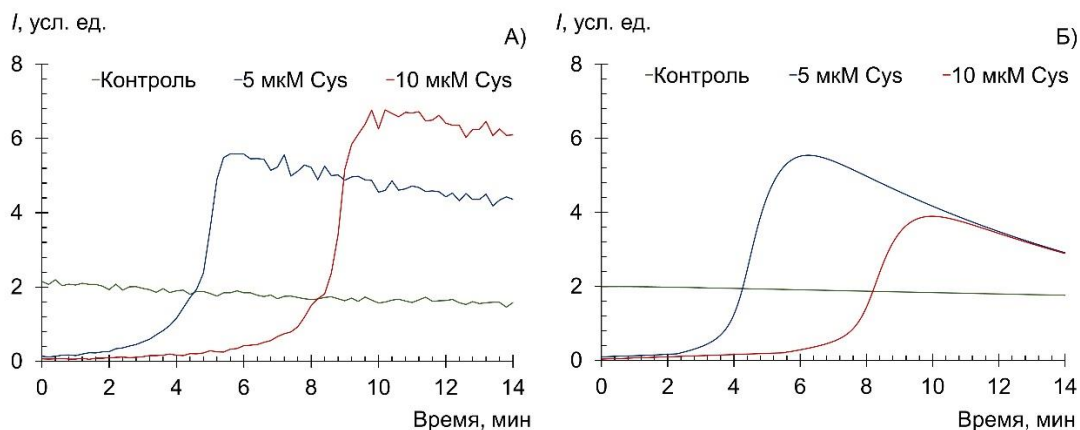
Далее были получены экспериментальные и модельные кривые при добавлении к АФК-генерирующей системе L-гомоцистеина (Hcy) (рис. 3А, Б).



**Рисунок 3.** Экспериментальная (А) и рассчитанная (Б) кинетики системы АБАП/Люм/Hcy.

Вид кинетических кривых (фаза 1) гомоцистеина схож с аналогичными для глутатиона, что позволило предположить одинаковые механизмы свободнорадикальных процессов и смоделировать кинетику по предложенной ранее схеме. Однако из-за существенных количественных различий в антиоксидантной емкости исследуемых тиолов для характеристики антиоксидантной активности Hcy были подобраны следующие константы:  $k_1 = 9,90 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_2 = 1,50 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_3 = 2,00 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_4 = 4,90 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ .

Аналогично были зарегистрированы и смоделированы кинетические кривые для L-цистеина (Cys), рис. 4А, Б.



**Рисунок 4.** Экспериментальная (А) и рассчитанная (Б) кинетики системы АБАП/Люм/Сус.

Как и для ранее исследованных тиолов, наблюдали дозозависимое изменение латентного периода с увеличением концентрации Сус. Моделирование проводили по предложенной ранее схеме. Были найдены следующие значения констант скоростей:  $k_1 = 1,00 \times 10^{-1} \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_2 = 9,00 \times 10^{-4} \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_3 = 9,00 \times 10^{-2} \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $k_4 = 4,0 \times 10^1 \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$ .

#### **Закключение.**

Зарегистрирована кинетика свободнорадикального окисления модельных тиолов, глутатиона, L-гомоцистеина и L-цистеина, в ХЛ-системе АБАП/люминол. Установлено, что экспериментальные кривые включают две фазы: латентный период (фаза 1) и прирост ХЛ ( $\Delta I$ ) относительно контрольного уровня свечения (фаза 2). В результате математического моделирования предложен возможный механизм (реакции (1) – (4)) процессов, протекающих в системе АБАП/Люм/тиол. Предложенная модель позволяет удовлетворительно описать кинетику фазы 1 (латентный период) на ХЛ-кривых. Найдены значения констант скоростей для свободнорадикальных реакций с участием тиолов, являющиеся количественной мерой их антиоксидантной активности.

#### **Список литературы**

1. Turell, L. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes / L. Turell, R. Radi, B. Alvarez // *Free Radic. Biol. Med.* — 2013. — V. 65. — P. 244–253.
2. Алексеев, А. В. Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2, 2'-азо-бис (2-амидинопропана) / А. В. Алексеев, Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров // *Вестник Московского ун-та, сер.: Химия.* — 2012. — Т. 53, №. 3. — С. 187–193.
3. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биол. химии.* — 2009. — Т. 49, №. 7. — С. 341–388.

**ВЗАИМОСВЯЗЬ БИОХИМИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ  
ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНЫМИ  
АНЕВРИЗМАМИ И РАЗВИТИЕМ ОТСРОЧЕННОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ  
ИШЕМИИ**

**Прокопенко Т. А.**

*младший научный сотрудник лаборатории клинической  
патофизиологии нервной системы государственного учреждения  
«РНПЦ неврологии и нейрохирургии», г. Минск, Беларусь  
tatiananovitskaya1108@mail.ru*

**Нечипуренко Н. И.**

*д. м. н., профессор,  
заведующий лабораторией клинической патофизиологии  
нервной системы государственного учреждения  
«РНПЦ неврологии и нейрохирургии», г. Минск, Беларусь  
prof\_nin@mail.ru*

**Батян А. Н.**

*д. м. н., профессор, заведующий кафедрой  
экологической медицины и радиобиологии учреждения образования  
«Международный государственный экологический институт им. А.Д.  
Сахарова» Белорусского государственного университета, г. Минск,  
Беларусь  
ant\_b@tut.by*

*В статье представлены результаты оценки нарушений кислородтранспортной функции крови, кислотно-основного состояния, про-антиоксидантной системы у пациентов с отсроченной церебральной ишемией, возникшей после микрохирургического клипирования разорвавшихся и неразорвавшихся артериальных аневризм. Установлены определенные корреляционные зависимости между рядом биохимических и клинических показателей у данных пациентов.*

**Ключевые слова:** *артериальная аневризма; отсроченная церебральная ишемия; неврологические проявления; биохимические показатели; корреляционная связь*

**RELATIONSHIP OF BIOCHEMICAL AND CLINICAL INDICATORS  
IN PATIENTS WITH ARTERIAL ANEURISMS AND THE DEVELOPMENT  
OF DELAYED CEREBRAL ISCHEMIA**

**Prokopenko T. A.**

*Junior Researcher, Laboratory of  
Clinical Pathophysiology nervous system  
of a public institution "Republican Scientific and  
Practical Center of Neurology and Neurosurgery", Minsk, Belarus  
tatiananovitskaya1108@mail.ru*

**Nechipurenko N. I.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of  
Clinical Pathophysiology nervous system of a public institution  
"Republican Scientific and Practical Center of Neurology and  
Neurosurgery", Minsk, Belarus  
prof\_nin@mail.ru*

**Batyan A. N.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department  
environmental medicine and radiobiology educational institutions  
"International State Ecological Institute named after A. D.  
Sakharov "Belarusian State University, Minsk, Belarus  
ant\_b@tut.by*

*The article presents the results of an assessment of violations of the oxygen transport function of blood, acid-base state, and the pro-antioxidant system in patients with delayed cerebral ischemia after microsurgical clipping of ruptured and unruptured arterial aneurysms. Certain correlations were established between a number of biochemical and clinical parameters in these patients.*

**Keywords:** *arterial aneurysm; delayed cerebral ischemia; neurological manifestations; biochemical indicators; correlation connection*

Отсроченная церебральная ишемия (ОЦИ) наряду с сосудистым спазмом (СС) является одним из наиболее опасных осложнений субарахноидального кровоизлияния (САК) при разрыве артериальной аневризмы (АА). На развитие ОЦИ влияют многочисленные факторы: наличие микротромбов, эндотелиальной дисфункции; нарушение взаимоотношений ферментов каскада свертывания крови, антикоагулянтов и фибринолиза; активация агрегации тромбоцитов; воспалительные процессы и др. [1-2].

При разрыве АА с развитием САК, СС и формированием очагов ишемии происходит образование из монооксида азота (NO) повышенных количеств активных форм кислорода, в частности пероксинитрита, повреждающего клеточные мембраны, ДНК, блокирующего тканевое митохондриальное дыхание [3]. Наряду с этим при развитии СС снижается концентрация NO в нейронах и гладкомышечных клетках церебральных артерий, что связано с падением внутриклеточной концентрации АТФ и L-карнитина [2].

При вазоспазме вследствие разрыва аневризмы развиваются нарушения, вызванные гипоксией тканей головного мозга, и выявляются признаки нарушения процессов клеточного энергообмена с развитием митохондриальной дисфункции, что влечет за собой повышение уровней молочной и пировиноградной кислот в крови с возрастанием соотношения лактат/пируват, а также активацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [4]. Вторичное повреждение головного мозга сопровождается нарастанием отека и функциональным повреждением нейронов в процессе окислительного стресса, индуцированного ионами железа с образованием

свободных радикалов [5]. Клеточные и молекулярные компоненты нейровоспаления реализуют процессы вторичного повреждения головного мозга путем активации микроглии, повышения секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, проникновения лейкоцитов в периферическую зону гематомы [6].

Основное место в системе транспорта кислорода занимает КТФК, которая определяет кислородсвязывающие свойства гемоглобина, механизм поступления  $O_2$  в ткани и величину тканевого  $pO_2$  [7]. Модификация сродства гемоглобина к кислороду (СГК) играет важную роль в поддержании прооксидантно-антиоксидантного состояния организма и может служить одним из факторов защиты от повреждения тканей кислородными радикалами при их ишемии-реперфузии.

Таким образом, изучение взаимосвязей между клиническими характеристиками, показателями КОС, КТФК и про-, антиоксидантного баланса позволит уточнить отдельные звенья патогенетической структуры ОЦИ в послеоперационном периоде.

**Цель работы** – изучить показатели кислородтранспортной функции крови (КТФК), кислотно-основного состояния (КОС), про-, антиоксидантной системы, оценить неврологический статус и выявить корреляционные взаимосвязи у пациентов с АА и развитием ОЦИ на 8-10-е сутки после микрохирургического клипирования аневризм.

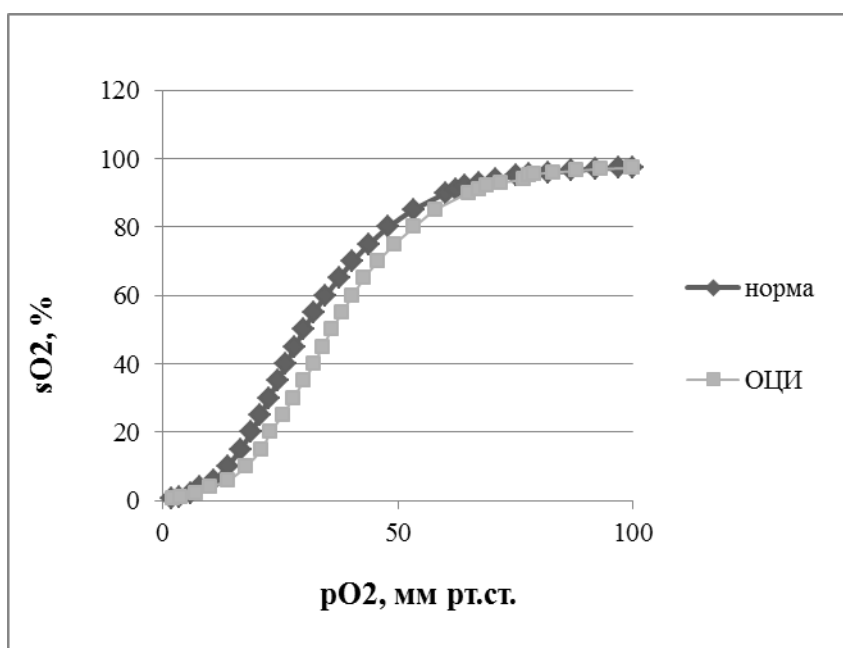
**Материалы и методы исследования.** Изучены показатели КТФК, КОС, про-, антиоксидантной системы у 14 пациентов с ОЦИ (возраст  $49,4 \pm 9,4$  лет), возникшей в послеоперационном периоде после клипирования разорвавшихся ( $n=7$ ) или неразорвавшихся АА ( $n=7$ ). Пациенты получали лечение в нейрохирургических отделениях РНПЦ неврологии и нейрохирургии.

Показатели КТФК, КОС венозной крови изучали на газоанализаторе ABL-800 FLEX. Концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-П) в плазме определяли по методу В.А. Костюка. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в цельной крови исследовали по реакции супероксидзависимого окисления кверцетина, активность каталазы в плазме – по методу М.А. Королюка. Количественное определение концентрации нитратов и нитритов ( $NO_x$ ) в плазме выполняли с помощью реакции Грисса. Оценку тяжести ишемического инсульта проводили с применением шкалы NIHSS (англ. National Institutes of Health Stroke Scale). Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0.

**Результаты исследования.** По данным клинического и МРТ обследования у всех пациентов выявлены очаги ишемии головного мозга. Установлено повышение уровня рН крови до 7,39 (7,37; 7,42) относительно нормальных данных ( $p=0,03$ ). При этом содержание гидрокарбонатного буфера и лактата не отличались от значений здоровых лиц. Сдвиг рН в сторону алкалоза развился на фоне тенденции к гипокапнии в крови пациентов – снижение парциального давления углекислоты до 43,8 (40,2; 46,9) мм рт.ст., что позволяет

считать выявленные алкалолитические изменения, носящие метаболично-респираторный характер. Значение  $p_{50}$  у пациентов с ОЦИ достоверно увеличилось относительно нормы и составило 28,1 (27,1; 29,6) мм рт.ст. ( $p=0,05$ ), что свидетельствует о снижении СГК.

У пациентов с ОЦИ наблюдался сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) вправо в сравнении с положением на графике нормальной КДО, что свидетельствует о снижении СГК в крови (рисунок 1). Данные изменения КТФК можно, вероятно, расценивать, как компенсаторно-приспособительную реакцию при развитии ОЦИ у пациентов с разорвавшимися и неразорвавшимися АА, направленную в первую очередь на снижение дефицита кислорода в области пенумбры.



**Рисунок 1.** Положение кривой диссоциации оксигемоглобина у пациентов с ОЦИ в сравнении с нормальными данными

Показано, что пациенты с ОЦИ имеют тенденцию к повышению концентрации ТБК-П, снижению активности СОД и каталазы при достоверном уменьшении содержания NOx. Оксидантный стресс, оказывая нейротоксическое воздействие на сосудистую стенку церебральных артерий, способствует снижению эндотелийзависимой вазодилатации (таблица 1).

**Таблица 1.** – Активность СОД и каталазы, концентрация ТБК-П, уровень NOx у пациентов с отсроченной церебральной ишемией и практически здоровых лиц, Me (Q1; Q3)

Показатели	Пациенты с ОЦИ	Здоровые лица	Статистическая значимость различий
------------	----------------	---------------	------------------------------------



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

ТБК-П, мкмоль/л	2,0 (1,5; 2,3)	1,62 (1,4; 1,92)	НЗ
СОД, Ед/мл	102,5 (62,0; 156,9)	116 (105,5; 128,0)	НЗ
Каталаза, усл.ед./с*мл	12,6 (7,8; 29,4)	18,6 (13,2; 28,8)	НЗ
НОх, ммоль/л	14,4 (10,4; 16,2)	25,0 (19,0; 26,6)	p=0,00008

Выявлена сильная обратная корреляционная связь между показателями рН и рСО<sub>2</sub> (R= -0,71; p=0,005) и обратная корреляционная связь средней степени между рН и концентрацией лактата (R= -0,59; p=0,04), что подтверждает наличие алкалолитических нарушений у данной группы пациентов. Оценка неврологического статуса по шкале NIHSS в этот период наблюдения достоверно коррелирует с активностью СОД (R= 0,69; p=0,007). Установлена взаимосвязь между активностью СОД и концентрацией NOх (R= 0,58; p=0,005).

**Заключение.** Получены данные о характере биохимических нарушений, возникающих при развитии ОЦИ после микрохирургического клипирования разорвавшихся и неразорвавшихся аневризм. Выявлены корреляционные взаимосвязи между показателями КТФК, КОС, про-антиоксидантной системы и оценкой неврологического статуса у пациентов с ОЦИ, что способствует уточнению отдельных патогенетических звеньев при этой патологии.

### Список литературы

1. Оценка качества клипирования разорвавшихся аневризм сосудов мозга и эффективность применения сульфата магния у пациентов с внутримозговыми кровоизлияниями / Р.Р. Сидорович [и др.] // Мед. новости. – 2021. – № 1. – С. 45-49.
2. Крылов, В.В. Патогенез сосудистого спазма и ишемии головного мозга при нетравматическом субарахноидальном кровоизлиянии вследствие разрыва церебральных аневризм / В.В. Крылов, А.А. Калинин, С.С. Петриков // Неврологический журнал. – 2014. – № 5. – С. 4-11.
3. Inhibition of phosphodiesterase-5 attenuates cerebral vasospasm and improves functional recovery after experimental subarachnoid hemorrhage / В.Н. Hahn [et al.] // Neurosurgery. – 2012. – Vol. 70, N 1. – P. 178-186.
4. Влияние нормобарической гипероксии на оксигенацию и метаболизм головного мозга, состояние окислительного стресса у больных с субарахноидальным кровоизлиянием вследствие разрыва аневризмы сосудов головного мозга / Солодов А.А. [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2013. – № 4. – С. 66-71.
5. Unconjugated bilirubin contributes to early inflammation and edema after intracerebral hemorrhage / Loftspring M.C. [et al.] // Cereb Blood Flow Metab. – 2011. – Vol. 31, N 4. – P. 1133-1142.

6. Wang, J. Inflammation after intracerebral hemorrhage / J. Wang, S. Doré // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2007. – Vol. 27. – P. 894-908.
7. Zinchuk, V.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway / V.V. Zinchuk, L.V. Dorokina // *Nitric Oxide: biology and chemistry.* – 2002. – Vol. 6, № 1. – P. 29-34.

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И  
АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЛАЗМЫ ПАЦИЕНТОВ В КОМЕ**

**Проскурнина Е. В.**

*д. м. н., доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной  
биологии*

*Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова,  
Москва, Россия  
proskurnina@gmail.com*

**Гришина Н. К.**

*врач ультразвуковой диагностики  
лечебно-диагностический центр 9 Министерства обороны Российской  
Федерации, Москва, Россия  
arexaricisim2007@mail.ru*

**Созарукова М. М.**

*к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории синтеза  
функциональных материалов и переработки минерального сырья  
Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова  
Российской академии наук, Москва, Россия  
S\_MadinaM@bk.ru*

**Подлепич В. В.**

*врач анестезиолог-реаниматолог,  
Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии  
имени академика Н.Н.Бурденко Минздрава РФ Москва, Россия  
podlepichv@gmail.com*

**Портнова Г. В.**

*к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории высшей нервной  
деятельности человека  
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской  
академии наук, Москва, Россия  
caviter@list.ru*

*Вовлечение нейтрофильного звена иммунитета — важный фактор в патогенезе тяжелой черепно-мозговой травмы и вторичного воспалительного повреждения нейронов. Цель исследования — изучить варианты окислительного ответа нейтрофилов у пациентов в коме и сопоставить с антиоксидантным потенциалом плазмы крови. Показано, что паттерн окислительного ответа нейтрофилов является чрезвычайно вариабельным, что обуславливает целесообразность его исследования по многоканальному протоколу, включающему как регистрацию базального ответа, так и регистрацию ответа после единичного или двухстадийного стимулирования. Для пациентов в коме характерна антиоксидантная недостаточность плазмы крови, не связанная с повышением активности нейтрофилов.*

**Ключевые слова:** нейтрофилы; антиоксидантный профиль; плазма крови;  
кома

## OXIDATIVE ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF BLOOD PLASMA IN COMA

**Proskurnina E. V.**

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Molecular  
Biology  
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia  
proskurnina@gmail.com*

**Grishina N. K.**

*MD, ultrasound specialist  
Diagnostic and treatment center 9 of the Ministry of Defense of the Russian  
Federation, Moscow, Russia  
apexapicism2007@mail.ru*

**Sozarukova M. M.**

*Candidate of Chemistry, Junior Researcher, Laboratory for Synthesis of  
Functional Materials and Processing of Mineral Raw Materials  
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia  
S\_MadinaM@bk.ru*

**Podlepich V. V.**

*MD, anesthesiologist-resuscitator,  
Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow,  
Russia  
podlepichv@gmail.com*

**Portnova G. V.**

*MD, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of  
Human Higher Nervous Activity, Institute of Higher Nervous Activity and  
Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
caviter@list.ru*

*Involvement of the neutrophils is an important factor in the pathogenesis of severe traumatic brain injury and secondary inflammatory neuronal damage. The aim of the study was to study the variants of the oxidative response of neutrophils in patients in coma and compare them with the antioxidant potential of blood plasma. It has been shown that the pattern of the oxidative response of neutrophils is extremely variable, which makes it necessary to study it using a multichannel protocol, including both the registration of the basal response and the registration of the response after a single or two-stage stimulation. For patients in coma, antioxidant deficiency of blood plasma is characteristic, which is not associated with an increase in neutrophil activity.*

**Keywords:** neutrophils; antioxidant profile; blood plasma; coma

Черепно-мозговая травма является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности. Нейтрофильно-лимфоцитарное отношение

является объективным, доступным, недорогим и воспроизводимым маркером воспаления и вторичного повреждения ткани головного мозга нейтрофилами. Данные свидетельствуют о том, что более высокое значение отношения является независимым предиктором плохих исходов у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой и коррелирует с более низкими показателями по шкале комы Глазго [1]. Однако этот индекс учитывает число нейтрофилов, но не их активность. Для оценки активности перспективными являются хемилюминесцентные методы. Поскольку нейтрофилы являются основными источниками активных форм кислорода в крови, их повышенная активность может вызвать истощение антиоксидантной защиты плазмы.

Цель исследования — изучить варианты окислительного ответа нейтрофилов у пациентов в коме при помощи оригинального протокола и сопоставить с антиоксидантным потенциалом плазмы крови.

### Материалы и методы

**Пациенты.** В исследовании приняли участие 7 пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой, находящихся в коме (мужчины, возраст  $32 \pm 9,5$  лет). Пациенты находились в подострой фазе после травмы (от 7 дней до 3 месяцев, среднее  $28,7 \pm 5,4$  дней). Критерии включения — от 4 до 8 баллов по шкале комы Глазго ( $5,8 \pm 1,3$ ). Критерии исключения — возраст моложе 18, наличие в анамнезе неврологических или психических заболеваний.

**Анализ окислительной активности нейтрофилов.** Измерения хемилюминесценции проводили с помощью хемилюминометра Lum-1200 (ДИСофт, Россия). Окислительную активность нейтрофилов оценивали по 6-канальному протоколу, включающему параллельную регистрацию спонтанной хемилюминесценции в присутствии люминола или люцигенина, ответ нейтрофилов после одностадийной стимуляции форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) или *N*-формилметионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ) в присутствии люминола или люцигенина, и последовательную двухстадийную стимуляцию ФМА+фМЛФ в присутствии люминола (описан в [2]). Из хемилюминограмм рассчитывали ряд показателей и коэффициентов (табл. 1).

**Таблица 1.** - Протоколы стимуляции и рассчитываемые параметры

№	Активатор	Стимул	Параметр	Коэффициенты активации
1	Люминол	—	$A_{\text{люом}}$	
2	Люминол	ФМА	$A_{\text{ФМАлюом}}$	$K_{\text{ФМАлюом}} = A_{\text{ФМАлюом}}/A_{\text{люом}}$
3	Люминол	фМЛФ	$A_{\text{фМЛФ}}$	$K_{\text{фМЛФ}} = A_{\text{фМЛФ}}/A_{\text{люом}}$
4	Люминол	ФМА+фМЛФ	$A_{\text{ФМА+фМЛФ}}$	$K_{\text{ФМА+фМЛФ}} = A_{\text{ФМА+фМЛФ}}/A_{\text{люом}}$
5	Люцигенин	—	$A_{\text{люоц}}$	
6	Люцигенин	ФМА	$A_{\text{ФМАлюоц}}$	$K_{\text{ФМАлюоц}} = A_{\text{ФМАлюоц}}/A_{\text{люоц}}$

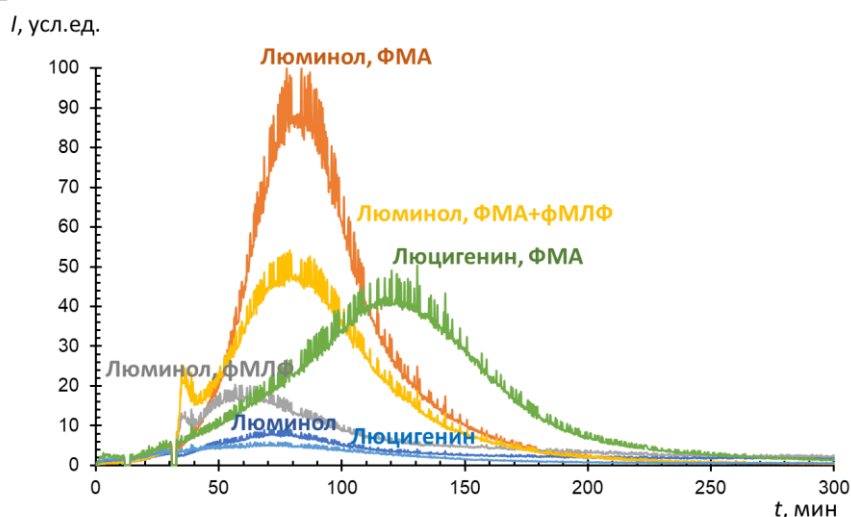
Дополнительно рассчитывали индексы, отражающие соотношение люминол- и люцигенин-активированной хемилюминесценции ( $A_{\text{люом}}/A_{\text{люоц}}$ ,

$A_{\text{ФМАлюм}}/A_{\text{ФМАлюц}}$ ), соотношение интенсивностей двухстимульного и одностимульного ответа ( $A_{\text{ФМА+фМЛФ}}/A_{\text{ФМАлюм}}$ ,  $A_{\text{ФМА+фМЛФ}}/A_{\text{фМЛФ}}$ ),

**Антиоксидантный профиль плазмы крови.** Антиоксидантную активность образца плазмы определяли методом активированной хемилюминесценции в системе генерации свободных радикалов 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (Sigma-Aldrich) в присутствии люминола (Sigma-Aldrich) [3]. В качестве аналитических параметров определяли площадь депрессии сигнала  $S$ , образующегося в результате действия сильных антиоксидантов плазмы (мочевая кислота и аскорбат) и параметр  $\Delta I$ , представляющий разность между новым ( $I$ ) и начальным ( $I_0$ ) стационарными уровнями и отражающий емкость слабых антиоксидантов.

### Результаты и обсуждение.

Пример регистрации окислительной активности нейтрофилов пациента в коже по 6-канальному протоколу приведен на рис. 1. Амплитуды ответа (см. табл. 1) были определены как значение хемилюминесценции в максимуме.



**Рисунок 1.** Хемилюминограммы окислительного ответа нейтрофилов пациента в коже, зарегистрированные по 6-канальному протоколу.

Рассчитанные параметры и индексы качественно сравнили с ранее определенными паттернами нормального ответа. Основные патогенетически значимые различия приведены в табл. 2.

**Таблица 2.** - Патогенетически значимые параметры окислительного ответа нейтрофилов

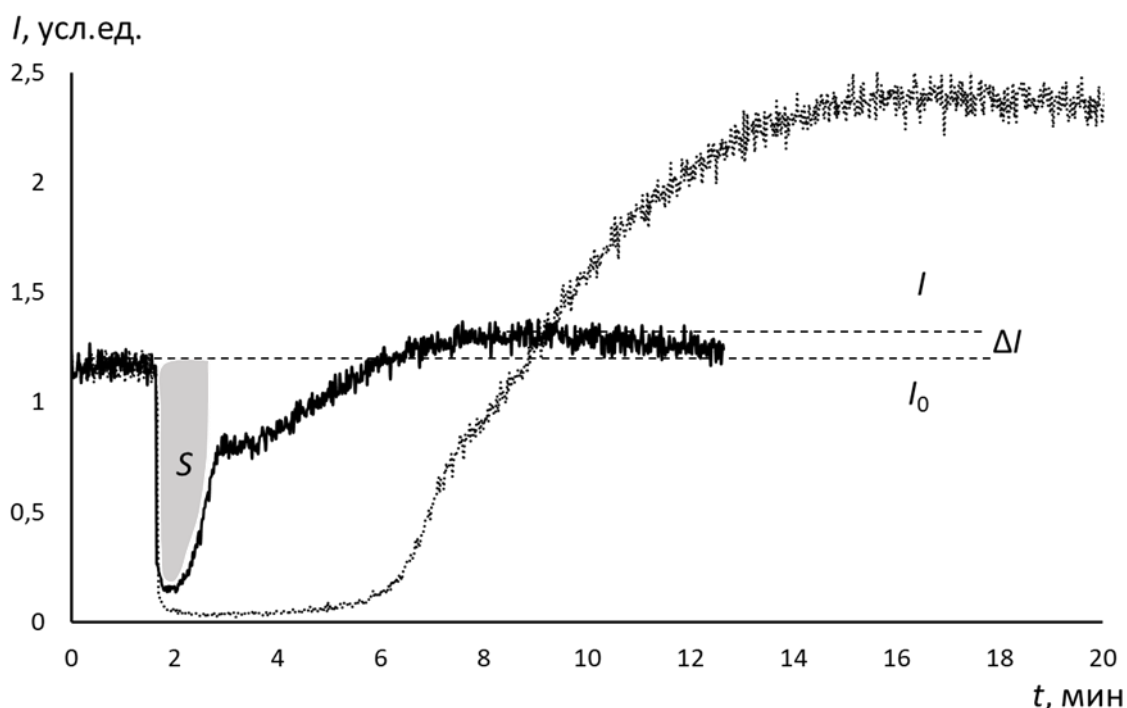
Пациент	$A_{\text{ФМА+фМЛФ}}^*$	$A_{\text{люм}}/A_{\text{люц}}$	$A_{\text{ФМАлюм}}/A_{\text{ФМАлюц}}$	$A_{\text{ФМА+фМЛФ}}/A_{\text{ФМАлюм}}$	$S$
Ч1.	↓	>1	>1	>1	0,5N
П.	↓	<1	<1	<1	0,5N
М.	↑	<1	<1	<1	0,5N
К1.	↓	>1	>1	<1	0,7N
К2.	↑↑↑	>1	>1	>1	0,7N

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Ч2.	N	>1	>1	<1	N
P.	↑↑	>1	>1	<1	0,7N

\* качественно по отношению к референтному интервалу

Из данных следует значительная вариабельность окислительного ответа нейтрофилов, которую сложно связать с каким-либо лабораторным или инструментальным параметром вследствие чрезвычайной сложности патогенеза. Активность нейтрофилов может быть снижена, соответствовать норме, быть повышенной или резко повышенной. Корреляции с баллами по шкале комы Глазго выявлено не было.



**Рисунок 2.** Антиоксидантный профиль плазмы крови пациента в коме (черный контур) и практически здорового донора (серый контур), показан принцип расчета определяемых параметров S («уратная емкость») и  $\Delta I$  («тиоловая» емкость).

«Уратная» антиоксидантная емкость в большинстве случаев (6 пациентов из 7) была значимо снижена (табл. 2), что свидетельствует о выраженном окислительном стрессе (референтный интервал [195; 405]) (см. рис. 2). «Тиоловый» окислительный стресс был значимо выражен у всех пациентов (среднее значение 0,33, SD = 0,24, референтный интервал [1,2-2,2]). Коэффициентов корреляции между активностью нейтрофилов и антиоксидантного профиля не было найдено, что свидетельствует о независимости этих параметров.

**Заключение.** Для такого патогенетически сложного состояния, как кома, во всех случаях не наблюдали единообразного паттерна окислительного ответа нейтрофилов — у каждого пациента был свой уникальный профиль, поэтому

для адекватной оценки активности нейтрофилов целесообразно проводить измерения по нескольким протоколам, включающим как регистрацию базального ответа, так и регистрацию ответа после единичного или двухстадийного стимулирования. Окислительный стресс в «уратном» и особенно «тиоловом» звене характерен для этих пациентов, хотя не является прямым следствием повышения активности нейтрофилов. Следует в дальнейшем изучить этот вопрос в аспекте целесообразности нутритивной поддержки антиоксидантами.

### Список литературы

1. Sabouri E., Majdi A., Jangjui P., Rahigh Aghsan S., Naseri Alavi S. A. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Traumatic Brain Injury: A Review Study // *World Neurosurgery*. — 2020. — V. 140. — P. 142–147.
2. Образцов И. В., Годков М. А., Полимова А. М., Дёмин Е. М., Проскурнина Е. В., Владимиров Ю. А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу // *Российский иммунологический журнал*. — 2015. — Т. 9 (18), № 4. — С. 418–425.
3. Алексеев, А. В., Проскурнина, Е. В., Владимиров, Ю. А. // Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана). *Вестник Московского ун-та, сер: Химия*. 2012. — Т. 53. — С. 187–193.



## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ ХЕМОКИНОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Прохорова В. И.**

*д. м. н., профессор, заведующая  
диагностической лабораторией с группой лучевой диагностики  
государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь,  
Vprohorova@mail.ru;*

**Готько О.В.**

*научный сотрудник диагностической лаборатории с группой  
лучевой диагностики  
babuka\_05@mail.ru.*

**Таганович А.Д.,**

*д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Ковганко Н. Н.,**

*к.х.н., доцент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»  
Минск, Беларусь*

*Показано, что как относительное содержание, так и среднее значение  
флуоресценции клеток крови, содержащих рецепторы CXCR1 и CXCR2,  
представляют значимость для диагностики РМЖ на ранних стадиях.*

**Ключевые слова:** рак молочной железы; кровь; CXCR1; CXCR2

## DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF DETERMINING CHEMOKINE RECEPTORS IN BREAST CANCER

**Prokhorova V. I.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the diagnostic  
laboratory with the radiation diagnostics group of the state institution  
"Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical  
Radiology named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,  
Vprohorova@mail.ru;*

**Gotko O.V.,**

*researcher of the diagnostic laboratory with the radiation  
diagnostics group,  
state institution "Republican Scientific  
and Practical Center of Oncology and Medical Radiology*

*named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,  
babuka\_05@mail.ru,  
**Tahanovich A. D.**,  
doctor of medical sciences., professor,  
head of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,  
**Kauhanka M. M.**,  
candidate of chemical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus  
ataganovich@gmail.com; mikalai44@tut.by;*

*It was shown that both the relative content and the average value of the fluorescence of blood cells containing CXCR1 and CXCR2 receptors are significant for the diagnosis of breast cancer in the early stages.*

**Key words:** breast cancer; blood; CXCR1; CXCR2

**Актуальность.** В настоящее время рак молочной железы (РМЖ) вышел на первое место, как в структуре заболеваемости, так и смертности от злокачественных новообразований среди женщин Республики Беларусь [1]. Примерно у 50,0% женщин, страдающих РМЖ, в течение 5 лет развивается рецидив или прогрессирование заболевания [2].

Продолжается активное обсуждение роли иммунных механизмов в процессе канцерогенеза и зависимости непосредственных и отдаленных результатов лечения от способности организма восстанавливать иммунологический контроль над опухолью [3]. Следует упомянуть, что в настоящее время отсутствуют информативные показатели в крови, которые позволили бы эффективно судить о наличии и распространенности РМЖ. Установлено, что рост и развитие опухоли неизменно сопровождается воспалительной реакцией [4]. Она включает в себя инфильтрацию иммунными клетками и привлечение сигнальных молекул – цитокинов в зону роста опухоли, например, интерлейкина 8. Взаимодействуя с рецепторами CXCR1 и CXCR2, которые экспрессируются клетками опухолевой ткани и лейкоцитами периферической крови, интерлейкин 8 способствует опухолевому росту, ангиогенезу и метастазированию опухоли.

**Цель.** Изучить концентрации рецепторов цитокинов CXCR1 и CXCR2 в крови здоровых людей и крови пациентов, страдающих злокачественными образованиями молочной железы и определить их диагностическую значимость у пациентов с РМЖ.

**Материалы и методы.** Изучено содержание рецепторов хемокинов CXCR1 и CXCR2 в крови 17 пациентов в возрасте 39-57 лет с РМЖ при первом поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова. В качестве группы контроля обследовано 25 здоровых человек в возрасте 43-67 лет. Кровь из локтевой вены испытуемых собирали

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

натошак в вакутайнер с ЭДТА-К2 (Improvacuter, КНР). Определение рецепторов CXCR1 и CXCR2 в клетках крови осуществляли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни для оценки различий между двумя независимыми группами. Критическое значение уровня значимости принимали равным 5%.

**Результаты.** Содержание рецепторов хемокинов CXCR1 и CXCR2 в клетках крови здоровых людей и пациентов с РМЖ представлены в таблице.

**Таблица.** - Содержание рецепторов CXCR1 и CXCR2 в клетках крови здоровых людей и пациентов с РМЖ

Показатель	Контроль	РМЖ	P
CXCR1 лимфоциты, %	5,50 [2,50; 8,90]	10,15 [9,00; 18,70]	<b>0,012</b>
MFI CXCR1 лимфоциты	1,70 [1,60; 2,10]	2,70 [2,30; 3,50]	<b>0,031</b>
CXCR1 моноциты, %	92,80 [91,10; 95,60]	93,95 [78,65; 97,05]	0,812
MFI CXCR1 моноциты	2,30 [2,10; 2,80]	2,60 [2,35; 3,45]	0,054
CXCR1 гранулоциты, %	93,90 [91,90; 94,60]	95,80 [92,25; 96,90]	0,071
MFI CXCR1 гранулоциты	28,30 [26,90; 37,60]	37,70 [31,95; 48,95]	<b>0,024</b>
CXCR2 лимфоциты, %	9,50 [6,60; 11,90]	13,75 [10,15; 18,40]	<b>0,037</b>
MFI CXCR2 лимфоциты	12,20 [7,20; 14,20]	14,30 [11,65; 19,05]	0,059
CXCR2 моноциты, %	94,20 [93,50; 95,70]	96,45 [84,05; 98,15]	0,128
MFI CXCR2 моноциты	13,40 [12,30; 16,10]	18,95 [14,75; 21,45]	<b>0,039</b>
CXCR2 гранулоциты, %	93,30 [91,10; 95,30]	95,10 [91,15; 98,90]	0,233
MFI CXCR2 гранулоциты	92,90 [79,30; 100,50]	93,15 [87,60; 111,90]	0,097

P – достоверность разницы уровня определяемого показателя у пациентов с РМЖ по сравнению со здоровыми людьми.

Из данных таблицы видно, что статистически значимые различия наблюдались в количестве лимфоцитов, содержащих как рецептор CXCR1, так и рецептор CXCR2. Кроме того, статистически значимые отличия выявлены и для средних значений флуоресценции (MFI) для рецептора CXCR1, находящегося на лимфоцитах и гранулоцитах, так и для рецептора CXCR2, входящего в состав лимфоцитов и моноцитов.

**Заключение.** Как относительное содержание, так и среднее значение флуоресценции клеток крови, содержащих рецепторы CXCR1 и CXCR2, представляют значимость для диагностики РМЖ на ранних стадиях.

### **Список литературы**

1. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2009-2018 гг. / А. Е. Океанов [и др.]; под ред. О. Г. Суконко. – Минск: Нац. б-ка Беларуси, 2019. – 420 с.
2. Особливості діагностики та клінічного перебігу різних імуногістохімічних підтипів раку молочної залози / Хажж М. Х. Ель, І. М. Бондаренко, О. І. Асеев, І. С. Шпонька, В. Ф. Завізіон, А. С. Складар, Л. М. Вініченко, М. І. Ходжуж, А. В. Куник, М. В. Артеменко // Медичні перспективи. - 2014. - Т. 19, № 3. - С. 29-35.
3. Кухарев Я.В., Стахеева М.Н., Дорошенко А.В., Литвяков Н.В., Бабышкина Н.Н., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Связь иммунологических показателей с эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2013. - № 2. – С. 50-57.
4. Kartikasari A., Huertas C.S., Mitchell A., Plebanski M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. Front Oncol. 2021. – № 11. – 692142.

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ С ПОМОЩЬЮ  
НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РОСТА (BDNF, NGF-В, CNTF) У  
ПАЦИЕНТОВ С ГЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**Прохорова В. И.**

*д. м. н., профессор, заведующая  
диагностической лабораторией с группой лучевой диагностики  
государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь,  
Vprohorova@mail.ru;*

**Красный С.А.**

*д. м. н., профессор, член-корреспондент  
национальной академии наук Беларуси, заместитель директора  
по научной работе государственного учреждения «Республиканский  
научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь,  
sergeykrasny@tut.by;*

**Державец Л. А.**

*д. б. н., заведующая клинично-  
диагностической лабораторией, государственного учреждения  
«Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской  
радиологии им. Н.Н. Александрова г. Минск, Беларусь,  
l-dzerzhavets@mail.ru;*

**Цырусь Т. П.**

*к. б. н., ведущий научный сотрудник  
диагностической лаборатории с группой лучевой диагностики  
государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова г. Минск, Беларусь,  
toma\_minsk@mail.ru;*

**Готько О.В.**

*научный сотрудник диагностической лаборатории с группой  
лучевой диагностики  
babuka\_05@mail.ru.*

**Грачев Ю. Н.**

*к.м.н., заведующий нейрохирургическим отделением  
государственного учреждения  
«Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской  
радиологии им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь,*

**Грицкова О. А.,**

*младший научный сотрудник  
диагностической лаборатории с группой лучевой диагностики*

*государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь,*

*В сыворотке крови пациентов с глиальными опухолями головного мозга методом иммуноферментного анализа исследовано содержание нейротрофических факторов роста (нейротрофический фактор головного мозга, фактор роста нервов- $\beta$ , цилиарный нейротрофический фактор). Исследование выполнено до начала лечения. Установлена корреляционная зависимость нейротрофического фактора головного мозга ( $\tau_{\text{Kendall}}=0,43$ ,  $p<0,001$ ) и фактора роста нервов- $\beta$  ( $\tau_{\text{Kendall}} = 0,17$ ,  $p=0,001$ ) со степенью дифференцировки опухоли.*

***Ключевые слова:** глиальные опухоли головного мозга; нейротрофический фактор головного мозга; фактор роста нервов- $\beta$ ; цилиарный нейротрофический фактор*

### **PREDICTION OF TUMOR PROGRESSION USING NEUROTROPHIC GROWTH FACTORS (BDNF, NGF- $\beta$ , CNTF) IN PATIENTS WITH GLIAL BRAIN TUMORS**

***Prokhorova V. I.,***

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the diagnostic laboratory with the radiation diagnostics group of the state institution "Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,*

*[Vprohorova@mail.ru](mailto:Vprohorova@mail.ru);*

***Krasny S.A.,***

*Doctor of Medical Sciences, Professor, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, Deputy Director for Scientific Work of the state institution "Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,*

*[sergeykrasny@tut.by](mailto:sergeykrasny@tut.by);*

***Derzhavets L. A.,***

*Doctor of Biological Sciences, Head of the clinical and diagnostic laboratory, state institution "Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,*

*[l-dzerzhavets@mail.ru](mailto:l-dzerzhavets@mail.ru);*

***Tsyrus T.P.,***

*Candidate of Biological Sciences, Leading researcher diagnostic laboratory with a group of radiation diagnostics of the state institution "Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Alexandrov. Minsk, Belarus,*

*[toma\\_minsk@mail.ru](mailto:toma_minsk@mail.ru);*

**Gotko O. V.,**  
*researcher of the diagnostic laboratory with the radiation  
diagnostics group of the state institution "Republican Scientific  
and Practical Center of Oncology and Medical Radiology  
named after N.N. Alexandrov , Minsk, Belarus,  
babuka\_05@mail.ru.*

*In the blood serum of patients with glial brain tumors, the content of neurotrophic growth factors (brain neurotrophic factor, nerve growth factor- $\beta$ , ciliary neurotrophic factor) was studied by enzyme immunoassay. The study was performed before the start of treatment. The correlation of brain neurotrophic factor ( $\tau_{kendall}=0.43$ ,  $p<0,001$ ) and nerve growth factor- $\beta$  ( $\tau_{kendall} = 0.17$ ,  $p=0.001$ ) with the degree of tumor differentiation was established.*

**Key words:** *glial brain tumors; brain neurotrophic factor; nerve growth factor- $\beta$ ; ciliary neurotrophic factor*

**Актуальность.** Проблема оказания своевременной и квалифицированной нейроонкологической помощи населению является сложной, многопрофильной и требующей выработки новых путей решения. Многие исследователи отмечают в последние годы повышение уровня заболеваемости злокачественными опухолями головного мозга, что объясняется как внедрением новых методов и технологий диагностики, так и фактическим увеличением случаев новообразований.

Важным прогностическим показателем у онкологических пациентов с глиальными опухолями головного мозга является степень злокачественности опухоли. Определение степени злокачественности (G) опухолей центральной нервной системы (ЦНС) основано на выявлении определенных гистологических признаков и ретроспективном анализе клинического течения конкретных гистологических форм новообразований. Каждой нозологической форме соответствует своя степень злокачественности [1].

К опухолям ЦНС GI относят новообразования с низким пролиферативным потенциалом и с минимальной ядерной атипией, которые могут быть излечены путем хирургического лечения. Опухоли ЦНС GII характеризуются инфильтративным ростом и низким уровнем пролиферативной активности, однако склонны к рецидивированию. Также некоторые типы опухолей GII (диффузные астроцитомы, олигодендроглиомы и смешанные глиомы) обладают способностью к повышению степени злокачественности (например, низкоккачественная диффузная астроцитома с течением времени может трансформироваться в анапластическую астроцитому и глиобластому). К опухолям ЦНС GIII относят новообразования с гистологическими признаками злокачественности, включая ядерную атипию и выраженную митотическую активность. Опухоли ЦНС GIV являются цитологически злокачественными новообразованиями с высоким уровнем митотической активности, очаговыми некрозами и сосудистой (эндотелиальной) пролиферацией. Опухоли ЦНС GIV



часто проявляются быстрым прогрессированием заболевания и смертельным исходом. Примерами опухоли ЦНС GIV являются глиобластома, большинство эмбриональных опухолей и многие саркомы. К опухолям низкой степени злокачественности (Low grade) принадлежат опухоли GI–GII, к высокой степени злокачественности (High grade) – GIII–IV.

Прогноз для пациентов с глиальными опухолями головного мозга неутешителен: при глиобластоме (Grade IV) медиана выживаемости немногим более 1 года и 5-летняя выживаемость менее 5%, при анапластической астроцитоме (Grade III) медиана выживаемости около 3 лет и 5-летняя выживаемость 27%; и только присутствие олигодендроглиального компонента (анапластическая олигодендроглиома и анапластическая олигоастроцитомы (Grade III) в опухоли может повысить медиану выживаемости до 5 лет, а 5-летнюю выживаемость – до 50%.

С позиций комплексного подхода к определению степени дифференцировки опухоли и риска опухолевой прогрессии интенсивно изучается содержание в крови онкологических пациентов цитокиновых факторов роста. В отечественной и зарубежной литературе имеются работы, в которых обсуждаются механизмы, лежащие в основе влияния исследуемых факторов на развитие опухолей, а также вопросы использования отдельных ростовых факторов в качестве биомаркеров [2, 3].

Рядом исследований установлено, что взаимодействие нейронов с опухолевыми и стромальными клетками способствует прогрессии различных злокачественных новообразований. Увеличение удельного веса нейронов в опухолевой ткани коррелирует с большей агрессивностью заболевания. Патологический процесс в головном мозге неизбежно приводит к структурным повреждениям нервной ткани и нарушению функциональной целостности гематоэнцефалического барьера, что сопровождается выходом нейротрофических белков в кровь. Поэтому дискуссионным остается вопрос о включении нейротрофических факторов роста в прогностические системы, которые в онкологической практике позволят выделить глиальные опухоли головного мозга с различным клиническим течением и предположить с высокой вероятностью прогрессирование, рецидивирование и метастазирование.

**Цель.** Оценить прогностическую значимость нейротрофических факторов роста при прогрессировании глиальных опухолей головного мозга.

**Материалы и методы.** Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови исследованы нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов- $\beta$  (NGF- $\beta$ ) и цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) у 30 здоровых лиц и 154 пациентов с глиальными опухолями головного мозга до начала противоопухолевого лечения. Распределение пациентов по степени злокачественности опухоли было следующим: Grade I – 5, G II – 44, G III – 18, Grade IV – 87 пациентов. Для анализа данных использовали непараметрические методы статистики. Статистическая обработка результатов исследования выполнена с помощью компьютерного пакета программ



STATISTICA (версия 10.0). Количественные значения показателей описывались в виде медиано-квартильных характеристик – медианы, минимального нижнего и верхнего квартилей. Для оценки степени связи между ранговыми и количественными переменными применялся коэффициент корреляции Кендалла ( $\tau_{\text{Kendall}}$ ). Различия считали значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В зависимости от степени дифференцировки опухоли у пациентов с глиальными опухолями головного мозга полученные данные свидетельствуют об уровне медианы нейротрофического фактора головного мозга при Grade I, равной 1 071,0 нг/мл, нижний квартиль при этом равен 994,5 нг/мл, верхний квартиль составил 1 077,0 нг/мл. при Grade II – уровень медианы равен 1 383,0 нг/мл, нижний квартиль – 1 161,0; верхний квартиль – 1 839,0) нг/мл, при Grade III – уровень медианы равен – 2 225,0 нг/мл, нижний квартиль – 1 647,0 нг/мл, верхний квартиль – 2 823,0 нг/мл и при Grade IV – уровень медианы равен 2 823,0 нг/мл, нижний квартиль – 1 779,0 нг/мл и верхний квартиль – 3 276,0 нг/мл ( $\tau_{\text{Kendall}}=0,43$ ,  $p < 0,001$ ).

Медиана фактора роста нервов- $\beta$  при Grade I составила 6,6 пг/мл, нижний квартиль 6,6 пг/мл и верхний квартиль – 18,3 пг/мл, при Grade II – медиана составила 17,0 пг/мл, нижний квартиль – 5,4 пг/мл и верхний квартиль – 101,0 пг/мл, при Grade III – медиана составила 17,5 пг/мл, нижний квартиль – 7,7 пг/мл и верхний квартиль – 108,9 пг/мл и при Grade IV – медиана составила – 33,8 пг/мл, нижний квартиль – 25,1 пг/мл и верхний квартиль – 41,2 пг/мл ( $\tau_{\text{Kendall}} = 0,17$ ,  $p=0,001$ ).

Медиана цилиарного нейротрофического фактора при Grade I составила 20,2 нг/мл, нижний квартиль – 14,9 нг/мл и верхний квартиль – 25,7 нг/мл, при Grade II медиана составила 20,4 нг/мл, нижний квартиль – 15,7 нг/мл и верхний квартиль – 24,5 нг/мл, при Grade III – медиана составила 19,7 нг/мл, нижний квартиль – 13,1 нг/мл и верхний квартиль – 26,8 нг/мл и при Grade IV – медиана составила – 20,1 нг/мл, нижний квартиль – 15,0 нг/мл и верхний квартиль – 21,9 нг/мл ( $\tau_{\text{Kendall}} = -0,06$ ,  $p=0,435$ ).

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что высокое содержание нейротрофических факторов роста BDNF, NGF- $\beta$  коррелирует с прогрессированием глиальных опухолей головного мозга, что может быть использовано для прогнозирования и мониторинга лечения онкологических пациентов с глиальными опухолями головного мозга.

### Список литературы

1. Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований: клинический протокол / под ред. О. Г. Суконко, С. А. Красного. – Минск : Профессиональные издания, 2019. – 616 с.
2. Сахарнова, Т. А. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и его роль в функционировании центральной нервной системы / Т. А. Сахарнова, М. В. Ведунова, И. В. Мухина // Нейрохимия. – 2012. – Т. 24, № 4. – С. 269–277.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

3. Short communication: interaction of nerve growth factor (NGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in healthy individuals / A. Groh [et al.] // Disease

4. Markers. – Vol. 2019. – Article ID 7510315, 5 pages  
<https://doi.org/10.1155/2019/7510315>.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ pH НА ИНТЕНСИВНОСТЬ  
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФЕНОКСАЗИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ПРИ  
ДЕЙСТВИИ HOCl**

**Reut V. E.**

*аспирант кафедры биофизики физического факультета Белорусского  
государственного университета, г. Минск, Беларусь  
ReutVE@bsu.by;*

**Григорьева Д. В.**

*к. б. н., доцент кафедры биофизики физического факультета  
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь  
dargr@tut.by;*

**Горудко И. В.**

*к. б. н., доцент, доцент кафедры биофизики физического факультета  
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь  
irinagorudko@gmail.com*

Хлорноватистая кислота (HOCl), образующаяся в реакциях, катализируемых ферментом азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидазой (МПО), является не только мощным антимикробным агентом, однако также участвует в развитии множества заболеваний. В настоящее время активно ведется поиск специфичного и чувствительного зонда для обнаружения HOCl в клеточных средах. Ранее нами сообщалось, что красители феноксазинового ряда целестиновый синий В и галлоцианин могут быть принципиально применены для идентификации активных форм кислорода и галогенов в клеточных суспензиях. Целью данной работы явилось исследование оптимума флуоресцентного ответа данных красителей в присутствии HOCl в зависимости от pH среды. Было показано, что оба красителя обладают оптимумом работы при физиологических значениях pH.

**Ключевые слова:** целестиновый синий В; галлоцианин; хлорноватистая кислота; миелопероксидаза; нейтрофилы; флуоресценция

**EVALUATING THE EFFECT OF pH ON FLUORESCENCE INTENSITY OF  
PHENOXAZINE DYES UPON HOCl OXIDATION**

**Reut V. E.**

*PhD student of the Department of Biophysics of the Physics Faculty of Belarusian  
State University, Minsk, Belarus  
ReutVE@bsu.by;*

**Grigorieva D. V.**

*PhD in Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Biophysics of  
the Physics Faculty of Belarusian State University, Minsk, Belarus  
dargr@tut.by;*

**Gorudko I. V.**

*PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biophysics of the Physics Faculty of Belarusian State University, Minsk, Belarus  
irinagorudko@gmail.com*

*Hypochlorous acid (HOCl), formed in reactions catalyzed by the enzyme of azurophilic granules of neutrophils – myeloperoxidase (MPO), is not only a potent antimicrobial agent, but is also involved in evolution of numerous diseases. Currently, the development a specific and sensitive probe for HOCl detection in cellular media is remains the main challenge. We previously reported that celestine blue B and gallocyanine can be used in principle to identify reactive oxygen species and halogens in cell suspensions. The aim of this work is to study the pH optima of fluorescence response of these dyes in the presence of HOCl. It has been shown that both dyes to perform optimally at physiological pH values.*

**Keywords:** *celestine blue B; gallocyanine; hypochlorous acid; myeloperoxidase; neutrophils; fluorescence*

Ключевым агентом антимикробной защиты нейтрофилов является миелопероксидаза (МПО), фермент азурофильных гранул. При физиологической концентрации  $\text{Cl}^-$  МПО катализирует образование высокорекреационной хлорноватистой кислоты (НОСl) в присутствии пероксида водорода, одного из продуктов респираторного взрыва нейтрофилов. При действии целого ряда стимулов может происходить дегрануляция нейтрофилов, что приводит к высвобождению из клеток множества антимикробных белков, включая МПО, которая способствует эффективному устранению большого количества патогенов. Однако повышенные концентрации МПО, а также биомаркеров хлорирования (3-хлортирозин, 5-хлорурацил) наблюдаются в условиях развития окислительного/галогенирующего стресса, в том числе при таких заболеваниях как инфаркт миокарда, ревматоидный артрит, почечная недостаточность, муковисцидоз и др. [1]. Следовательно, необходимы доступные и чувствительные методы, позволяющие определять НОСl как внутри отдельных клеток, так и во внеклеточном пространстве.

Обнаружение НОСl с применением флуоресцентных зондов – востребованный метод, позволяющий непрерывно анализировать активность МПО в функционирующих нейтрофилах и обнаруживать локализацию продукции НОСl. В настоящее время ведется активный поиск селективных и чувствительных зондов для НОСl, способных обнаруживать ее в физиологических условиях. Ранее нами было показано, что перспективными зондами для регистрации НОСl являются феноксазиновые красители галлоцианин (GC) и целестиновый синий В (CB) [2,3]. В данной работе было изучено влияние pH среды на эффективность обнаружения НОСl красителями GC и CB.

Измерения спектров поглощения и флуоресценции проводились на спектрофлуориметре Solar CM-2203 (Минск, Беларусь) при комнатной

температуре. Флуоресценцию красителей исследовали при следующих параметрах: а) возбуждение флуоресценции СВ при 430 нм, регистрация – в диапазоне 460–700 нм; б) возбуждение флуоресценции GC при 360 нм, регистрация – при 390–700 нм. Для изучения рН зависимости использовали фосфат-цитратный буфер (рН 2,2–8,0). рН полученных растворов проверяли при помощи рН-метра Hanna HI 2211-02 (Hanna Instruments, Грац, Австрия). Раствор HOCl готовили путем разбавления коммерческого раствора NaOCl в деионизированной воде. Использовали такое соотношение СВ/GC и HOCl, при котором на одну молекулу красителя приходилось две молекулы HOCl. Дополнительно исследовали положение максимумов поглощения красителей в пределах длин волн 350–750 нм.

Вначале исследовали собственную интенсивность флуоресценции красителя СВ (20 мкМ). Было показано, что фоновый уровень интенсивности флуоресценции СВ крайне мал в исследуемом диапазоне длин волн и практически не зависел от рН в пределах рН 2,2–8,0. Далее исследовали влияние рН на интенсивность флуоресценции продукта реакции СВ с HOCl. Для этого в кювету, содержащую буферный раствор добавляли краситель и окислитель как описано выше и через 5 минут снимали спектры флуоресценции продукта реакции. Интенсивность флуоресценции продукта реакции СВ с HOCl не отличалась от фонового уровня при рН 2,2–4,0. При увеличении рН наблюдалось усиление свечения продукта реакции с максимумом при рН 7,0–7,5, однако дальнейшее увеличение рН приводило к снижению интенсивности флуоресценции до фоновых значений. Максимум в спектрах поглощения СВ при рН 2,2 наблюдали при длине волны 536 нм. При увеличении рН до 4,0 в спектре отчетливо выделялись две полосы с максимумами при 536 и 648 нм. При рН 6,0–7,5 максимум спектра поглощения красителя соответствовал длине волны 648 нм. При увеличении рН до 8,0 наблюдали размытие спектра поглощения: преобладала полоса поглощения при 648 нм и слабый пик при 536 нм. Таким образом, уменьшение эффективности СВ в обнаружении HOCl при малых и высоких значениях рН можно отнести к изменению собственных физико-химических свойств красителя.

Аналогичные измерения были проведены для GC (5 мкМ). Фоновый уровень интенсивности флуоресценции GC оказался незначительным в исследуемом диапазоне рН. Интенсивность флуоресценции продукта реакции GC с HOCl линейно возрастала с увеличением рН, достигая максимума в диапазоне рН 6,0–8,0. В спектрах поглощения GC при рН 2,2 максимум приходился на длину волны 532 нм. При увеличении рН до 4,0 спектр становился размытым с максимумом при 622 нм и ярко выраженной полосой поглощения при 532 нм. При рН 6,0–8,0 максимум спектра поглощения красителя соответствовал длине волны 626 нм. Таким образом, уменьшение эффективности GC в обнаружении HOCl при малых значениях рН можно отнести к изменению собственных физико-химических свойств красителя, а при высоких – к уменьшению доступного для реакции HOCl.

Стоит отметить, что рК  $\text{HOCl}$  составляет  $\sim 7,4-7,5$ , и в условиях, близких к физиологическим обе формы  $\text{HOCl}$  и  $\text{OCl}^-$  присутствуют примерно в равных количествах, однако их соотношение сильно зависит от рН среды. Константа скорости реакции  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  с различными соединениями возрастает по мере снижения рН и образования  $\text{HOCl}$  [4]. Таким образом, снижение эффективности красителей по обнаружению  $\text{HOCl}$  при низких значениях рН связано с изменением их физико-химических свойств, что можно наблюдать по значительному сдвигу (более 90 нм) максимумов поглощения красителей при рН 2,2 и 4,0.

Обнаружение  $\text{HOCl}$  в различных компартментах клетки в последнее время становится важным аспектом, учитываемым при разработке зондов, нацеленных на органеллы [5]. Поэтому особенно важно соотносить рабочий диапазон рН зонда с рН клеточных компартментов. Оптимумы работы исследуемых нами красителей позволяют принципиально обнаруживать  $\text{HOCl}$  в большинстве компартментов клетки (цитоплазма, пероксисомы, ядро, эндоплазматический ретикулум, в межмембранном пространстве митохондрий). Тем не менее, обнаружение  $\text{HOCl}$  в лизосомах, секреторных везикулах и матриксе митохондрий будет все еще затруднено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что СВ и GC способны регистрировать  $\text{HOCl}$  в диапазоне рН, соответствующем физиологическим значениям и могут быть использованы в качестве доступного инструмента обнаружения  $\text{HOCl}$  и регистрации активности МПО.

*Работа поддержана грантом БРФФИ (Б20Р-215).*

### Список литературы

1. Panasenko, O. M. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems / O. M. Panasenko, I. V. Gorudko, A. V. Sokolov // Biochemistry (Moscow). – 2013. – Vol. 78, № 13. – P. 1466–1489.
2. Луценко, В. Е. Целестиновый синий В – зонд для регистрации продукции хлорноватистой кислоты и  $\text{HOCl}$ -модифицированных белков / В. Е. Луценко [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19, № 2. – С. 63–71.
3. Луценко, В. Е. Взаимодействие активных форм кислорода с галлоцианином при активации нейтрофилов / В. Е. Луценко [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2020. – Т. 63, № 6. – С. 730-735.
4. Pattison, D. I. Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds / D. I. Pattison, M. J. Davies // Chemical Research in Toxicology. – 2001. – Vol. 14, № 10. – P. 1453–1464.
5. Gao, P. Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging / P. Gao [et al.] // Chemical Science. – 2019. – Vol. 10, № 24. – P. 6035–6071.



**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕТИНОИДОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ ПРОТЕАЗЫ/АНТИПРОТЕАЗЫ В ЛЕГКИХ МОРСКИХ СВИНОК В ДИНАМИКЕ ГИПЕРОКСИИ**

**Котович И.Л.,**

*к.м.н., доцент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

**Рутковская Ж.А.,**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»,  
к.м.н., доцент кафедры биологической химии*

**Таганович А.Д.,**

*д.м.н, профессор, зав. кафедрой биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

**Дубейко А. В.,**

*студент 2-го курса,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,  
, Минск, Беларусь*

*Ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом уменьшает интенсивность протеолитических процессов в легких новорожденных морских свинок в условиях длительной гипероксии за счет уменьшения соотношения «эластаза/альфа-1-протеазный ингибитор» и увеличения уровня коллагена в легких.*

**Ключевые слова:** гипероксия; протеазы; коллаген; ретиноиды

**THE USE OF RETINOIDS TO CORRECT CHANGES IN THE PROTEASE/ANTIPROTEASE SYSTEM IN THE LUNGS OF GUINEA PIGS IN HYPEROXIA**

**Katovich I.L.,**

*candidate of medical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry*

**Rutkovskaya Zh.A.,**

*candidate of medical sciences,  
associate professor of the department of biological chemistry*

**Tahanovich A.D.,**

*doctor of medical sciences, professor, head of the department  
of biological chemistry,*

**Dubeyko A. V.,**

*2<sup>nd</sup> year student,*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

*Inhaled administration of retinoids incorporated in liposomes reduces the intensity of proteolytic processes in the lungs of newborn guinea pigs under conditions of prolonged hyperoxia by reducing the ratio of "elastase / alpha-1-protease inhibitor" and increasing the level of collagen in the lungs.*

**Key words:** *hyperoxia; proteases; collagen; retinoids*

Респираторный дистресс-синдром (РДС) — одна из серьезных проблем, с которой приходится сталкиваться врачам, выхаживающим недоношенных младенцев, рожденных на сроке менее 37 недель беременности. Незрелость легочной ткани требует проведения искусственной вентиляции легких (ИВЛ) [2]. Использование ИВЛ и высоких концентраций кислорода на фоне незрелости антиоксидантной системы новорожденных и дефицита сурфактанта приводит к микроциркуляторным нарушениям в легочной ткани, формированию воспалительной реакции и фиброзированию пораженных участков легких. В результате использования ИВЛ у 16-40% новорожденных развивается бронхолегочная дисплазия (БЛД) [3]. Эффективные способы предотвращения развития БЛД в настоящее время отсутствуют, в связи с этим актуальной задачей является изучение возможности коррекции метаболических нарушений в легких, вызванных гипероксией.

Витамин А играет важную роль в процессах развития и репарации легких. Помимо антиоксидантного действия, ретиноиды принимают участие в развитии иммунологического и воспалительного ответа за счет регуляции синтеза цитокинов и факторов роста на уровне транскрипции [4]. Энтеральное введение витамина А для профилактики БЛД у недоношенных оказалось не эффективным [6]. При внутримышечном введении высоких доз витамина А новорожденным с экстремально низкой массой тела при рождении было отмечено некоторое уменьшение частоты развития БЛД и процента смертельных случаев [1].

Одним из способов, повышающим эффективность препаратов, считается их включение в липосомы, что облегчает проникновение веществ в клетки и увеличивает продолжительность их действия. При заболеваниях легких липосомы могут быть эффективным средством доставки веществ к клеткам альвеолярного эпителия. Ингаляционное введение ретиноидов ранее не применялось.

Цель настоящего исследования: изучить влияние ретиноидов, включенных в состав липосом на содержание коллагена, нейтрофильной эластазы и активность альфа1-протеиназного ингибитора в легких новорожденных морских свинок в динамике гипероксии.

Материалы и методы: в эксперименте использовали новорожденных морских свинок, которые находились на стандартном рационе вивария УО «БГМУ».

Были сформированы четыре группы наблюдения: «контроль», «контроль + ретиноиды», «гипероксия», «гипероксия + ретиноиды». Животных опытных групп в течение суток после рождения помещали в плексигласовую камеру, в которой в течение всего времени инкубации поддерживали концентрацию кислорода не менее 70%. Длительность наблюдения составляла 3 и 14 суток. Контрольные животные в течение такого же периода времени дышали обычным воздухом. В каждой экспериментальной группе находилось 4-5 животных.



Для ингаляционного введения препарата использовали компрессорный небулайзер Comp Air (NE-C28-E, Omron, Китай). Ингаляции проводили 1 раз в два дня, всего дважды в течение 3 суток и 7 раз в течение 14 суток воздействия гипероксии.

Для ингаляций использовали свежеприготовленную смесь мультиламеллярных липосом, содержащих ретинол (6 мг/кг), ретиноевую кислоту (0,6 мг/кг), ДПФХ (45 мг/кг) и натрий-фосфатный буфер (0,1 моль/л) с ЭДТА (0,1 ммоль/л), pH=7,4.

По окончании эксперимента животных наркотизировали (тиопентал натрия 15 мг/кг интраперитонеально) и получали материал для исследования не ранее чем через 22 часа после последнего введения препарата.

В качестве материала для исследования использовали гомогенат легких.

*Содержание нейтрофильной эластазы* определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора реагентов фирмы USCN Life Science Inc. (Китай). Содержание эластазы в гомогенатах выражали в пг/мг белка/г ткани.

*Активность альфа1-протеиназного ингибитора (А1-ПИ)* определяли спектрофотометрическим методом, предложенным В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной. Метод основан на торможении аргинин-эстеразной активности трипсина с использованием N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) в качестве субстрата. Активность А1-ПИ выражали в ингибиторных единицах (МИЕ/мг белка/г ткани).

Для *определения содержания коллагена* в гомогенатах легких использовали метод 24-часовой экстракции его кислыми растворителями после предварительного удаления примесей растворимых неколлагеновых белков. Содержание коллагена в гомогенатах выражали в мкг/г ткани/сутки.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8,0. Сравнение выборок, распределение которых было отличным от нормального, проводили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни (U-тест).

Результаты исследования. Кратковременное (3 суток) воздействие гипероксии не оказало влияния на содержание нейтрофильной эластазы в легких новорожденных животных (результаты представлены в таблице). Повреждающий эффект эластазы в тканях может сдерживаться рядом ингибиторов, главным из которых является А1-ПИ. Активность А1-ПИ в легких была достоверно повышена в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем через 3 суток после воздействия гипероксии, что, вероятно, и препятствовало увеличению содержания эластазы в ткани легкого.

При увеличении продолжительности воздействия высоких концентраций кислорода до 14 суток активность А1-ПИ оставалась высокой, но не увеличилась по сравнению с группой животных, которые подвергались непродолжительной гипероксии (3 суток). Содержание эластазы в легких животных в эти сроки достоверно увеличилось и превысило контрольные значения в 3 раза ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты свидетельствуют, что усиление активности А1-ПИ оказалось эффективным только при непродолжительном воздействии гипероксии (3 суток). При увеличении сроков гипероксии до 14 суток увеличение активности А1-ПИ не оказало должного сдерживающего эффекта, в результате чего возросло содержание нейтрофильной эластазы в легких. Можно предполагать наличие нескольких механизмов, сдерживающих увеличение активности А1-ПИ в легких при длительном воздействии высоких концентраций кислорода. Во-первых, данный ингибитор является чувствительным к окислительному повреждению, так как в его активном центре присутствует метионин, способный окисляться с образованием метионин сульфоксида, что приводит к инактивации фермента. Как известно из литературы, в условиях гипероксии окислительная модификация белков усиливается. Этому способствует усиление продукции активных форм кислорода. Другой причиной, может быть протеолитическое расщепление молекул А1-ПИ, так как в зоне воспаления увеличивается активность металло- и сериновых протеаз, которые продуцируются нейтрофилами и макрофагами в легких. Недостаточность ингибиторов протеаз в легких может быть не только причиной развития деструктивных процессов, характерных для бронхолегочной дисплазии, но и определять течение и прогноз данного заболевания в целом.

**Таблица.** - Влияние ретиноидов в составе липосом на активность альфа1-протеиназного ингибитора, содержание нейтрофильной эластазы и коллагена в легких новорожденных морских свинок в условиях гипероксии

Показатель	Группа		Без коррекции	+ Ретиноиды
А1-ПИ, мИЕ/мг белка/г ткани	3 суток	контроль	17,0 (6,4 – 28,3)	9,9 (8,8 – 10,7)
		гипероксия	30,9 (10,5 – 47,1)*	27,8 (19,5 – 38,2)
	14 суток	контроль	12,4 (6,3 – 28,3)	9,1 (8,5 – 11,7)
		гипероксия	22,1 (14,3 – 37,2)*	31,1 (17,5 – 35,3)*
Эластаза, пг/мг белка/г ткани	3 суток	контроль	10,4 (9,5 – 15,4)	12,4 (9,4 – 14,3)
		гипероксия	8,7 (5,7 – 17,2)	9,1 (8,2 – 13,5)
	14 суток	контроль	13,5 (10,2 – 19,2)	7,9 (6,3 – 9,4)*
		гипероксия	40,1 (22,0 – 63,4)*	8,4 (5,6 – 13,7)^
Коллаген, мкг/г ткани/24часа	3 суток	контроль	501,6 (451,1 – 593,5)	597,1 (496,3 – 723,5)
		гипероксия	633,9	544,7

			(564,9 – 809,4)*	(461,7 – 587,5)
	14 суток	контроль	512,8 (443,2 – 563,5)	558,6 (460,5 – 658,9)
		гипероксия	364,9 (242,9 – 453,3)*	878,3 (728,4 – 904,3)*^

Примечание – здесь и далее в таблицах: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «контроль без коррекции», ^ -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой «гипероксия без коррекции».

Повреждения в системе протеазы-антипротеазы должно отражать наличие повреждений в белковых структурах легких в условиях гипероксии.

Для подтверждения мы определили содержание коллагена, который является основной мишенью для эластазы. Полученные данные показали, что на 14-е сутки содержание коллагена в легких опытных животных уменьшилось в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ).

Введение ретиноидов в группе «гипероксия 14 суток» не привело к достоверному увеличению активности А1-ПИ по сравнению с группой «гипероксия 14 суток», однако этот показатель был повышен более чем в 2 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой «контроль». Также уменьшилось содержание нейтрофильной эластазы в 4,5 раза ( $p < 0,05$ ) в ткани легких новорожденных морских свинок, подвергшихся воздействию длительной гипероксии.

Восстановление баланса в системе «протеазы-антипротеазы» должно предотвращать деструктивные повреждения легочной ткани. Подтверждением этому является выявленное нами увеличение содержания коллагена в гомогенате легкого более чем в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой «гипероксия 14 суток».

Противовоспалительное действие витамина А связывают с регуляцией продукции провоспалительных медиаторов и хемокинов [4]. По нашим данным ретиноиды не оказали выраженного на активность А1-ПИ, однако, в целом соотношение «эластаза/А1-ПИ» уменьшалось, при этом увеличивалось содержание коллагена в легких. Можно заключить, что при введении витамина А происходит подавление протеолитических процессов в легких. Кроме того, известно, что ретиноиды являются индукторами синтеза эластина и коллагена [5]. Этим может объясняться тот факт, что уровень коллагена у опытных животных с коррекцией ретиноидами был выше, чем у контрольных животных.

Таким образом, ингаляционное введение ретиноидов в составе липосом уменьшает интенсивность протеолитических процессов в легких новорожденных морских свинок в условиях длительной гипероксии за счет уменьшения соотношения «протеазы/антипротеазы» и увеличения уровня коллагена в легких.

## Список литературы

1. Ambalavanan, N. Vitamin A supplementation for extremely low birth weight infants: outcome at 18 to 22 months / N. Ambalavanan, J.E. Tyson, K.A. Kennedy [et al.] // *Pediatrics*. – 2005. – Vol.115, No. 3. – P. e249-e254
2. Blennow M, Bohlin K: Surfactant and noninvasive ventilation. *Neonatology* 107(4):330–336, 2015.
3. De Dooy, J.J. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates / J.J. De Dooy, L.M. Mahieu, H.P. van Bever // *Eur. J. Pediatr.* – 2001. – Vol. 160. – P. 457-463
4. James, M.L. Vitamin A and retinoid acid act synergistically to increase lung retinyl esters during normoxia and reduce hyperoxic lung injury in newborn mice / M.L. James, A.C. Ross, A. Bulger [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2010. – Vol. 67 (6). – P. 591-597
5. Pierce, R.A. Retinoids increase lung elastin expression but fail to alter morphology or angiogenesis genes in premature ventilated baboons / R.A. Pierce, B. Joyce, S. Officer [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2007. – Vol. 61 (6). – P. 703-709
6. Wardle, S.P. Randomised controlled trial of oral vitamin A supplementation in preterm infants to prevent chronic lung disease / S.P. Wardle, A. Hughes, S. Chen [et al.] // *Arch. Disease in Childhood*. – 2001. – Vol. 84 (1). – P. F9-F13

## ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ИЛ-6 В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

**Рябцева Т. В.**

*аспирант, кафедра биологической химии, УО «Белорусский  
государственный медицинский университет»,  
ta-yana@mail.ru*

**Таганович А. Д.**

*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии, УО  
«Белорусский государственный медицинский университет»,  
г.Минск, Беларусь*

*В данной статье рассмотрен вопрос использования интерлейкина-6 в качестве мишени для разработки противовоспалительной терапии. Авторами исследования обосновано использование иммобилизованных синтетических олигопептидов в качестве лигандов для снижения концентрации ИЛ-6 в плазме крови человека. В статье приведены результаты анализа трёхмерной модели молекулярно-рецепторного комплекса ИЛ-6 с gp80 и gp130. На основании данного анализа были предложены аминокислотные последовательности, соответствующие локусам взаимодействия цитокина с рецепторами. Результаты расчёта и сравнительный анализ свободной энергии связывания позволил определить наиболее перспективные олигопептиды. Авторы статьи *in vitro* подтвердили эффективность использования иммобилизованных олигопептидов для снижения концентрации ИЛ-6 в плазме крови человека.*

**Ключевые слова:** *интерлейкин-6; цитокины; цитокиновый шторм; олигопептиды.*

## THE APPLICATION OF IMMOBILIZED OLIGOPEPTIDES TO REDUCE IL-6 CONCENTRATION IN HUMAN BLOOD PLASMA

**Ryabceva T. V.**

*The post-graduate student, the Department of Biological Chemistry, the Belarusian  
State Medical University, Minsk, Belarus  
ta-yana@mail.ru*

**Tahanovich A. D.**

*The Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Biological Chemistry,  
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

*In this article discusses the use of interleukin-6 as a target for the development of anti-inflammatory therapy. The authors have substantiated the use of immobilized synthetic oligopeptides as ligands to reduce the IL-6 concentration in human plasma. The article presents the analysis of the three-dimensional model of the molecular receptor complex of IL-6 with gp80 and gp130. Based on this analysis, were proposed the amino acid sequences of oligopeptides corresponding to the loci of the IL-6 interaction with receptors. The calculation results and comparative analysis of the free binding energy made it possible to determine the most promising oligopeptides. The*

*authors of the article in vitro confirmed the effectiveness of the immobilized oligopeptides to reduce the concentration of IL-6 in human plasma.*

**Key words:** *interleukin-6; cytokines, cytokine storm; oligopeptides.*

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) считается ключевым молекулярным фактором развития цитокинового шторма. Цитокиновый шторм - как особая форма системной воспалительной реакции является распространенной проблемой современной медицины. Основой патогенеза данного состояния является чрезмерно высокие концентрации в крови провоспалительных цитокинов [1]. Гиперпродукция этих цитокинов приводит к повреждению тканей и органов собственной иммунной системой [2]. Основными клиническими проявлениями являются подъем температуры тела, снижение кровяного давления и тромбоз сосудов [3,4]. Одним из терапевтических подходов для лечения цитокинового шторма является использование экстракорпоральных методов, в частности гемосорбции [5]. Однако существующие гемосорбенты не обладают достаточной специфичностью и при их применении происходит удаление всех цитокинов, как про- так и противовоспалительных. Для повышения специфичности сорбции необходима разработка аффинных лигандов, способных к избирательному удалению цитокинов [6].

Анализ научной литературы показал, что олигопептиды могут быть использованы в качестве аффинных лигандов для гемосорбентов, так как они обладают высокой селективностью, низкой токсичностью, химическим и биологическим разнообразием [7]. С помощью методов молекулярного докинга существует возможность предварительного анализа взаимодействия большого числа пептидов с молекулой-мишенью для выбора наиболее эффективных. Для оценки возможности использования найденных пептидов для производства гемосорбентов необходим анализ их эффективности после иммобилизации на полимерном носителе, а именно на полиакриламидном геле (ПААГ). Так как именно ПААГ используется в качестве полимерного носителя в зарегистрированных к применению в Беларуси и России гемосорбентах.

**Целью** исследования являлось изучение олигопептидов методом молекулярного докинга и в экспериментах *in vitro* связываться с ИЛ-6.

#### **Материалы и методы исследования.**

Для прогнозирования структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов анализировали трехмерные модели из базы данных NCBI ProteinDataBank: 1I1R (комплекс цитокина с цитокинсвязывающей областью gp130) и 1P9M (комплекс ИЛ6/рецептор ИЛ6/gp130) в программе Chimera. Оценку свободной энергии взаимодействия олигопептидов с ИЛ-6 с помощью программного обеспечения AutodockVina [8].

Иммобилизацию олигопептидов проводили на полиакриламиде, путем введения в смесь раствора олигопептида на стадии полимеризации [9]. Для оценки эффективности иммобилизованных олигопептидов *in vitro* применяли шихтовый метод [10]. В качестве объекта исследования использовали плазму



крови, полученную после активации цельной крови здоровых доноров эндотоксином [11]. Активация клеток крови была необходима для обогащения крови провоспалительными цитокинами. Концентрация цитокинов после активации составляла для ФНО- $\alpha$  1302,68 (1228,26÷1363,81) пг/мл, для ИЛ-8 357,76 (330,01÷385,90) пг/мл, для ИЛ-6 642,41 (619,00÷701,84) пг/мл.

Определение цитокинов проводили методом иммуноферментного анализа в плазме до и после контакта с иммобилизованными олигопептидами. По изменению концентрации ИЛ-6 в плазме крови человека судили об их эффективности.

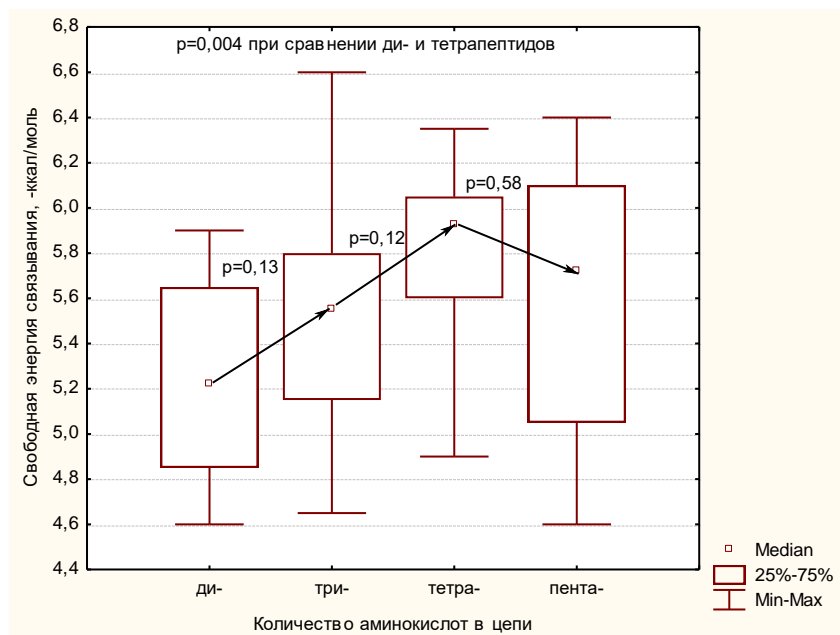
Статистическую обработку и построение графиков проводили с помощью программы Statistica 10.0. Все значения представлены в виде Me (25%;75%).

### Результаты и обсуждение.

В результате анализа трехмерной модели комплекса ИЛ-6 с рецепторами в полипептидной цепи молекулы gp80 было выделено семь участков, которые визуальным образом наиболее близко расположены к молекуле ИЛ-6: -Ser<sup>106</sup>-Pro<sup>107</sup>-Leu<sup>108</sup>-Ser<sup>109</sup>-Asn<sup>110</sup>-, -Phe<sup>134</sup>-Gln<sup>135</sup>-Asn<sup>136</sup>-Ser<sup>137</sup>-Pro<sup>138</sup>-, -Val<sup>161</sup>-Pro<sup>162</sup>-Glu<sup>163</sup>-Gly<sup>164</sup>-Asp<sup>165</sup>-Ser<sup>166</sup>-Ser<sup>167</sup>-Phe<sup>168</sup>-, -Thr<sup>188</sup>-Phe<sup>189</sup>-Gln<sup>190</sup>-Gly<sup>191</sup>-Cys<sup>192</sup>-, -Ser<sup>227</sup>-Ser<sup>228</sup>-Phe<sup>229</sup>-Tyr<sup>230</sup>-Arg<sup>231</sup>-, -Lys<sup>252</sup>-Asp<sup>253</sup>-Leu<sup>254</sup>-Gln<sup>255</sup>-, -Gln<sup>276</sup>-Glu<sup>277</sup>-Glu<sup>278</sup>-Phe<sup>279</sup>-Gly<sup>280</sup>-Gln<sup>281</sup>-Gly<sup>282</sup>-Glu<sup>283</sup>-. В молекуле gp130 были выделены следующие участки: -Asn<sup>115</sup>-Glu<sup>116</sup>-Gly<sup>117</sup>-Lys<sup>118</sup>-Lys<sup>119</sup>-Met<sup>120</sup>-, -Glu<sup>141</sup>-Trp<sup>142</sup>-Ala<sup>143</sup>-Thr<sup>144</sup>-His<sup>145</sup>-Lys<sup>146</sup>-Phe<sup>147</sup>-, -Asp<sup>163</sup>-Tyr<sup>164</sup>-Ser<sup>165</sup>-Thr<sup>166</sup>-Val<sup>167</sup>-Tyr<sup>168</sup>-Phe<sup>169</sup>-Val<sup>170</sup>-Asn<sup>171</sup>-, -Phe<sup>192</sup>-Asp<sup>193</sup>-Pro<sup>194</sup>-Val<sup>195</sup>-Tyr<sup>196</sup>-Lys<sup>197</sup>-, -Lys<sup>228</sup>-Ser<sup>229</sup>-Val<sup>230</sup>-Ile<sup>231</sup>-Ile<sup>232</sup>-Leu<sup>233</sup>-, -Ala<sup>256</sup>-Ser<sup>257</sup>-Thr<sup>258</sup>-Arg<sup>259</sup>-Ser<sup>260</sup>-, -Glu<sup>282</sup>-Asp<sup>283</sup>-Gly<sup>284</sup>-Lys<sup>285</sup>-Gly<sup>286</sup>-.

Для молекулярного докинга сконструировали 13 дипептидов, из которых дипептид Phe-Val обладал максимальной по модулю энергией связывания, которая составила |5,70 (5,60;5,95)| ккал/моль. Из 17 трипептидов наиболее прочное взаимодействие с ИЛ-6 было у Tyr-Phe-Val с энергией связывания |6,60 (6,40;6,80)| ккал/моль. Из 15 тетрапептидов наибольшей по модулю энергией связывания с ИЛ-6 обладал Ser-Phe-Tyr-Arg |6,35 (6,14;6,47)| ккал/моль и Trp-Ala-Thr-His |6,35 (6,02;6,67)| ккал/моль. Изучение 15 пентапептидов показало, что связывания с ИЛ-6 пентапептида Val-Tyr-Phe-Val-Asn будет максимально прочным, так как модуль энергии связывания равен |6,40 (6,30;5,45)| ккал/моль.

Анализ закономерности изменения свободной энергии связывания с ИЛ-6 олигопептидов в зависимости от количества аминокислот показал статистически значимое увеличение энергии связывания при увеличении количества аминокислот с двух до четырех (рис 1). Статистической значимости разницы между медианой свободной энергии связывания пентапептидов и медианой свободной энергии связывания тетрапептидов не было, поэтому для дальнейшего изучения отбирали олигопептиды среди три и тетрапептидов.



**Рисунок 1.** – Энергия связывания олигопептидов с ИЛ-6 в зависимости от количества аминокислот в цепи

Сравнительный анализ свободной энергии связывания с ИЛ-6 олигопептидов-аналогов gp80 и олигопептидов-аналогов gp130 не выявил статистически значимых различий (табл. 1). Поэтому данный критерий не использовали при выборе перспективных пептидов.

**Таблица 1.** – Свободная энергия связывания пептидов-аналогов gp80 и пептидов-аналогов gp130 с ИЛ-6

Олигопептиды	Аналоги gp80	Аналоги gp130	p
Ди-	5,15 (4,80;5,45)	5,32 (4,85;5,77)	0,61
Три-	5,60 (5,30;5,97)	5,30 (5,00;5,90)	0,56
Тетра-	5,80 (5,40;5,95)	6,02 (5,60;6,25)	0,15
Пента-	5,72 (5,52;5,95)	5,62 (5,00;6,20)	0,75

В экспериментах *in vitro* участвовали олигопептиды Tyr-Phe-Val и Ser-Phe-Tyr-Arg. После контакта плазмы крови с данными пептидами, иммобилизованными на полиакриламидном геле, наблюдали снижение концентрации ИЛ-6 (табл.2).



**Таблица 2.** – Изменение концентрации ИЛ-8 после контакта с иммобилизованными специфическими синтетическими олигопептидами

Образец	Концентрация ИЛ-6, пг/мл	Эффективность сорбции ИЛ-6, пг на 1 мл геля
Исходная плазма	556,82 (508,30-570,16)	-
ПААГ- YFV	475,38 (416,89-491,80)	78,73 (68,95-108,10)*
ПААГ- SFYR	419,60 (402,06-457,20)*	100,23 (81,18-153,62)*
ПААГ	536,87 (449,99-545,06)	29,23 (23,89-46,20)

Примечание: ПААГ-полиакриламидный гель, \* - статистически значимая разница при сравнении с ПААГ без лиганда ( $p < 0,05$ ); \*\* - статистически значимая разница при сравнении ПААГ-YFV и ПААГ-SFYR ( $p < 0,05$ ), тест Мана-Уитни

Эффективность сорбции цитокина тетрапептидом Ser-Phe-Tyr-Arg и трипептидом Tyr-Phe-Val одинаковая, с тенденцией к увеличению при увеличении количества аминокислотных остатков в олигопептиде.

Результаты данного исследования свидетельствовали о том, что молекулярный докинг может быть использован в качестве предварительного этапа поиска специфических олигопептидов для связывания молекул-мишеней. Было показано, что иммобилизованные олигопептиды, являющиеся структурными короткоцепочечными аналогами цитокинсвязывающей области рецепторов провоспалительных цитокинов, могут быть использованы для снижения их концентрации в плазме крови.

Это может рассматриваться как перспективное направление в разработке отечественных изделий медицинского назначения для экстракорпорального удаления цитокинов из плазмы крови. Необходимы дополнительные исследования для определения эффективной концентрации олигопептида и безопасного объема гемосорбционной колонки.

### Литература

1. Chen, L. Confronting the controversy: Interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome / Chen LYC, Hoiland RL, Stukas S, et al. // Eur Respir J. – 2020. - in press. - <https://doi.org/10.1183/13993003.03006-2020>
2. Tisoncik, J.R. Into the eye the cytokine storm / J.R. Tisoncik, M.J.Korth, C.P.Simmons etc. // Microbiology and molecular biology reviews. – 2012. – V.16. – N.1. – p.16-32
3. Fajgenbaum, D.C. Cytokine storm / D.C.Fajgenbaum, C.J.June // N Engl J Med. – 2020. – V.23. – N383. – p.2255-2273

4. Потапнев, М.П. Цитокиновый шторм: причины и последствия / М.П. Потапнев // Иммунология. – 2021. – Т.42. - №2. – с.175-188
5. Nakada, T. Blood purification for hypercytokinemia / T.Nakada, H.Hirasawa, S.Oda etc. // Transfusion and apheresis science. – 2006. – V.35. – p.253-264
6. Harm,S. Cytokine removal in extracorporeal blood purification: an in vitro study / S.Harm, C.Schildbock, J.Hartmann // Blood Purif., 2019. – doi:10.1159/000502680
7. Acquah,C. Aptamers: an emerging class of bioaffinity ligands in bioactive peptide applications / C.Acquah, D.Agyei, E.M.Obeng etc. // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2019. - doi: 10.1080/10408398.2018.1564234
8. Sotriffer C.A., Flader W., Winger R.H. et al. Automated docking of ligands to antibodies: method and applications / Methods, 2000, V.20, p.280-291
9. Грибовская О.В., Шутова И.В., Цыганова О.В., Мартинович В.П., Голубович В.П. Новые биоаффинные сорбенты для избирательной элиминации аутоантител к тиреопероксидазе человека при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы // Биомедицинская химия. – 2012. - том.58. - вып.2. - с.211-219
10. Oda, S. Cytokine adsorptive property of various adsorbents in immunoadsorption columns and a newly developed adsorbent: an in vitro study / S.Oda, H.Hirasawa, H.Shiga etc. // Blood purification. - 2004. – V.22. – p.530-536.
11. Wang, J.E. Cytokine modulation in experimental endotoxemia: characterization of an ex vivo whole blood model / J.E. Wang, R.Solberg, C.Okkenhaug etc. // Eur Surg Res. – 2000. – V.32. – p.65-73

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО  
БАЛАНСА В КРОВИ И ТКАНЯХ КРЫС С ЛИМФОСАРКОМОЙ НК/ЛҮ  
ПРИ ДЕЙСТВИИ ДОКСОРУБИЦИНА, ПАНТЕНОЛА И ЦИСТЕАМИНА**

**Семенович Д.С.,**

*к. б. н., старший научный сотрудник  
государственного предприятия “Институт биохимии биологически  
активных соединений НАН Беларуси”, г. Гродно, Беларусь;  
semen@ibiochemistry.by*

**Лукиенко Е.П.,**

*к. м. н., старший научный сотрудник  
государственного предприятия “Институт биохимии биологически  
активных соединений НАН Беларуси”, г. Гродно, Беларусь;  
Lukgrodn@mail.ru*

**Канунникова Н.П.,**

*д. м. н., профессор, профессор кафедры технологии, физиологии и  
гигиены питания учреждения образования «Гродненский государственный  
университет имени Я.Купалы», г. Гродно, Беларусь;  
n.kanunnikova@grsu.by*

**Мойсеенок А.Г.,**

*д. м. н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси,  
главный научный сотрудник государственного предприятия “Институт  
биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси”, г. Гродно,  
Беларусь;  
andrey.moiseenok@tut.by*

*Изучены изменения показателей окислительно-восстановительного  
баланса в плазме крови и печени, ткани опухоли крыс-опухоленосителей  
лимфосаркомы Плисса при действии доксорубицина, D-пантенола и  
цистеамина. Установлено, что в плазме крови при действии данных  
препаратов увеличивается содержание продуктов свободнорадикального  
окисления, повышается восстанавливающая способность системы глутатиона  
в печени, тогда как в ткани лимфосаркомы изменения редокс-баланса носят  
противоположный характер.*

**Ключевые слова:** лимфосаркома; редокс-баланс; доксорубицин; пантенол;  
цистеамин

**INDICATORS OF REDUCING BALANCE IN BLOOD AND TISSUE OF  
RATS WITH LYMPHOSARCOMA NK / Ly AT THE ACTION OF  
DOXORUBICIN, PANTENOL AND CYSTEAMINE**

**Semenovich D.S.,**

*Candidate of Biology, Senior Researcher,  
State Institution “Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances,  
National Academy of Sciences”, Grodno, Belarus;*

*semen@ibiochemistry.by*

**Lukiyenko E.P.,**

*Candidate of Medicine, Senior Researcher,  
State Institution "Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances,  
National Academy of Sciences", Grodno, Belarus;*

*Lukgrodno@mail.ru*

**Kanunnikova N.P.,**

*Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of  
Technology, Physiology and Hygiene of Nutrition of the Educational Institution  
«Yanka Kupala"s Grodno State University», Grodno, Belarus;*

*n.kanunnikova@grsu.by*

**Moiseenok A.G.,**

*Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of National  
Academy of Sciences,*

*Chief Researcher, State Institution "Institute of Biochemistry of Biologically  
Active Substances, National Academy of Sciences", Grodno, Belarus;*

*andrey.moiseenok@tut.by*

*Changes in the indicators of redox balance in blood plasma and liver, tumor tissue of rats-tumor-bearing Pliss lymphosarcoma were studied under the action of doxorubicin, D-panthenol and cysteamine. It was found that in the blood plasma under the action of these compounds, the content of free radical oxidation products increases, the reducing ability of the glutathione system in the liver increases, while in the tissue of lymphosarcoma, changes in the redox balance are of the opposite nature.*

**Key words:** *lymphosarcoma; redox balance; doxorubicin; panthenol; cysteamine*

Одним из перспективных направлений в разработке способов повышения эффективности и снижения токсичности противоопухолевой терапии является избирательная регуляция окислительно-восстановительного баланса в ткани опухоли и в окружающих тканях организма [1, 2, 3]. Доклинические испытания агентов, генерирующих активные формы кислорода (АФК), показали их селективную токсичность на опухолевые клетки за счет повышения уровня АФК, благодаря чему окислительный стресс достигает так называемого «порога токсичности», а антиоксидантная система защиты злокачественной клетки существенно снижает свою активность [3, 4]. Чтобы защитить нормальные клетки организма от побочных эффектов химиотерапевтических препаратов, могут использоваться модуляторы клеточной системы кофермента А, которые играют важную роль в регуляции редокс-баланса, в частности редокс-баланса системы глутатиона в клетках млекопитающих [5, 6].

Исследованы показатели окислительного стресса в плазме крови, а также изучен редокс-статус глутатиона в печени животных-опухоленосителей при воздействии химиотерапии (доксорубицина) в сочетании с производными пантетина (D-пантенолом и цистеамином). Для модуляции редокс-баланса

использовали предшественник КоА D-пантенол (ПЛ), который обладает редокс-модулирующей активностью [7]. В комбинации с ПЛ животным-опухоленосителям вводили цистеамин (ЦSH) – аминотиол, обладающий антиоксидантным действием [8].

В эксперименте были использованы крысы-самцы линии Вистар массой 150–200 г, содержащиеся на стандартном рационе вивария. Животным подкожно в паховую область вводили 0,5 мл суспензии клеток лимфосаркомы Плисса (ЛСП), приготовленной на растворе Хенкса. Через 7 дней крысам-опухоленосителям вводили доксорубин гидрохлорид (Dox, 5 мг/кг, однократно, в/бр), после чего в течение 5 дней после инъекции доксорубина вводили композицию ПЛ (200 мг/кг, в/бр) с ЦSH (100 мг/кг, в/бр).

В плазме крови были изучены показатели окислительного стресса: содержание соединений, реагирующих с N, N-диметил-*n*-фенилендиамином (ДФАРС), которые характеризуют интенсивность образования свободнорадикальных продуктов, общая антиоксидантная активность (ОАА), а также содержание белковых SH-групп. В ткани печени исследовали содержание восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона как основного фактора поддержания редокс-баланса в клетках [5]. В ткани лимфосаркомы определяли уровень небелковых тиолов и дисульфидов, основным компонентом которых являются GSH и GSSG. В печени и опухоли измеряли также содержание S-глутатионилированных белков, образование которых инициируется при окислительном стрессе [9].

Наши исследования показали, что введение доксорубина сопровождалось повышением содержания ДФАРС на 40 % ( $p < 0,05$ ) в плазме крови по сравнению с таковым показателем у животных с лимфосаркомой, что может быть показателем активации свободнорадикальных процессов в организме на фоне химиотерапии (таблица 1). Антиоксидантная активность плазмы и содержание в ней белковых тиолов при этом достоверно не изменились. Дополнительное введение ПЛ+ЦSH на фоне доксорубина привело к превышению уровня ДФАРС не только выше значений в плазме животного-опухоленосителя, но и на 14 % выше значений на фоне действия доксорубина. Одновременно отмечалось повышение ОАА на 30 % ( $p < 0,05$ ) и снижение содержания белковых тиолов на 12 % ( $p < 0,05$ ), что может быть следствием разнонаправленных изменений окислительных и восстановительных реакций в организме, что привело как к усилению процессов образования свободных радикалов и снижению уровня белковых тиолов, так и к повышению активности антиоксидантных систем организма.

**Таблица 1.** – Изменение показателей окислительного стресса в плазме крови крыс с лимфосаркомой при действии доксорубина в сочетании с D-пантенолом и цистеамином,  $M \pm SD$

Группы	Белковые SH-группы, мкмоль/г белка	ДФАРС, Ед/мл	ОАА, ммоль/л
--------	---------------------------------------	-----------------	--------------

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,**  
Минск, 26-27 января 2022 г.

ЛСП	3,52±0,29	430,90±60,75	1,06±0,19
ЛСП+Dox	3,19±0,26	603,75±72,70*	1,26±0,21
ЛСП+Dox+ПЛ+ЦSH	3,09±0,12*	691,17±53,33*#	1,38±0,18*

Примечание – \* –  $p < 0,05$  по отношению к ЛСП, # –  $p < 0,05$  по отношению к ЛСП+Dox

Исследование показателей системы глутатиона в печени крыс-опухоленосителей лимфосаркомы показало, что уровень GSH и особенно соотношение GSH/GSSG при действии доксорубина были выше, чем у крыс с лимфосаркомой, тогда как содержание GSSG не отличалось от значений в первой группе (таблица 2). Добавление ПЛ и ЦSH к действию доксорубина сопровождалось практически 5-кратным повышением и уровня GSH, и соотношения GSH/GSSG в печени по сравнению с таковыми показателями у животных-опухоленосителей.

**Таблица 2.** – Содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) и их соотношение в печени крыс с лимфосаркомой при действии доксорубина в сочетании с D-пантенолом и цистеамином, M±SD

Группы	GSH, нмоль/мг белка	GSSG, нмоль/мг белка	GSH/GSSG
ЛСП	4,82±2,18	0,85±0,17	5,60±1,93
ЛСП+Dox	14,41±6,80	0,85±0,16	16,83±6,65*
ЛСП+Dox+ПЛ+ЦSH	22,35±9,34*	0,83±0,26	29,21±8,06* #

Примечание – \* –  $p < 0,05$  по отношению к ЛСП, # –  $p < 0,05$  по отношению к ЛСП+Dox

Изучение содержания небелковых тиолов и дисульфидов в ткани лимфосаркомы крыс показало, что, в противоположность эффектам на систему глутатиона в печени, в ткани опухоли снижаются и уровень тиолов (на 27 - 20 %,  $p < 0,05$ ) и соотношение тиолов к дисульфидам (на 21 %,  $p < 0,05$ ) после введения как доксорубина, так и его комбинации с пантенолом и цистеамином (таблица 3).

**Таблица 3.** – Содержание небелковых тиолов и дисульфидов в ткани лимфосаркомы крыс-опухоленосителей при действии доксорубина в сочетании с D-пантенолом и цистеамином, нмоль/мг белка, M±SD

Группы	Небелковые тиолы	Небелковые дисульфиды	SH/SS
ЛСП	4,00±0,37	2,11±0,32	1,98±0,19
ЛСП+Dox	2,94±0,34*	1,90±0,27	1,56±0,13*
ЛСП+Dox+ПЛ+ЦSH	3,21±0,32*	2,09±0,26	1,67±0,27

Примечание – \* –  $p < 0,05$  по отношению к ЛСП, # –  $p < 0,05$  по отношению к ЛСП+Dox



Доксорубицин и особенно его комбинация с пантенолом и цистеамином в по-разному влияют на содержание S-глутатионилированных белков в ткани печени и ткани опухоли: в печени их уровень снижается (на 20 %,  $p < 0,05$ ), тогда как в ткани опухоли он увеличивается на 67 % ( $p < 0,05$ ) (таблица 4).

**Таблица 4.** – Содержание S-глутатионилированных белков в ткани печени и лимфосаркомы печени крыс-опухоленосителей при действии доксорубицина в сочетании с D-пантенолом и цистеамином, нмоль/мг белка,  $M \pm SD$

Группы	Печень	Лимфосаркома
ЛСП	21,59±2,82	50,65±5,91
ЛСП+Dox	19,20±3,38	67,55±10,10*
ЛСП+Dox+П Л+ЦSH	17,18±2,09*	84,38±8,58*

Примечание – \* –  $p < 0,05$  по отношению к ЛСП, # –  $p < 0,05$  по отношению к ЛСП+Dox

В совокупности с данными об изменениях уровня небелковых тиолов и дисульфидов в ткани опухоли и изменениях системы глутатиона в печени, результаты изменений содержания S-глутатионилированных белков свидетельствуют о разнонаправленных эффектах химиотерапевтических препаратов и модуляторов редокс-баланса на активность системы глутатиона как основной системы поддержания редокс-баланса и его влиянии на посттрансляционную модификацию белков в ткани опухоли и в тканях организма-опухоленосителя.

Таким образом, нами установлено, что в плазме крови животных-опухоленосителей на фоне химиотерапии и ее сочетанном воздействии с D-пантенолом и цистеамином увеличивается содержание продуктов свободнорадикального окисления, повышается восстанавливающая способность системы глутатиона и снижается глутатионилирование белков в печени. В то же время в ткани лимфосаркомы доксорубицин в совокупности с пантенолом и цистеамином способствуют сдвигу баланса небелковых тиолов и дисульфидов в окисленную сторону и повышают посттрансляционную окислительную модификацию белков, что, очевидно, может усиливать повреждения, обусловленные окислительным стрессом. Данные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на поиск новых редокс-активных соединений и их комбинации с химиотерапевтическими препаратами для лечения и метаболической коррекции онкологических заболеваний.

## Список литературы

1. Trachootham, D. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? / D.Trachootham, J.Alexandre, P.Huang // Nat. Rev. Drug Discov. – 2009. – Vol. 8, № 7. – P. 579–591.
2. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy / Н. Yang [et al.] // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2018. – Vol. 37. – P. 266.
3. Flohé, L. Changing paradigms in thiology from antioxidant defense toward redox regulation / L. Flohé // Methods Enzymol. – 2010. – Vol. 473. – P. 1–39.
4. Особенности редокс-регуляции в опухолевых клетках / Н.К. Зенков, П.М. Кожин [и др.] // Сибирский онколог. журнал. – 2019. – Т. 39, № 2. – С. 11–26.
5. Singh, S. Role of glutathione in cancer pathophysiology and therapeutic interventions / S.Singh, A.R.Khan, A.K.Gupta // J. Exp. Therap. Oncol. – 2012. – Vol. 9, № 4. – P. 303–316.
6. Coenzyme A: back in action / R. Leonardi, Y.M. Zhang, C.O. Rock et al. // Prog. Lipid Res. – 2005. – Vol. 44, № 2–3. – P.125–153.
7. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: *in vitro* and *in vivo* study / R. Panchuk \_ [et al.] // Croat. Med. J. – 2014. – Vol. 55, № 3. – P. 206–217.
8. Wood, P.L. Cellular thiol pools are responsible for sequestration of cytotoxic reactive aldehydes: central role of free cysteine and cysteamine / P.L.Wood, M.A.Khan, J.R.Moskal // Brain Res. – 2007. – Vol. 1158. – P.158–163.
9. Townsend, D.M. S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response / D.M.Townsend // Mol. Interv. – 2007. – Vol. 7, № 6. – P. 313–324.



**EFFECT OF UV IRRADIATION ON FLUORESCENCE AND  
ANTIOXIDANT PROPERTIES OF  $\Gamma$ -GLOBULINS**

**Sozarukova M. M.**

*Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory for the  
advanced materials synthesis and minerals processing  
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia  
s\_madinam@bk.ru;*

**Chilikina P. A.**

*4th year student of the Faculty of Power Engineering  
Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia  
p.chilikina@gmail.com;*

**Skachko N. A.**

*6th year student of the Faculty of Power Engineering  
Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia  
nadyans96@mail.ru;*

**Novikov D. O.**

*Associate professor, High tech plasma and power plants  
Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia  
zerooo@list.ru;*

**Proskurnina E. V.**

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of  
Molecular Biology  
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia  
proskurnina@gmail.com;*

*Ultraviolet blood irradiation is an alternative approach for the treatment of infectious diseases of various etiologies and is a new immunomodulatory method. To date, there are no data in the literature on the precise mechanisms of the effects of UV radiation on various blood components, including proteins. The aim of the present work was to analyze the fluorescent properties of  $\gamma$ -globulins after UVI exposure (254 nm) with simultaneous registration of their antioxidant profile by chemiluminescent method in a model with alkylperoxyl radicals. We obtained that exposure of  $\gamma$ -globulins to UV leads to a dose-dependent decrease in fluorescence and a more complex kinetic curve of chemiluminescence due to the formation of products with stronger antioxidant properties.*

**Key words:** *mercury lamp UV; Ultraviolet blood irradiation; blood plasma;  $\gamma$ -globulins; antioxidants; fluorescence, chemiluminescence*

Due to the emergence of new infections, including SARS-CoV-2, and their resistance to existing drugs, there is currently an increased interest in the therapeutic potential of ultraviolet blood irradiation (UVBI). The efficiency of UVBI in the therapy of a number of diseases, bacterial and viral etiology, has long been demonstrated.

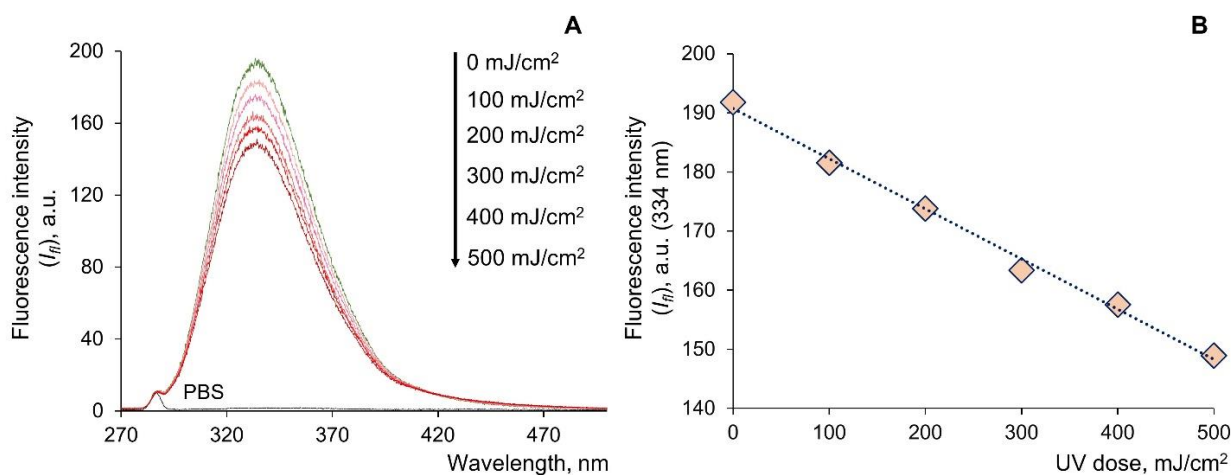
To understand the mechanisms of phototherapy, it is necessary to study the effect of UV irradiation (UVI) on various targets in the blood, including the plasma proteins. Globulins are an important component of blood plasma involved in providing humoral

immune protection. Earlier studies showed the effect of UVI on protein metabolism, namely on the levels of immunoglobulin (Ig) in the serum before and after exposure to UVI [1], as well as their tendency to aggregation and immune reactivity [2]. Thus, the aim of the present work was to analyze the fluorescent properties of  $\gamma$ -globulins after UVI exposure (254 nm) with simultaneous registration of their antioxidant profile by chemiluminescent method in a model with alkylperoxyl radicals.

**Materials and Methods. UV Irradiation of samples (mercury lamp UV).** Concentrated solutions (optical density not more than 0.2) of  $\gamma$ -globulins were irradiated in a quartz cuvette (volume 3.000 ml) using a Bio-Link UV irradiation system (Vilber Lourmat) at 254 nm (UV source 5  $\times$ 8-watt lamps).

**Antioxidant capacity assay based on luminol enhanced chemiluminometry.** The antioxidant activity of substances was quantified with the enhanced chemiluminescence protocol. The chemiluminescent system consisted of a source of free radicals 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP, Sigma) and a chemiluminescent probe luminol (Sigma). The method was described elsewhere [3]. A luminol solution of 1 mmol/L (Sigma) and ABAP solution of 50 mmol/L (Sigma) was prepared by dissolving the weighed samples in phosphate buffer solution (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, Sigma). The total volume in a cuvette was 1.000 mL. A mixture of ABAP and luminol (final concentrations were 2.5 mM and 2  $\mu\text{M}$ , respectively) was added to a buffer solution (pH 7.4) at 37°C. The chemiluminescence was recorded until a stationary level had been achieved, then an aliquot of the sample was added. The registration was performed until the new steady-state level was achieved.

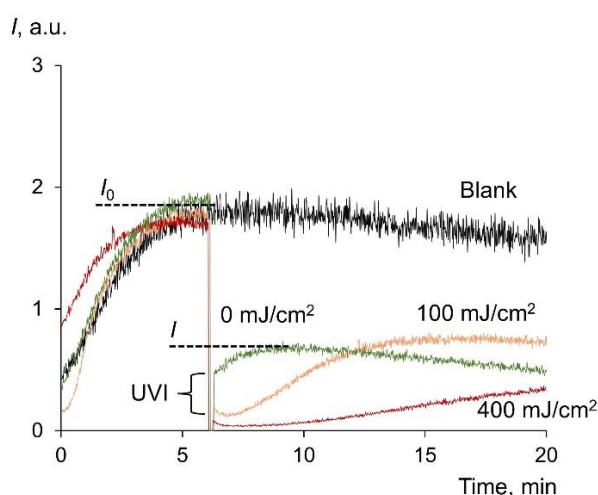
**Results and discussion.** Globulins are present in blood plasma in amounts comparable to those of human serum albumin (HSA, 30–60 g/L). Similar to albumin, the structure of globulins includes the natural fluorophore tryptophan, which makes it possible to study its phototransformation by spectrofluorimetry. Here, we have examined irradiation of  $\gamma$ -globulins fraction by different doses of UV (mercury lamp) with registration of fluorescence spectra (Fig. 1A, B):



**Figure 1.** A — Fluorescence spectra ( $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ ) of  $\gamma$ -globulins solutions ( $c = 0.66 \mu\text{M}$ ) after exposure to UV (254 nm), B — change in fluorescence intensity ( $I_f$ ) versus UV dose for  $\gamma$ -globulins solution ( $c = 0.66 \mu\text{M}$ ) at wavelength of 334 nm.

A dose-dependent decrease in the fluorescence intensity of the  $\gamma$ -globulins solution was obtained with increasing UV irradiation dose. It should be noted that, according to our data obtained earlier that at comparable concentrations of  $\gamma$ -globulins and HSA, the tryptophan fluorescence of albumin appears to be more sensitive to UV exposure. Half quenching of fluorescence for globulins occurs at a dose of 1116  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , while for albumin this value is 450  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  [4]. In a similar study, UVA exposure to  $\gamma$ -globulins and bovine serum albumin in an *in vitro* model caused the oxidation of sulfhydryl groups [5]. According to the literature approximately 10%–30%, of protein bound homocysteine (Hcy), cysteine (Cys) and cysteinylglycine (CysGly) are disulfide-linked to globulins [6]. However, from the different rates of exchange of disulfide-linked amino acids the pools of Hcy, Cys, and CysGly bound to albumin and globulin may represent kinetically and functionally distinct pools [6].

Changes in the antioxidant potential were also evaluated. The chemiluminograms (Fig. 2) are fully different from the three-phase chemiluminograms of albumin [4].



**Figure. 2.** Chemiluminograms of  $\gamma$ -globulins solutions ( $c = 0.66 \mu\text{M}$ ) in the analytical system PBS (100 mM, pH 7.4) + ABAP (2.5  $\mu\text{M}$ ) + luminol (2.0  $\mu\text{M}$ ).

For globulins, the signal ( $I_0$ ) decreases to a new stationary level ( $I$ ). This behavior is characteristic of weak antioxidants. After irradiation of globulins, however, there is a marked depression of chemiluminescence, up to almost zero values, with a slow return to the initial level, indicating the formation of products with stronger antioxidant properties as a result of UV-irradiation of globulins.

**Conclusions.** The study of the effect of UVI on plasma proteins is an important task for using the potential of UVBI as a new immunomodulatory method. A dose-dependent decrease in the fluorescence intensity of  $\gamma$ -globulins with increasing UV irradiation dose was obtained. The antioxidant profiles of UV-oxidized  $\gamma$ -globulins in the system with alkylperoxyl radicals were recorded. It was shown that native  $\gamma$ -globulins are characterized by their kinetics as prolonged-acting antioxidants. A more complex kinetics was observed after UV exposure. New phases on the kinetic curve indicate the formation of products with stronger antioxidant properties as a result of UV exposure of the  $\gamma$ -globulins.

## References

1. Livden, J. K. Effect of UV radiation on interferon, immunoglobulins and complement components in serum from healthy individuals / J. K. Livden, J. R. Bjerke, M. Degre, R. Matre // *Photodermatol.* — 1987. — V. 4. — №. 6. — P. 296–301.
2. Wickens, D. G. Fluorescence changes in human gamma-globulin induced by free-radical activity / D. G. Wickens, A. G. Norden, J. Lunec, T. L. Dormandy // *BBA. Protein Structure and Molecular Enzymology.* — 1983. — V. 742. — №. 3. — P. 607–616.
3. Alekseev, A. V. Determination of Antioxidants by Sensitized Chemiluminescence Using 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) / A. V. Alekseev, E. V. Proskurnina, Y. A. Vladimirov // *Mosc. Univ. Chem. Bull.* — 2012. — V. 67. — P. 127–132.
4. Sozarukova, M. M. Serum albumin as a source of and a target for free radicals in pathology / M. M. Sozarukova, E. V. Proskurnina, Y. A. Vladimirov // *Bull. Russ. State Med. Univ.* — 2016. — №. 1. — P. 56–61.
5. Vile, G. F. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen / G. F. Vile, R. M. Tyrrell // *Free Radic. Biol. Med.* — 1995. — V. 18. — №. 4. — P. 721–730.
6. Hortin, G. L. Bound homocysteine, cysteine, and cysteinylglycine distribution between albumin and globulins / G. L. Hortin, N. Seam, G. T. Hoehn // *Clin. Chem.* — 2006. — V. 52. — №. 12. — P. 2258–2264.

**НIF-1A, РЕЦЕПТОР CD44V6, ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА –  
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА  
ЛЕГКОГО**

**Таганович А.Д.,**

*д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Мурашко Д. И.,**

*ассистент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»,*

**Ковганко Н. Н.,**

*к.х.н., доцент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»*

**Можяева А. А.,**

*студентка 2-го курса  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

**Прохорова В. И.**

*д. м. н., профессор, заведующая  
диагностической лабораторией с группой лучевой диагностики  
государственного учреждения «Республиканский научно-  
практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь,*

*Vprohorova@mail.ru;*

**Державец Л. А.**

*д. б. н., заведующая клинично-  
диагностической лабораторией, государственного учреждения  
«Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской  
радиологии им. Н.Н. Александрова г. Минск, Беларусь,*

*l-dzerzhavets@mail.ru;*

**Готько О.В.**

*научный сотрудник диагностической лаборатории с группой  
лучевой диагностики,  
babuka\_05@mail.ru.*

*Рак легкого – это злокачественное поражение легочной ткани, характеризующееся высокой степенью инвазивности и быстрым метастазированием. На сегодняшний день ему принадлежит второе место в структуре онкологической заболеваемости. Вместе с тем, он устойчиво занимает лидирующую позицию в структуре смертности вследствие злокачественных новообразований. Большую часть в структуре заболеваемости раком легкого занимает немелкоклеточный рак (НМКРЛ). Поздняя диагностика существенно ухудшает прогноз течения этого заболевания, в связи с чем существует*

*потребность в изыскании информативных биомаркеров в доступном биоматериале пациентов.*

**Ключевые слова:** *немелкоклеточный рак легкого; кровь; гиалуроновая кислота; HIF-1 $\alpha$ ; CD44v6*

**HIF-1 $\alpha$ , CD44v6 AND HYALURONIC ACID ARE POTENTIAL BIOMARKERS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

**Tahanovich A. D.,**

*doctor of medical sciences, professor,  
head of the department biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Murashka D. I.,**

*assistant of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,  
dashamurashka@mail.ru*

**Kauhanka M. M.,**

*associate professor of the department of biological chemistry,  
Belarusian State Medical University,*

**Mozhaeva A. A.**

*, 2<sup>nd</sup> year student,  
Belarusian State Medical University,*

**Prokhorova V. I.,**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the diagnostic  
laboratory with the radiation diagnostics group of the state institution  
"Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical  
Radiology named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,  
Vprohorova@mail.ru;*

**Derzhavets L. A.,**

*Doctor of Biological Sciences, Head of the clinical and diagnostic  
laboratory, state institution "Republican Scientific and Practical  
Center of Oncology and Medical Radiology named after  
N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus.*

**Gotko O.V.**

*researcher of the diagnostic laboratory with the radiation  
diagnostics group,  
state institution "Republican Scientific  
and Practical Center of Oncology and Medical Radiology  
named after N.N. Alexandrov, Minsk, Belarus,  
babuka\_05@mail.ru;*

*Minsk, Belarus*

*Lung cancer is a malignant lesion of lung tissue which is very invasive and metastatic. It takes the second place in the structure of oncological morbidity. Moreover, it takes the first place in the structure of mortality due malignant neoplasms. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most widespread histological*

*type of lung cancer. Late diagnosis worsens the prognosis of this disease. That's why there is a need to find informative biomarkers to diagnose this disease.*

**Key words:** *non-small cell lung cancer; HIF-1 $\alpha$ ; CD44v6; hyaluronic acid*

Немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) занимает второе место в структуре смертности вследствие онкологических заболеваний в Республике Беларусь [1]. Он подразделяется на два основных гистологических подтипа: аденокарциному (АК) и плоскоклеточный рак (ПКРЛ). Поздняя диагностика существенно ухудшает прогноз течения этого заболевания, в связи с чем существует потребность в поиске информативных биомаркеров, позволяющих судить о распространенности опухолевого процесса уже на ранних стадиях НМКРЛ.

Интенсивная пролиферация злокачественных клеток сопровождается гипоксией в опухолевой ткани. В этих условиях активируется синтез транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$ , который регулирует транскрипцию генов, ответственных за жизнеобеспечение опухоли при недостатке кислорода [2]. Одним из эффектов, опосредуемых HIF-1 $\alpha$ , является увеличение экспрессии адгезионного рецептора CD44v6 [3]. Связывание с ним его основного лиганда – гиалуроновой кислоты (ГК) – приводит к активации матриксной металлопротеиназы 9, участвующей в клеточной инвазии [4].

В литературе имеются данные об увеличенном уровне HIF-1 $\alpha$ , гиалуроновой кислоты и CD44v6 в клетках НМКРЛ и его ассоциация с неблагоприятным прогнозом заболевания [5]. Однако данные об определении этих показателей в сыворотке крови немногочисленны.

**Цель.** Изучение уровня CD44v6, HIF-1 $\alpha$  и ГК в периферической крови пациентов с АК и ПКРЛ, установление его взаимосвязи с дескрипторами опухоли и определение эффективности использования этих показателей в диагностике НМКРЛ.

**Материалы и методы.** Обследовано 109 пациентов с ПКРЛ и 94 пациента с АК при первом поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период 2019-2021 гг. В качестве групп контроля обследовано 40 здоровых человек, а также 13 пациентов с доброкачественной опухолью легкого – гамартомой.

Кровь из локтевой вены испытуемых собирали натошак в вакутайнер с ЭДТА-К2 (Improvacuter, КНР). Для получения сыворотки кровь собирали в пробирку с тромбином и разделительным гелем (Improvacuter, КНР).

Измерение концентрации ГК и HIF-1 $\alpha$  в сыворотке крови проводилось с помощью ИФА-наборов Fine Test (КНР). Определение рецептора CD44v6 в клетках крови осуществляли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни для оценки различий между двумя независимыми группами. О взаимосвязи между показателями и характеристиками опухоли судили на основании расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Критическое значение уровня значимости принимали равным 5%.

Оценку информативности биохимических тестов проводили с помощью построения ROC–кривых, вычисления площади под ними (AUC), а также расчета диагностической чувствительности (ДЧ) и специфичности (ДС) для соответствующих пороговых значений.

**Результаты.** Уровень ГК, HIF-1 $\alpha$ , доля моноцитов, содержащих CD44v6 и плотность расположения этого рецептора в гранулоцитах и лимфоцитах крови пациентов с АК и ПКРЛ превышает таковой у здоровых людей и пациентов с гамартомой. Концентрация ГК в сыворотке крови выше у пациентов с большим размером опухоли, метастазами в регионарные лимфоузлы и внутренние органы вне зависимости от гистологического типа НМКРЛ. Плотность расположения CD44v6 в лимфоцитах выше у пациентов с большим (>5см) размером опухоли и метастазами во внутренние органы (M1) при обоих гистологических типах заболевания, а аналогичный показатель в гранулоцитах существенно возрастает при наличии регионарных метастазов НМКРЛ (N1-3). Концентрация ГК имеет коррелятивную связь со стадиями АК и ПКРЛ.

Измерение концентрации ГК в сыворотке крови пациентов позволяет диагностировать ранние стадии НМКРЛ с чувствительностью 81,2% и специфичностью 89,7%, дифференцировать I и II стадии НМКРЛ (чувствительность - 72,2%, специфичность - 99,2%) а при выявлении III-IV стадий чувствительность составила 67,6%, специфичность – 81,2%.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности определения в сыворотке крови компонентов оси HIF-1 $\alpha$ /CD44v6/ГК в диагностике НМКРЛ. Измерение концентрации ГК в сыворотке крови пациентов позволяет с достаточной эффективностью выявить ранние и поздние стадии НМКРЛ, а также различить I и II стадии заболевания, в отличие от классических биомаркеров, используемых в настоящее время.

### Список литературы

1. Артемова Н. А. Заболеваемость раком легкого у мужчин Республики Беларусь / Н. А. Артемова // Тезисы внеочередного XII Съезда онкологов и радиологов, посвященного 25-летию 1-го съезда АДИОР. – 2021. – Т. 9, №2. – С. 437.
2. Georgina N. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy / N. Georgina [et al.] // Acta Pharm Sin B. – 2015. - Vol. 5, № 5. - P. 378 – 389.
3. Krishnamachary B. Hypoxia regulates CD44 and its variant isoforms through HIF-1 $\alpha$  in triple negative breast cancer / B. Krishnamachary // PLoS One. – 2015. – Vol. 7, № 8. - P. 44078.
4. Pirinen R. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small cell lung cancer increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma / R. Pirinen // Int J of Cancer. – 2001. – Vol. 95, №1. – P. 12 – 17.



**КУХТА ВИКТОР КЛИМЕНТЬЕВИЧ – ПЕДАГОГ, УЧЕНЫЙ,  
ЧЕЛОВЕК**

*Таганович А.Д.,*

*д.м.н., профессор кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

*Колб А.В.,*

*к.б.н., доцент кафедры биологической химии,  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,*

*Представлена научная и педагогическая биография профессора  
В.К.Кухты.*

**Ключевые слова:** биография; биохимия; Кухта В.К.

**KUKHTA VIKTOR KLIMENTYEVICH - TEACHER, SCIENTIST, MAN**

*Tahanovich A.D.,*

*doctor of medical sciences, professor of the department of biological chemistry*

*Kolb A.V.,*

*candidate of biological sciences, associate professor of the department of biological  
chemistry Belarusian State Medical University*

*The scientific and pedagogical biography of Professor V.K. Kukhta is presented.*

**Key words:** biography; biochemistry; V.K. Kukhta



Виктор Климентьевич Кухта родился в д. Порса Вилейского района Минской области в семье ремесленника. В 1954 г. окончил Вилейскую среднюю школу №1, а в 1960 г. – Минский медицинский институт. Во время учебы в институте он начал проводить исследования в знаменитом в тот период студенческом научном кружке кафедры общей химии, и в 1957 г. вышла его первая публикация совместно с руководителем кружка, доцентом В.А. Бандариным. Бандарин В.А. оказал огромное влияние на становление В.К. Кухты не только как будущего ученого и педагога, но прежде всего как личности и разносторонне образованного человека.

Он привил молодому Виктору помимо научных и педагогических навыков любовь к искусству, музыке, литературе и живописи. С 1960 по 1964 гг. Кухта В.К. работал младшим научным сотрудником биохимической лаборатории НИИ онкологии и медицинской радиологии Минздрава БССР; с 1964 по 1968 гг. исполнял обязанности заведующего клинко-биохимическим отделом этого института. Одновременно работал преподавателем биологической химии в Минском медицинском училище. В этот период публикуется ряд научных работ Виктора Климентьевича, посвященных изучению биохимических изменений при онкологических заболеваниях («Мукополисахариды при раке желудочно-кишечного тракта», 1963); предложены методы исследования для дифференциальной диагностики предраковых заболеваний и рака желудка. По

данной проблеме в 1964 г. им была защищена кандидатская диссертация «Изучение биохимических изменений в системе высокомолекулярных углеводно-белковых соединений при раке желудочно-кишечного тракта». В 1968-1969 гг. Кухта В.К. работал старшим научным сотрудником биохимической лаборатории кожно-венерологического НИИ Минздрава БССР, в 1969-1970 гг. – старшим научным сотрудником лаборатории биосинтеза ферментов в отделе микробиологии АН БССР, в 1970-1974 гг. – старшим научным сотрудником лаборатории биохимии Белорусского научно-исследовательского института экспертизы трудоспособности и организации труда инвалидов. Он разработал методы диагностики степени нарушения кровообращения у больных митральным стенозом, рекомендованные для применения в практике здравоохранения республики (методические рекомендации «О значении исследования метаболических процессов для диагностики степени нарушения кровообращения и уточнения состояния трудоспособности у больных митральным стенозом при его хирургическом лечении», 1974).



*В.К. Кухта (слева) со своим учителем В.А. Бандариным*

Результаты исследований легли в основу докторской диссертации «Некоторые метаболические механизмы компенсации кровообращения при хирургическом лечении митрального стеноза», 1974, и монографии «Механизмы компенсации при митральном стенозе», 1978.

С 1974 по 2002 гг. Виктор Климентьевич Кухта возглавлял кафедру биологической химии Минского медицинского института. Он был душой кафедры, бережным хранителем всех традиций, значимых дат и событий. Театрал и книголюб, болельщик и рыболов, дачник и автомобилист, собачник и гурман, модник и эстет – это тоже Виктор Климентьевич. В 1979 г. он был утвержден в ученом звании профессора. В этот период совместно с сотрудниками кафедры факультетской хирургии он изучал биохимические изменения при панкреатитах, представленные впоследствии в монографии «Острый панкреатит», 1981. Параллельно исследовалась активность мембраносвязанных ферментов для гигиенической оценки неблагоприятных

факторов окружающей среды, 1982. В 1986 г. им совместно с коллегами по кафедре была издана монография «Белки плазмы крови». Впоследствии после аварии на Чернобыльской АЭС и на протяжении 90-х годов изучалась роль природных антиоксидантов в защите организма при лучевых воздействиях («Состояние ферментативной системы антиоксидантной защиты животных после радиационного воздействия», 1993). Были разработаны способы повышения радиорезистентности облученного организма.

Под руководством Виктора Климентьевича на кафедре продолжали изучаться молекулярные механизмы и методы диагностики нарушения кровообращения у больных митральным стенозом, в частности, выяснялись особенности обмена липидов при пороках митрального клапана и деятельность ферментов миокарда при различных вариантах его гипертрофии, исследовались молекулярные механизмы адаптации и антиоксидантной защиты в эритроцитах при гипотермии. Были получены новые данные о существовании белка, подобного актину мышц в митохондриях немышечных клеток, определена его структура и функции.



*Профессора кафедры биохимии – В.К.Кухта, А.Д.Таганович и Т.С.Морозкина,  
2009 г*

Перу профессора В.К. Кухты принадлежит более 220 научных работ, в том числе 3 уже упоминавшиеся монографии и 2 учебника для студентов медицинских вузов: «Основы биохимии» и «Биологическая химия». Он являлся консультантом 3 докторских и научным руководителем 18 кандидатских диссертаций. Его с гордостью называли и называют "учителем" несколько поколений преподавателей и врачей. Многие из них стали профессорами и высококвалифицированными специалистами, руководителями научных подразделений.



*Как признание научных достижений профессора В.К. Кухты, в 1999 году ему было присвоено звание «Заслуженный деятель науки Республики Беларусь»*

За большой вклад в науку и подготовку медицинских кадров Виктор Климентьевич награждён Грамотой Министерства высшего образования СССР и Почётной Грамотой Министерства высшего и среднего специального образования БССР, Почётными грамотами Министерства здравоохранения Республики Беларусь, профсоюза медицинских работников Беларуси, БГМУ. Работая в университете, профессор В.К. Кухта вел большую общественную работу. Он являлся членом специализированного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций, членом экспертного совета ВАК Республики Беларусь.

Виктора Климентьевича отличала необычайная коммуникабельность и оптимизм. Благодаря этим качествам ему удалось сплотить дружный творческий коллектив единомышленников, которые приумножили и развили его творческие научные и педагогические традиции в своих научных исследованиях.



## РЕГУЛИРОВАНИЕ ДИНАМИН-ЗАВИСИМОГО ЭНДОЦИТОЗА

**Терпинская Т.И.**

*к. б. н., ведущий научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
terpinskayat@mail.ru;*

**Янченко Т.Л.**

*младший научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
tanyaya190@gmail.com;*

**Радченко А.В.**

*научный сотрудник лаборатории нанохимии НИИ физико-химических проблем, г. Минск, Беларусь  
aleksandrardchenko10@gmail.com;*

**Кохановский А.И.**

*научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
akakhanouski@gmail.com;*

**Полукошко Е.Ф.**

*научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
efpoluko@list.ru;*

**Артемьев М.В.**

*д. х. н., заведующий лабораторией нанохимии НИИ физико-химических проблем, г. Минск, Беларусь  
m\_artemyev@yahoo.com*

*Исследована регуляция динамин-зависимого поглощения наночастиц клетками. Показано, что препараты, модулирующие активность динамина, могут использоваться для регуляции интенсивности эндоцитоза. Ringo 1-23, стабилизирующий кольцевые структуры динамина и активирующий его ГТФ-азную его активность, значительно усиливает накопление наночастиц в клетках глиомы Сб.*

**Ключевые слова:** динамин; эндоцитоз; Dynasore; Ringo 1-23

## REGULATION OF DYNAMINE-DEPENDENT ENDOCYTOSIS

**Terpinskaya T.I.**

*Candidate of Biology, Leading Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
terpinskayat@mail.ru*

**Yanchanka T.L.**

*Junior Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
tanyaya190@gmail.com;*

**Radchanka A.V.**

*Researcher, Research Institute for Physical Chemical Problems, Minsk,  
Belarus*

*aleksandrardchenko10@gmail.com;*

***Kakhanouski A.I.***

*Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus*

*akakhanouski@gmail.com;*

***Palukoshka A.F.***

*Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus*

*efpoluko@list.ru;*

***Artemyev M.V.***

*Doctor of Chemistry, Head of the Laboratory of Nanochemistry, Research  
Institute for Physical Chemical Problems, Minsk, Belarus*

*m\_artemyev@yahoo.com*

*The regulation of dynamin-dependent uptake of nanoparticles by cells was investigated. It has been shown that drugs modulating the activity of dynamin can be used to regulate the intensity of endocytosis. Ringo 1-23, which stabilizes the ring structures of dynamin and activates its GTPase activity, significantly enhances the accumulation of nanoparticles in C6 glioma cells.*

***Key words:*** *dynamine; endocytosis; Dynasore; Ringo 1-23*

Эндоцитоз является одним из важнейших физиологических процессов клетки. С участием эндоцитоза происходит поглощение питательных веществ, сигнальная трансдукция, нейротрансдукция. Кроме того, процессы эндоцитоза играют весьма значимую роль в поглощении клеткой лекарственных препаратов. Одним из подходов для усиления селективности действия лекарств является разработка наноносителей для таргетной доставки. Это обуславливает актуальность изучения механизмов регуляции эндоцитоза наночастиц.

ГТФ-аза динамин принимает участие в различных путях эндоцитоза - клатрин-опосредованном поглощении, фагоцитозе и, вероятно, в кавеолин-опосредованном эндоцитозе. Наиболее изученная функция динамина в эндоцитозе связана с отщеплением от плазматической мембраны образовавшегося эндоцитозного пузырька, которое протекает с образованием вокруг впячиваний плазматической мембраны спиралеподобной структуры динамина. За счет ГТФазной активности домена внутри динамина происходит фосфорилирование тирозиновых остатков динамина, при этом расстояние между витками увеличивается, а внутренний диаметр витков сокращается, что приводит к отрыву везикулы от клеточной мембраны.

Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие об участии динамина и в более ранних этапах эндоцитоза, в частности, в регулировании формирования и созревания клатрин-покрытых ямок.

Низкомолекулярные модуляторы динамина, такие как динасор или Ringo 1-23, широко используются для изучения эндоцитоза и других аспектов

мембранной динамики в различных клеточных системах. Эти небольшие молекулы способны проникать сквозь клеточные мембраны и влиять на олигомеризацию и ГТФ-азную активность динамина.

Цель нашего исследования является изучение регулирования эндоцитоза с помощью модуляторов активности динамина - динасор и Ringo 1-23.

#### **Материалы и методы.**

*Клетки.* Использовали клетки глиомы C6 из «Белорусской коллекции культур клеток человека и животных» РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ. Клетки выращивали в питательной среде DMEM, дополненной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone) и антибиотиком (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин) (Sigma-Aldrich) при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Shellab, USA) с 5%-ным уровнем CO<sub>2</sub>.

*Наночастицы.* Полупроводниковые квантовые точки CdSe/ZnS типа ядро-оболочка с максимумом испускания от 570 до 580 нм для разных образцов были синтезированы согласно [5]. Наночастицы были инкапсулированы оболочками на основе поли(малеинового ангидрид-альт-тетрадецена) (ПМАТ) согласно [1]. Дзета потенциал инкапсулированных коллоидных наночастиц определяли с использованием *Malvern Zetasizer Nano ZS90*. Наночастицы в фосфатном буфере характеризовались слабым положительным дзета-потенциалом - +4,5 и + 5,2 мВ для наночастиц с карбоксильными и сульфонатными группами соответственно.

*Исследование механизмов эндоцитоза.* К клеткам, культивируемым в среде DMEM с 10% ЭТС, добавляли динасор или Ringo 1-23 в конечной концентрации 80 μM; SML1046 (также известный как CHIR99021, ингибитор гликоген синтазы киназы-3 (GSK-3)) в конечной концентрации 3 μM.

Клетки инкубировали 30 мин, затем вносили наночастицы в конечной концентрации 0,02 мкМ, инкубировали 24 ч при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, получали клеточные пробы и анализировали связывание наночастиц с клетками методом проточной цитометрии. Интенсивность связывания наночастиц с клетками оценивали по интенсивности флуоресценции (ИФ) клеток с учетом КВЛ наночастиц, используя формулу:

$$\text{ИФ} = (\text{значение флуоресценции, у.е.} * 100) / \text{КВЛ},$$

где КВЛ – квантовый выход люминесценции.

КВЛ для контроля (клетки без обработки наночастицами) принимали за 100%.

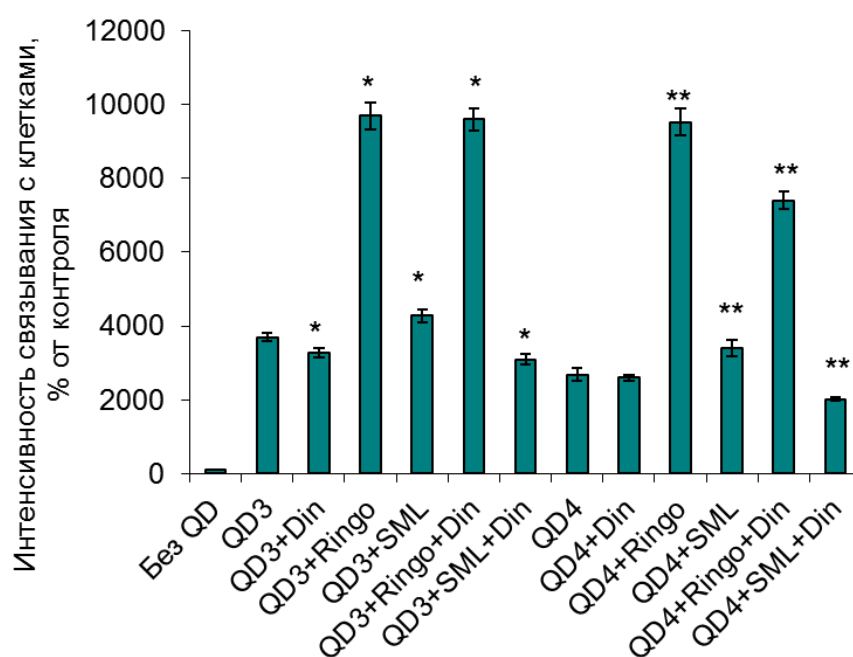
**Результаты.** Исследование физико-химических свойств наночастиц показало, что в среде DMEM с 10% ЭТС дзета-потенциал квантовых точек снижается, и они приобретают отрицательный заряд, составляющий -9,43 и -9,32 мВ соответственно. Вероятно, это изменение обусловлено взаимодействием с компонентами среды и формированием из них «короны», окружающей наночастицу. Агрегации наночастиц в среде культивирования не наблюдали. Используемые препараты также не вызывали агрегации.

При 24-часовой инкубации в полной среде DMEM наблюдалось связывание QD3 и QD4 с клетками глиомы C6, рис.1. С частицами QD3 клетки связывались в 1,4 раза интенсивнее, чем с QD4.

Динасор снижал связывание QD3 с клетками на 11%, связывание QD4 с клетками снижалось на 3%.

Препарат SML1046 (ингибитор GSK-3, понижающего регулятора динамина) повышал связывание QD3 и QD4 с клетками на 16 и 26% соответственно, но не снижал эффект динасора, а напротив, даже усиливал. При совместном действии динасора и SML1046 снижение связывания QD3 и QD4 с клетками составило 16 и 25%.

Ringo 1-23 значительно повышал связывание с клетками наночастиц обоих типов. QD3 в присутствии Ringo 1-23 связывались с клетками в 2,6 раза, QD4 – в 3,5 раза интенсивнее, чем в среде без препаратов. Динамин не изменил эффект Ringo 1-23 в отношении QD3 и несколько снизил – в отношении QD4.



**Рисунок 1.** Связывание наночастиц с клетками глиомы С6 в присутствии динасора (Din), Ringo 1-23 (Ringo), SML1046 (SML) и брефельдина А (Br); \*  $P < 0,05$  при сравнении с серией «qd3»; \*\*  $P < 0,05$  при сравнении с серией «qd4»

Флуоресцентная микроскопия показала, что наночастицы не образовывали агрегатов снаружи клеток, проникали внутрь и распределялись в виде гранул.

Таким образом, наши данные показывают, что препараты динасор и Ringo 1-23, являющиеся модуляторами активности динамина, оказали различный эффект на поглощение наночастиц.

Данные литературы свидетельствуют, что динасор и Ringo 1-23 могут оказывать различное влияние на функции динамина. Хорошо установлено, что динасор в клетках ингибирует ГТФ-азную активность динамина и эндоцитоз [3]. Ringo 1-23 стабилизирует кольцевые структуры динамина и активирует ГТФ-азную его активность [4] и актин-зависимую полимеризацию динамина [2].



Возможно, что в усилении маркировки клеток при действии Ringo 1-23 основную роль играет способность этого агента стабилизировать кольцевые структуры динамина и усиливать его актин-зависимую полимеризацию. Так как динасор, ингибирующий ГТФ-азную активность динамина, не отменял накопление наночастиц в клетках, можно предполагать, что ГТФ-азная активность динамина не играет решающей роли или что в присутствии Ringo 1-23 динасор не проявляет своего ингибирующего действия.

В качестве объяснения полученных нами результатов может выступать предположение о том, что Ringo 1-23 блокирует экзоцитоз наночастиц, благодаря чему происходит их постепенное накопление в клетках.

#### **Заключение.**

В поглощении клетками наночастиц, инкапсулированных амфифильным полимером, участвуют динамин-зависимые механизмы. Препараты, модулирующие активность динамина, могут использоваться для регуляции интенсивности эндоцитоза. Ringo 1-23, стабилизирующий кольцевые структуры динамина и активирующий его ГТФ-азную его активность, значительно усиливает накопление наночастиц в клетках глиомы С6.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта БРФФИ №X20КИ-009 и ГПНИ ««Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», задание 2.1.04 НИР 1.

#### **Список литературы**

1. Fedosyuk, A. Determination of Concentration of Amphiphilic Polymer Molecules on the Surface of Encapsulated Semiconductor Nanocrystals/ A. Fedosyuk, A. Radchanka, A. Antanovich et al.// *Langmuir*. – 2016. – V. 32, N8. - P. 1955–1961.
2. Gu C. Regulation of dynamin oligomerization in cells: the role of dynamin-actin interactions and its GTPase activity/ C. Gu, J. Chang, V.A. Shchedrina et al.// *Traffic*. - 2014. - V. 15, N8. – P. 819–38.
3. Hill, T.A. Inhibition of dynamin mediated endocytosis by the dynoles–synthesis and functional activity of a family of indoles / T.A. Hill, C.P. Gordon, A.B. McGeachie et al. // *J Med Chem*. - 2009. - V. 52. – P. 3762–73.
4. Robinson P. J., Sever S. USE OF DYNAMIN RING STABILIZERS. Patent Application Publication May 17, 2012 Sheet 1 of 13 US 2012/O122968 A1
5. Sukhanova, A. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells / A. Sukhanova, J. Devy, L. Venteo et al. // *Anal. Biochem*. – 2004. – V. 324. – P. 60–67.

## УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ В ПОГЛОЩЕНИИ НАНОЧАСТИЦ КЛЕТКАМИ

**Терпинская Т.И.**

*к. б. н., ведущий научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
terpinskayat@mail.ru;*

**Янченко Т.Л.**

*младший научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
tanyaya190@gmail.com;*

**Радченко А.В.**

*научный сотрудник лаборатории нанохимии НИИ физико-химических проблем, г. Минск, Беларусь  
aleksandrardchenko10@gmail.com;*

**Полукошко Е.Ф.**

*научный сотрудник государственного научного учреждения Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
efpoluko@list.ru;*

**Артемов М.В.**

*д. х. н., заведующий лабораторией нанохимии НИИ физико-химических проблем, г. Минск, Беларусь  
m\_artemyev@yahoo.com*

*Исследовали роль кальций-зависимых механизмов во взаимодействии наночастиц с клетками. Показано, что поглощение наночастиц зависит от кальциевого баланса клетки. Изменение активности кальциевых каналов, проницаемости плазматической мембраны для ионов кальция и концентрации ионов кальция в среде культивирования ведёт к изменению интенсивности эндоцитоза. Химический состав функциональных групп полимерной оболочки является одним из факторов, определяющих роль кальций-зависимых механизмов в поглощении наночастиц.*

**Ключевые слова:** кальций; наночастицы; эндоцитоз; кальциевые каналы

## CALCIUM-DEPENDENT MECHANISMS ARE INVOLVED IN THE UPTAKE OF NANOPARTICLES BY CELLS

**Terpinskaya T.I.**

*Candidate of Biology, Leading Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
terpinskayat@mail.ru*

**Yanchanka T.L.**

*Junior Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
tanyaya190@gmail.com;*

**Radchanka A.V.**

*Researcher, Research Institute for Physical Chemical Problems, Minsk,  
Belarus*

*aleksandraradchenko10@gmail.com;*

***Palukoshka A.F.***

*Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus*

*efpoluko@list.ru;*

***Artemyev M.V.***

*Doctor of Chemistry, Head of the Laboratory of Nanochemistry, Research  
Institute for Physical Chemical Problems, Minsk, Belarus*

*m\_artemyev@yahoo.com*

*The role of calcium-dependent mechanisms in the interaction of nanoparticles with cells was investigated. It was shown that the uptake of nanoparticles depends on the calcium balance of the cell. Changes in the activity of calcium channels, the permeability of the plasma membrane for calcium ions and the concentration of calcium ions in the culture medium leads to the change in the intensity of endocytosis. The chemical composition of the functional groups of the polymer shell is one of the factors that determine the role of calcium-dependent mechanisms of the capture of nanoparticles.*

***Key words:*** *calcium; nanoparticles; endocytosis; calcium channels*

Наночастицы рассматриваются как перспективные инструменты в качестве клеточных маркеров, а также платформ для введения в клетку лекарственных веществ или нуклеиновых кислот. Это обуславливает актуальность исследования закономерностей взаимодействия наночастиц с клетками и разработки способов управления процессами эндоцитоза.

Ионы кальция являются одним из наиболее важных вторичных мессенджеров, участвуя в передаче биохимических сигналов и влияя на физиологические функции клетки и организма в целом. При изучении экзо- и эндоцитоза синаптических везикул показано, что ионы кальция участвуют в регуляции этих процессов [1]. В то же время роль кальций-зависимых механизмов в поглощении наночастиц практически не исследована.

Цель данной работы - исследовать участие ионов кальция в регуляции поглощения наночастиц клетками.

Клеточный обмен кальция осуществляется при участии ряда кальциевых каналов и насосов, обеспечивающих регулируемое поступление ионов кальция из внеклеточной среды в кальциевые депо клетки (расположенные главным образом в эндоплазматическом ретикулуме) и в цитоплазму, а также выброс кальция.

Среди кальциевых каналов, экспрессирующихся на плазматической мембране, значительную роль играют каналы, управляемые кальциевыми депо. Эти каналы активируются при опустошении кальциевых депо и служат для пополнения запасов кальция. Использование в экспериментах блокаторов или активаторов кальциевых каналов позволяет оценить влияние этих препаратов на

изучаемые параметры и судить о роли кальциевого баланса в физиологических процессах. Инструментами для исследования роли ионного баланса в регуляции клеточной активности являются также ионофоры, позволяющие ионам проникать через мембраны по градиенту концентрации, и хелаторы, обладающие способностью быстро связывать свободные ионы.

В качестве препаратов, влияющих на кальциевый баланс клетки, мы использовали блокатор каналов временного рецепторного потенциала (TRP-каналов) SKF-96365, кальциевый ионофор A23187, хелатор ионов кальция этиленгликоль-бис ( $\beta$ -аминоэтиловый эфир)-N, N, N', N'-тетрауксусную кислоту (ЭГТА).

#### **Материалы и методы.**

*Клетки.* Опыты проведены на клетках глиомы C6 из «Белорусской коллекции культур клеток человека и животных» РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ. Клетки выращивали в питательной среде DMEM (Sigma-Aldrich), дополненной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone), и антибиотиком (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин (Sigma-Aldrich)).

*Наночастицы.* Использованы синтезированные согласно [2] флуоресцентные полупроводниковые наночастицы (квантовые точки – QD) типа «ядро-оболочка» CdSe/ZnS, инкапсулированные амфифильным полимером. Устойчивость к фотодеградаци и яркая флуоресценция в узком диапазоне позволяют эффективно исследовать количественные показатели связывания таких наночастиц с клетками методами проточной цитометрии. Полимерная оболочка наночастиц QD1 включала положительно заряженные четвертичные аммонийные группы и отрицательно заряженные карбоксильные группы, наночастиц QD2 - положительно заряженные четвертичные аммонийные группы и отрицательно заряженные сульфонатные группы. В фосфатном буфере QD1 и QD2 характеризовались умеренным положительным дзета-потенциалом - +7,8 и + 10,8 мВ соответственно.

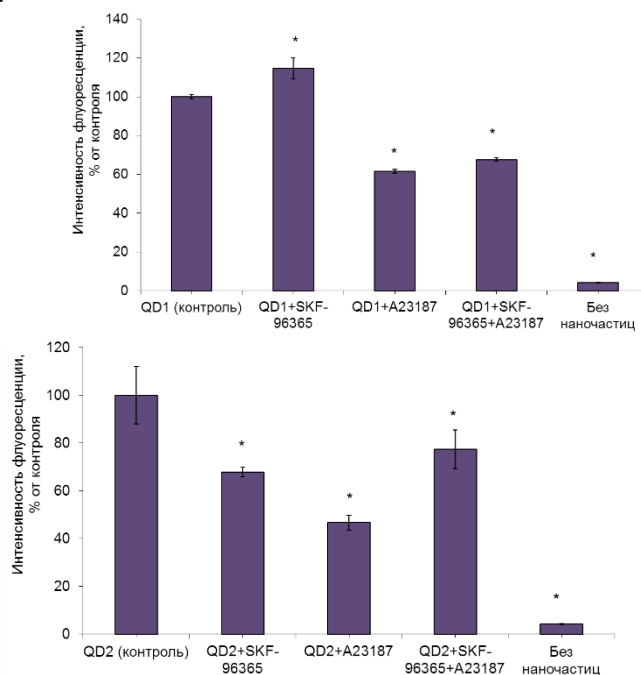
*Проведение экспериментов.* Клетки суспензировали в среде DMEM с добавлением 10% ЭТС или в фосфатном буфере. В клеточные пробы вносили SKF-96365 в конечной дозе 3 мкМ; A23187 в конечной дозе 10 мкМ, ЭГТА в конечной дозе 10 мМ, в контрольных сериях – изотонический раствор. Инкубировали 30 мин при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> 30 мин, затем добавляли наночастицы в конечной концентрации 0,02 мкМ. Культивировали клетки 24 ч в среде DMEM или 30 мин в фосфатном буфере, затем готовили клеточные пробы и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (Becton Dickinson), оценивая интенсивность флуоресцентной маркировки клеток.

#### **Результаты**

Блокада TRP-каналов способствовала повышению на 15% поглощения клетками наночастиц с четвертичными аммонийными и карбоксильными группами и снижению на 32% поглощения наночастиц с четвертичными аммонийными и сульфонатными группами, рис. 1.

Поглощение наночастиц обоих типов снижал ионофор A23187, который формирует комплексы с двухвалентными катионами, перенося их через мембраны и таким образом нарушая потоки кальция между внеклеточным пространством, цитозолем и кальциевыми депо клетки. При культивировании в полной среде концентрация кальция вне клетки на порядки выше, чем в цитоплазме, и ионофор A23187 способствует повышению концентрации ионов кальция в цитоплазме. Кроме того, ионы кальция могут переходить в цитоплазму из кальциевых депо. Следовательно, процессы поглощения зависят от кальциевого баланса клетки и повышение цитоплазматического уровня кальция, вероятно, снижает интенсивность поглощения.

При блокаде TRP-каналов ингибирующий эффект  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора A23187 на поглощение наночастиц снижался. Одно из возможных объяснений состоит в том, что блокада каналов препятствует заполнению кальциевых депо, поэтому ионофор способствует переносу ионов кальция в цитоплазму только из внеклеточной среды.



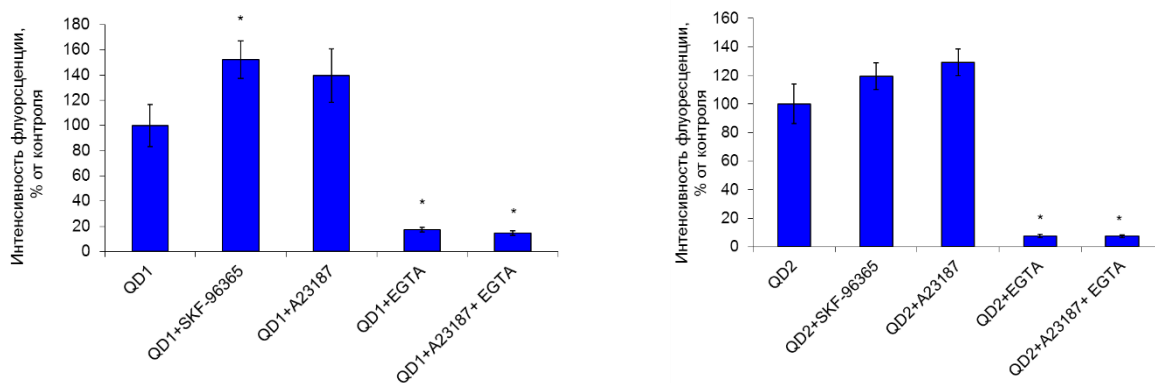
**Рисунок 1.** – Интенсивность флуоресценции клеток, обработанных SKF-96365 (3 мкМ) и ионофором A23187 (10 мкМ) и инкубированных 24 ч с наночастицами QD1 (слева) и QD2 (справа) (среда инкубации – ДМЕМ с 10% ЭТС), проточная цитометрия; \*  $P < 0,05$  при сравнении с контролем

Дополнительные эксперименты были проведены при культивировании клеток в фосфатном буфере, где ионы кальция отсутствовали. Эксперименты были краткосрочными, чтобы избежать клеточной гибели из-за бедной среды.

При блокаде TRP-каналов наблюдалось повышение интенсивности маркировки клеток наночастицами QD1 в 1,5 раза. Для QD2, несущих в оболочке четвертичные аммонийные и сульфатные группы, наблюдалась аналогичная,

но менее выраженная тенденция, не достигшая статистической значимости - увеличение интенсивности маркировки в 1,2 раза, рис. 2.

При обработке клеток ионофором A23187 наблюдалась тенденция к усилению или статистически значимое усиление маркировки клеток всеми исследованными наночастицами. При культивировании в бескальциевой среде ионофор способствует выходу ионов кальция из клетки по градиенту концентрации, следовательно, снижение концентрации кальция благоприятствует поглощению наночастиц. Но хелатирование кальция с помощью ЭГТА привело к очень значительному, до 13 раз, снижению поглощения обоих типов наночастиц, рис. 2. Это позволяет заключить, что ионы кальция все же необходимы для поглощения.



**Рисунок 2** – интенсивность флуоресценции клеток, обработанных SKF-96365 (3 мкМ), ионофором A23187 (10 мкМ) и/или EGTA (10мМ), и инкубированных 30 мин с наночастицами QD1 (слева) или QD2 (справа) (среда инкубации - фосфатный буфер), проточная цитометрия; \* P < 0,05 при сравнении с контролем

В целом, полученные данные свидетельствуют, что в полной среде ДМЕМ Ca<sup>2+</sup>-ионофор снижает маркировку клеток обоими исследованными типами наночастиц, а в фосфатном буфере без ионов кальция наблюдается тенденция к повышению маркировки клеток. Следовательно, снижение концентрации ионов кальция в цитоплазме способствует поглощению наночастиц.

Блокатор TRP-каналов SKF-96365 в полной среде и фосфатном буфере способствует связыванию с клетками наночастиц, несущих четвертичные аммонийные и карбоксильные группы в оболочке. Наличие в оболочке сульфонатных групп вместо карбоксильных приводит к изменению эффекта SKF-96365, который снижает или не влияет на связывание наночастиц с клетками. Это свидетельствует о различиях в механизмах поглощения наночастиц, несущих в оболочке химические группы сходного заряда, но различного химического состава.

### **Заключение.**

Поглощение наночастиц зависит от кальциевого баланса клетки. Изменение активности кальциевых каналов, проницаемости плазматической мембраны для ионов кальция и концентрации кальция в среде культивирования ведёт к изменению интенсивности и регуляции эндоцитоза. Химический состав

функциональных групп полимерной оболочки является одним из факторов, определяющих роль кальций-зависимых механизмов в поглощении наночастиц.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта БРФФИ №X20КИ-009 и ГПНИ ««Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», задание 2.1.04 НИР 1.

#### **Список литературы**

6. Yao, C.K., Liu, Y.T., et al. A Ca<sup>2+</sup> channel differentially regulates clathrin-mediated and activity-dependent bulk endocytosis / C.K. Yao, Y.T. Liu et al. PLoS Biol. - 2020. - V. 15, issue 4: e2000931.

7. Sukhanova, A. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells / A. Sukhanova, J. Devy, L. Venteo et al. // Anal. Biochem. – 2004. – V. 324. – P. 60–67.

**ВЛИЯНИЕ МЕКСИДОЛА НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПРОФИЛЬ  
ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС В МОДЕЛИ ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ  
МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ**

**Федорова М. В.**

*соискатель кафедры медицинской биофизики  
учреждения образования «Московский государственный университет  
имени М.В.Ломоносова», Москва, Россия  
theklazontag@yandex.ru*

**Созарукова М. М.**

*к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории синтеза  
функциональных материалов и переработки минерального сырья  
государственного учреждения «Институт общей и неорганической  
химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук», Москва, Россия*

*S\_MadinaM@bk.ru*

**Сапрыкин В. П.**

*д. м. н., профессор,  
учреждения образования «Российский университет дружбы народов»,  
кафедра биологии и общей генетики, Москва, Россия*

*v\_p\_s@mail.ru*

**Проскурнина Е. В.**

*д. м. н., доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной  
биологии*

*государственного учреждения «Медико-генетический научный центр  
имени академика Н.П.Бочкова», Москва, Россия*

*proskurnina@gmail.com*

*В патогенезе острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) существенную роль играет окислительный стресс. Цель исследования — изучить влияние мексидола на антиоксидантную систему крови крыс при ОНМК. Антиоксидантный профиль анализировали методом хемилюминесценции, определяя емкость сильных, средней силы и слабых антиоксидантов. Как ложная операция, так и ОНМК приводили к окислительному стрессу по сравнению с интактными животными. Применение мексидола приводило к увеличению антиоксидантного потенциала плазмы для всех изученных параметров за счет прежде всего патогенетических механизмов.*

***Ключевые слова:** антиоксидантный профиль; плазма крови; мексидол; острое нарушение мозгового кровообращения*

**EFFECT OF MEXIDOL ON ANTIOXIDANT PROFILE OF RAT  
BLOOD PLASMA IN A ACUTE CEREBRAL CIRCULATION DISORDER**

**Fedorova M. V.**

*Applicant for the Department of Medical Biophysics*



*Moscow State University, Moscow, Russia  
theklazontag@yandex.ru*

**Sozarukova M. M.**

*Candidate of Chemistry, Junior Researcher, Laboratory for Synthesis of  
Functional Materials and Processing of Mineral Raw Materials  
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian  
Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*S\_MadinaM@bk.ru*

**Saprykin V. P.**

*RUDN University, Medical Institute, Department of Biology and General  
Genetics, Moscow, Russia*

*v\_p\_s@mail.ru*

**Proskurnina E. V.**

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Molecular  
Biology*

*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia*

*proskurnina@gmail.com*

*Oxidative stress plays a significant role in the pathogenesis of acute cerebrovascular accident (ACVA). The aim of the study was to study the effect of Mexidol on the antioxidant system of the blood of rats with stroke. The antioxidant profile was analyzed by chemiluminescence, determining the capacity of strong, medium, and weak antioxidants. Both sham surgery and ACVA resulted in oxidative stress compared to intact animals. The use of Mexidol led to an increase in the antioxidant potential of plasma for all studied parameters due primarily to pathogenetic mechanisms.*

**Keywords:** *antioxidant profile; blood plasma; mexidol; acute cerebrovascular accident*

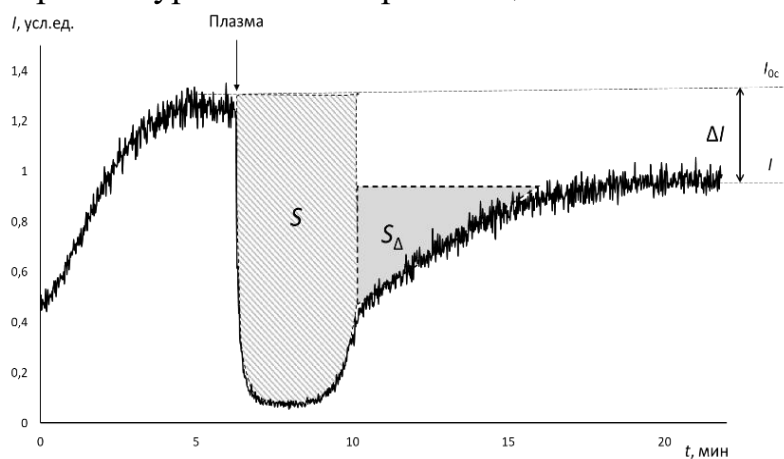
В патогенезе ишемического инсульта существенную роль играет окислительный стресс, приводящий к истощению антиоксидантных ресурсов крови. Многочисленными исследованиями показана эффективность его коррекции антиоксидантными и антигипоксантами препаратами, улучшающими клинические и биохимические показатели пациентов [1]. Одним из широко применяемых препаратов патогенетической терапии при инфаркте мозга является мексидол (2-этил-6-метил-3-гидрокси-4-пиридина сукцинат), который нейтрализует действие свободных радикалов, ингибирует перекисное окисление липидов, участвует в клеточном митохондриальном дыхании и обладает хорошей биодоступностью [2]. Таким образом, оценка антиоксидантных свойств крови является важной при общей оценке эффективности фармацевтических препаратов. Хемилюминесцентные методы являются высокочувствительными методами анализа свободнорадикальных реакций [3]. Цель исследования — изучить влияние мексидола на

антиоксидантную систему крови крыс при остром нарушении мозгового кровообращения (ОНМК).

#### Материалы и методы.

**Животные.** В экспериментах анализировали плазму крови самцов беспородных крыс. Острое нарушение мозгового кровообращения моделировали путем перевязки сонных артерий. После операции крысы в течение 7 дней получали мексидол в дозе 250 мг/кг (внутрижелудочковое введение). Забор крови в объеме 200 мкл осуществляли из хвостовой вены на седьмые сутки после операции. Кровь центрифугировали, плазму анализировали в течение рабочего дня. Контрольные подгруппы включали 10 интактных и 10 ложнооперированных животных. Исследуемые группы включали 10 животных с ОНМК, не получивших препарата, и 10 животных с ОНМК, получавших мексидол.

**Хемилюминесцентный протокол.** Антиоксидантную активность образца плазмы определяли методом активированной хемилюминесценции в системе генерации свободных радикалов 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП) (Sigma-Aldrich) в присутствии люминола (Sigma-Aldrich) [1]. Расчет параметров антиоксидантного профиля приведен на рис. 1: а) площадь депрессии сигнала  $S$ , образующейся в результате действия сильных антиоксидантов плазмы (мочевая кислота и аскорбат), б) площадь «треугольной» депрессии  $S_{\Delta}$ , характеризующей антиоксиданты средней силы (предположительно, белки), в) параметр  $\Delta I$ , представляющий разность между новым ( $I$ ) и начальным ( $I_0$ ) стационарными уровнями и отражающий емкость слабых антиоксидантов.



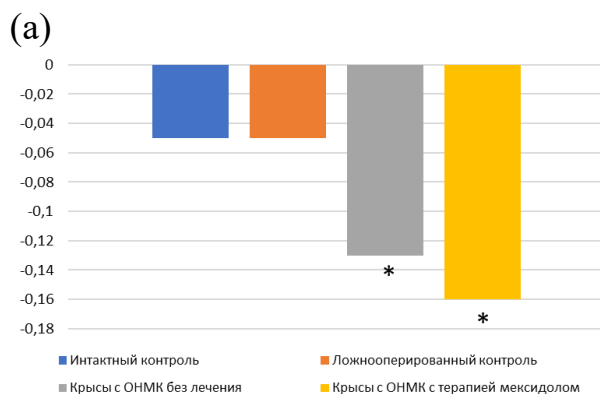
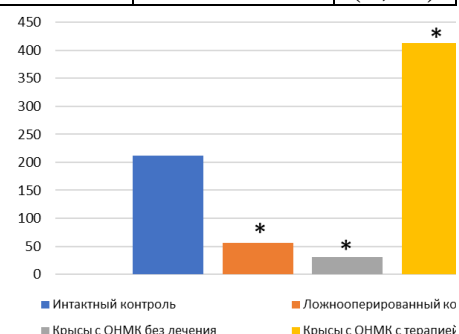
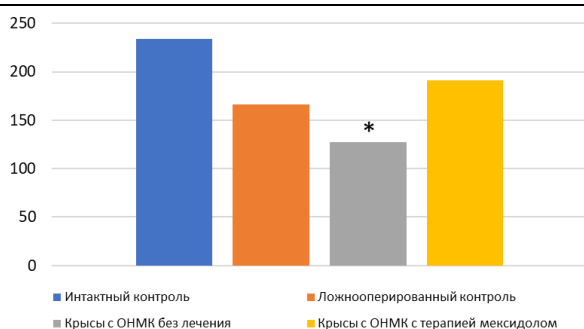
**Рисунок 1.** Хемилюминограмма плазмы крови крысы, получавшей мексидол после ОНМК и принцип расчета параметров антиоксидантного профиля; стрелкой показан момент внесения плазмы.

**Статистическая обработка.** Хемилюминограммы регистрировали в трех параллельных опытах. Статистический анализ проведен с помощью критериев Шапиро-Уилка и Манна-Уитни с использованием программы STATISTICA (Statsoft, США). Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха с указанием достоверности различий между сравниваемыми группами.

**Результаты и обсуждение.** По критерию Шапиро-Уилка данные не подчиняются нормальному распределению ( $p < 0,05$ ). Описательная статистика для параметров, формирующих антиоксидантный профиль, приведена в табл. 1 и на рис. 2.

**Таблица 1.** - Описательная статистика антиоксидантного профиля

	$S$	$S_{\Delta}$	$\Delta I$
Интактный контроль	234 (79)	212 (61)	-0,05 (0,01)
Ложнооперированный контроль	166 (53)	56 (23)	-0,05 (0,01)
Крысы с ОНМК без лечения	127 (28)	31 (13)	-0,13 (0,08)
Крысы с ОНМК с терапией мексидолом	191 (58)	413 (92)	-0,16 (0,09)



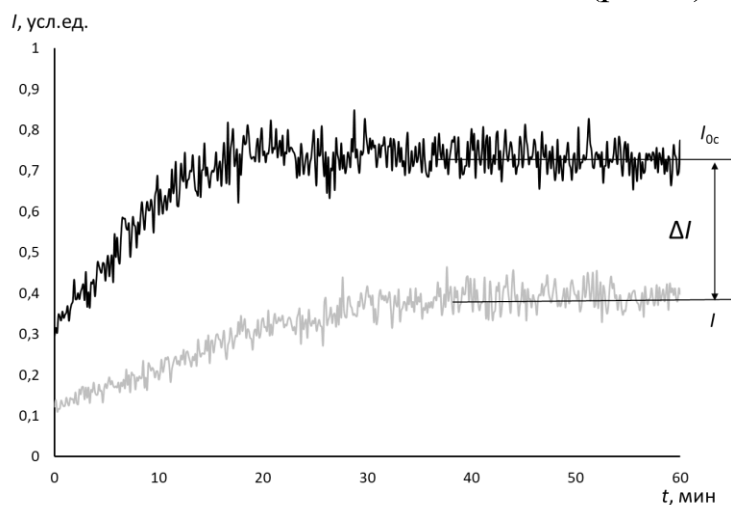
**Рисунок 2.** Гистограммы параметров: (а)  $S$ , (б)  $S_{\Delta}$ , (в)  $\Delta I$ .

Антиоксидантная емкость, обеспечиваемая сильными антиоксидантами («уратная» емкость), была максимальной в группе интактных животных, снижалась у ложнооперированных и в большей мере у крыс с ОНМК, не получающих лечения, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. Терапия мексидолом привела к частичной компенсации окислительного стресса. Аналогичные закономерности были получены для антиоксидантов средней силы («белковая» емкость), однако влияние мексидола привело к избыточной антиоксидантной емкости. Емкость слабых антиоксидантов была одинаковой в группе интактных и ложнооперированных крыс, однако нарастала в группе крыс, не получивших лечения, и еще большей была в группе крыс, получивших лечение мексидолом. Сравнительная статистика приведена в табл. 2.

**Таблица 2.** - Сравнительная статистика по критерию Манна-Уитни,  $p = 0,90$

Сравниваемые группы	$S$	$S_{\Delta}$	$\Delta I$
Интактный контроль и ложнооперированные	0,14	0,01	0,64
Интактный контроль и группа ОНМК	0,01	0,04	0,05
Ложнооперированные и группа ОНМК	0,31	0,51	0,05
Ложнооперированные и группа мексидола	0,93	0,06	0,07
ОНМК без лечения и с терапией мексидолом	0,23	0,15	0,90

Введение мексидола в хемилюминесцентную систему приводит к снижению уровня стационарного свечения ( $\Delta I$ ). Такое поведение характерно для кинетически «медленных» антиоксидантов (рис. 3).



**Рисунок 3.** Хемилюминограмма 75 мкМ мексидола в системе АБАП-люминол.

В итоге была получена совокупность показателей, составляющих антиоксидантный профиль для каждой исследуемой группы. По отношению к «уратной» емкости  $S$  только группа ОНМК значительно отличалась от интактного контроля, хотя ложная операция тоже приводила к снижению этого параметра. Терапия мексидолом привела к частичной компенсации этого окислительного стресса. Поскольку сам мексидол не является сильным антиоксидантом, можно предположить, что это влияние реализуется за счет патогенетических механизмов. Емкость антиоксидантов средней силы оказалась более чувствительной к ишемии и терапии, чем антиоксидантная емкость сильной фракции. Операция как ложная, так и истинная приводила к значимому снижению этого параметра, причем в группе ОНМК без терапии изменения были более выраженными. В группе мексидола этот параметр оказался существенно выше значения группы интактного контроля, что требует дальнейшего исследования. По емкости слабых антиоксидантов значимые различия были получены между интактным контролем и группой мексидола, что можно объяснить антиоксидантными свойствами препарата. В группе ОНМК емкость слабых антиоксидантов была значимо выше, чем в группе контроля и

ложнооперированных животных, что может быть связано с выбросом в кровь ишемического токсина, обладающего антиоксидантными свойствами.

### **Список литературы**

1. Романенко, А. В., Соловьева, Э. Ю // Механизмы гипоксически-ишемического повреждения мозга при инсульте, пути коррекции. Нервные болезни. 2021. — №1. — С. 18-26.
2. Кнни, К. С., Демин, Т. В., Адеева, Л. Б. // Влияние применения мексидола в период «терапевтического окна» ишемического инсульта на эффективность внутривенной тромболитической терапии. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2018. — Т.10. —№ 3. — С. 86–90.
3. Алексеев, А. В., Проскурнина, Е. В., Владимиров, Ю. А. // Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана). Вестник Московского ун-та, сер: Химия. 2012. — Т. 53. — С. 187–193.

**СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С  
ВЕРОЯТНОСТЬЮ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ  
БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

**Хотько Е. А.**

*ассистент кафедры биологической химии учреждения образования  
«Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь  
qwert.poilk@mail.ru;*

**Таганович А. Д.**

*д. м. н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии  
учреждения образования «Белорусский государственный медицинский  
университет», г. Минск, Беларусь  
a.taganovich@gmail.com;*

**Мурашко М. А.**

*студентка лечебного факультета учреждения образования «Белорусский  
государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь  
marina\_murashko2001@mail.ru;*

*Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – мультифакторное  
заболевание, фенотипическое проявление которого детерминировано  
генетической предрасположенностью. Целью работы явилось определение роли  
полиморфных вариантов генов, кодирующих интерлейкины 4 и 6 и фактор  
некроза опухоли  $\alpha$ , для оценки вероятности развития ХОБЛ у белорусов. В ходе  
работы установлены полиморфные локусы, связанные с развитием заболевания,  
и их генотипы, повышающие и понижающие вероятность возникновения ХОБЛ.*

**Ключевые слова:** *хроническая обструктивная болезнь легких;  
полиморфизм; интерлейкины*

**ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF INTERLEUKIN  
GENES WITH THE RISK OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY  
DISEASE**

**Khotko E. A.**

*Assistant of the Department of Biological Chemistry of the Educational  
Institution “Belarusian State Medical University”, Minsk, Belarus  
qwert.poilk@mail.ru;*

**Tahanovich A. D.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department Biological  
Chemistry of the Educational Institution “Belarusian State Medical University”,  
Minsk, Belarus  
a.taganovich@gmail.com;*

**Murashko M. A.**

*Student of the Medical Faculty of the Educational Institution “Belarusian State  
Medical University”, Minsk, Belarus  
marina\_murashko2001@mail.ru;*

*Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a multifactorial disease, the phenotypic manifestation of which is determined by genetic predisposition. The aim of the work was to determine the role of polymorphic variants of genes encoding interleukins 4 and 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  for assessing the likelihood of developing COPD in Belarusians. In the course of the work, polymorphic loci associated with the development of the disease and their genotypes, which increase and decrease the likelihood of COPD, were identified.*

**Key words:** *chronic obstructive pulmonary disease; polymorphism; interleukins*

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой мультифакторную патологию, фенотипическое проявление которой является результатом реализации неблагоприятных внешних факторов на фоне генетической предрасположенности [1]. Наследственная компонента, в случае многофакторных заболеваний, обусловлена наличием мутаций в структуре тех генов, которые кодируют синтез белковых участников патогенеза ХОБЛ [2]. Среди них особое значение имеют гены, ответственные за синтез провоспалительных цитокинов, которые являются непосредственными регуляторами воспалительного процесса в легких, такие как гены IL4, IL6 и TNF $\alpha$ .

Целью данной работы явился поиск ассоциации полиморфных локусов генов, кодирующих интерлейкины 4, 6 и фактор некроза опухоли  $\alpha$ , с возникновением ХОБЛ, и определение генотипов этих полиморфизмов, связанных с повышенной и пониженной вероятностью развития заболевания у жителей Республики Беларусь.

Материалом для исследования служила ДНК клеток крови, отобранной у 95 пациентов с ХОБЛ и 95 здоровых людей. Для генотипирования были выбраны 3 полиморфных локуса rs2243250 гена IL4, rs1800795 гена IL6 и rs1800629 гена TNF $\alpha$ . Поиск и идентификация полиморфизмов проведены путем использования аллель-специфических TaqMan-зондов (ООО «ТестГен») в ходе полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Статистическую обработку полученных данных выполняли в программе SPSS 23.0. Для проверки репрезентативности исследуемых групп проводили сравнение наблюдаемых частот генотипов исследуемых полиморфизмов с ожидаемыми, рассчитанными с использованием уравнения Харди-Вайнберга. Для сравнительной оценки носительства генотипов и аллелей у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей вычисляли критерий  $\chi^2$ . Для оценки связи того или иного генотипа с вероятностью развития ХОБЛ рассчитывали параметр отношения шансов (ОШ) и 95%-ный доверительный интервал (ДИ). Статистически значимыми принимали результаты при  $p < 0,05$ .

Оценка встречаемости генотипов в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц на соответствие уравнению Харди-Вайнберга показала, что сформированные для исследования выборки являются репрезентативными в отношении полиморфных локусов rs2243250 гена IL4 и rs1800795 гена IL6, а при

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

оценке полиморфизма rs1800629 гена TNF $\alpha$  отмечено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга только в группе пациентов с ХОБЛ, что может являться одним из указаний на связь этого полиморфного варианта с развитием заболевания (таблица 1) [3].

**Таблица 1.** – Оценка репрезентативности исследуемых групп согласно уравнению Харди-Вайнберга

Генотип	Пациенты с ХОБЛ, %	HWE, %	$\chi^2$ (p)	Здоровые лица, %	HWE, %	$\chi^2$ (p)
TNF $\alpha$ , rs1800629						
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	
IL4, rs2243250						
CC	64,2	61,5	2,61 (0,11)	58,9	60,6	0,98 (0,32)
CT	28,4	33,9		37,9	34,5	
TT	7,4	4,7		3,2	4,9	
IL6, rs1800795						
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	

Дальнейший сравнительный анализ носительства генотипов полиморфного локуса rs2243250 гена IL4 показал, что среди пациентов, страдающих ХОБЛ, незначительно увеличена доля людей, имеющих мажорный гомозиготный генотип CC (64,2%), по сравнению с таким носительством в группе здоровых лиц (58,9%) (таблица 1). В то же время здоровые люди чаще являлись носителями гетерозиготного генотипа CT (37,9%), чем пациенты с ХОБЛ (28,4%). Однако обнаруженные отличия не были статистически значимы.

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%) [4]. Несмотря на отсутствие в нашем исследовании статистически значимых различий по частотам генотипов между изучаемыми выборками, носительство GA полиморфизма rs1800629 в группе пациентов с ХОБЛ также распределяется подобным образом (28,4% против 22,1%) (таблица 1).

При оценке носительства генотипов полиморфного локуса rs1800795 гена IL6 обнаружено, что генотип CC связан с пониженной вероятностью возникновения заболевания (ОШ 0,42; ДИ [0,22-0,82], p=0,03), в то время как статистически значимой ассоциации какого-либо генотипа с повышенным риском ХОБЛ не выявлено (таблица 2). Однако, наличие минорной аллели G



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

сопряжено с более высокой вероятностью заболевания по сравнению с носительством аллели С (ОШ 1,53). В литературе имеются данные о том, что частота носительства генотипа GG этого полиморфного локуса у пациентов с IV стадией ХОБЛ значительно выше, чем при II и III стадиях заболевания [5].

**Таблица 2.** – Частоты носительства генотипов полиморфного локуса гена IL6 у пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Ген/rs	Генотип/ Аллель	Частота носительства, %		$\chi^2$ (p)	ОШ	95%ДИ
		Пациенты с ХОБЛ, n=95	Здоровые лица, n=95			
IL6 rs1800795	CC	19,0 (18)	35,8 (34)	<b>6,88</b> <b>(0,03)</b>	<b>0,42</b>	<b>0,22-0,82</b>
	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
	аллель С	45,3 (86)	55,8 (106)	<b>0,041</b>	0,66	0,44-0,98
	аллель G	54,7 (104)	44,2 (84)		<b>1,53</b>	<b>1,02-2,29</b>

Таким образом, носительство генотипа CC полиморфного локуса rs1800795 гена IL6 снижает вероятность возникновения заболевания у белорусов.

### Список литературы

1. Mannino, D.M. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends / D.M. Mannino, A.S. Buist // *Lancet*. – 2007. – Vol. 370, № 9589. – P. 765–773.
2. Хотько, Е.А. Полиморфизм генов рецепторов и их лигандов при хронической обструктивной болезни легких / Е.А. Хотько, А.Д. Таганович // *Медицинский журнал*. – 2016. – № 3. – P. 36–42.
3. Lee, W. C. Searching for disease-susceptibility loci by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium in a gene bank of affected individuals / W. C. Lee // *Am. J. Epidemiol.* – 2003. – Vol. 158, № 5. – P. 397–400.
4. 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.
5. Ассоциация полиморфных маркеров генов цитокинов (IL1B, IL1RN, TNFA, LTA, IL6, IL8, IL10) с развитием хронической обструктивной болезни легких / К. В. Данилко [и др.] // *Молекулярная биология*. – 2007. – Т. 41, № 1. – С. 26–36

## ДИЗАЙН ВАКЦИННОГО ПЕПТИДА ИЗ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА H5N6

**Хрусталёв В.В.**

*к. б. н., доцент, заведующий кафедрой  
общей химии учреждения образования «Белорусский  
государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь  
vvkhrustalev@mail.ru;*

**Хрусталёва Т.А.**

*к. б. н., учёный секретарь  
государственного научного учреждения  
«Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск,  
Беларусь  
tanissia.lir@gmail.com*

*Статья посвящена поиску структурно стабильного консервативного эпитопа нейраминидазы вируса птичьего гриппа H5N6. Проведён анализ единственной трёхмерной структуры нейраминидазы данного штамма вируса гриппа в сравнении с таковой для пандемического вируса свиного гриппа H1N1. Использован оригинальный алгоритм PentaFOLD 3.0 для поиска структурно устойчивых элементов вторичной структуры. В качестве перспективного вакцинного пептида предложен таковой, соответствующий бета-шпильке с консервативной поверхностью, экспонированной внутрь полости, содержащей активный центр фермента.*

**Ключевые слова:** *нейраминидаза; вирус гриппа H5N6; вирус гриппа H1N1; вторичная структура; вакцинный пептид*

## THE DESIGN OF THE VACCINE PEPTIDE FROM THE AVIAN INFLUENZA H5N6 VIRUS NEURAMINIDASE

**Khrustalev V.V.**

*Candidate of Biology, Associate Professor, Head of the Department  
of General Chemistry of the Educational Institution  
«Belarusian State Medical University», Minsk, Belarus  
vvkhrustalev@mail.ru;*

**Khrustaleva T.A.**

*Candidate of Biology, Scientific Secretary  
of the State Scientific Institution «Institute of Physiology  
of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Belarus  
tanissia.lir@gmail.com*

*The article is on the search of the structurally stable and conserved epitope of avian flu H5N6 virus neuraminidase. The analysis of the only one known three-dimensional structure of that Influenza strain has been performed in comparison with*

*the same protein from the pandemic swine flu H1N1 strain. The original algorithm PentaFOLD 3.0 has been used for the detection of structurally stable elements of secondary structure. As the most promising vaccine peptide we have suggested the one that corresponds to the beta-hairpin with conserved surface that is exposed inside the cavity containing an active center of the enzyme.*

**Key words:** neuraminidase; H5N6 Influenza virus; H1N1 Influenza virus; secondary structure; vaccine peptide

Иммунная система имеет свойство запоминать антигенные детерминанты. Одно из свойств иммунологической памяти поэтически назвали «первородным антигенным грехом» (по англ.: original antigenic sin) [1]. Получается, что в ответ на инфекцию новым штаммом вируса в гораздо большем количестве вырабатываются антитела к консервативным эпитопам, а не к тем, которые имеют иную структуру по сравнению с таковыми у штамма вируса, когда-то впервые заразившего данного человека [2]. Новые клоны В-лимфоцитов не развиваются так хорошо, как клоны клеток памяти, в которых гены специфических антител уже сформировались. Далее в клонах «пробуждённых» клеток памяти продолжается мутагенез, приводящий к отбору мутаций, повышающих сродство «старых» антител к «обновлённым», но консервативным эпитопам.

Информацию о «первородном антигенном грехе» необходимо использовать в подготовке к борьбе с возможными новыми эпидемиями. Серьёзную опасность представляют штаммы птичьего гриппа, которые ещё не смогли адаптироваться к человеческой популяции, но в любой момент могут полностью преодолеть межвидовой барьер. Одним из таких опасных патогенов является вирус птичьего гриппа H5N6, который уже неоднократно передавался от птиц к человеку, но не смог распространиться внутри человеческой популяции [3]. Вакцина против такого возбудителя должна быть основана на эпитопах, которые консервативны настолько, чтобы гены антител, выработанные к человеческим штаммам вируса гриппа (в том числе – к пандемическому штамму H1N1, включённому в вакцины), смогли легко адаптироваться к H5N6.

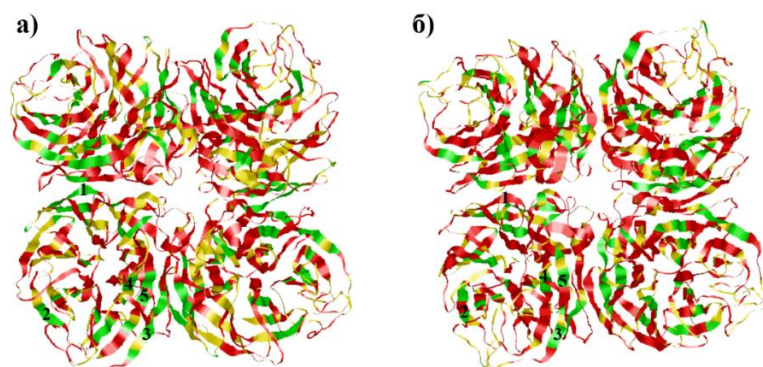
Как показали наши исследования [4], залогом успеха в деле создания новых вакцинных пептидов является стабильность их вторичной структуры. При этом стабильные элементы вторичной структуры должны быть в достаточной степени доступны для контакта с антителами – быть экспонированными водному микроокружению.

**Целью** работы послужил дизайн вакцинного пептида из нейраминидазы вируса птичьего гриппа H5N6 на основании следующих критериев: консервативности его аминокислотной последовательности, стабильности его вторичной структуры и доступности его эпитопов водному микроокружению.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования явились трёхмерные структуры нейраминидазы вируса птичьего гриппа H5N6

(идентификатор в Protein Data Bank: 5HUM) [5] и пандемического свиного гриппа H1N1 (PDB ID: 6Q23) [6]. Аминокислотные последовательности нейраминидаз этих вирусов были выровнены друг с другом с помощью программы MEGA X. Вторичная структура была определена с помощью метода DSSP, так же как и степень экспонированности аминокислотных остатков растворителю (воде). Стабильность элементов вторичной структуры оценивали оригинальным вероятностным методом, включённым в алгоритм PentaFOLD 3.0 [4].

**Результаты.** При сравнении трёхмерных структур на рисунке нельзя не отметить, что вторичная структура нейраминидазы не столь стабильна: как у вируса птичьего гриппа H5N6 (рисунок 1б), так и у пандемического вируса «свиного» гриппа H1N1 (рисунок 1а). На последней структуре заметны три экспонированных водному окружению стабилизированных бета-тяжа. Следует уточнить, что строение надмембранного домена нейраминидазы описывается как «бета-пропеллер с шестью лопастями». Каждая такая лопасть состоит из четырёх бета-тяжей, и только один из них расположен на поверхности белка. В центре «пропеллера» расположена полость, на краях которой располагаются аминокислотные остатки, формирующие активный центр [6]. Антитела, блокирующие активный центр, могут обладать нейтрализующей активностью за счёт подавления способности вируса открепляться от своих собственных рецепторов на заражённой клетке путём разрушения  $\alpha$ -кето-связи между концевой N-ацетилнейраминовой кислотой и соседним углеводным остатком на рецепторе (сиаловой кислоте), образовавшем комплекс с вирусным гемагглютинином. Помимо этого, антитела к нейраминидазе могут вызывать антитело-индуцированную цитотоксичность, распознавая клетки, экспрессирующие вирусные белки на поверхности цитоплазматической мембраны.



**Рисунок.** Результаты работы алгоритма PentaFOLD 3.0 над трёхмерными структурами нейраминидазы вируса гриппа H1N1 (а) и H5N6 (б). Стабильные фрагменты элементов вторичной структуры обозначены зелёным, мета-стабильные – жёлтым, нестабильные – красным; цифрами 1 – 5 обозначены обсуждаемые в тексте бета-тяжи

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

Ниже приведено сравнение трёх структурно стабильных бета-тяжей между нейраминидазой вирусов гриппа H1N1 и H5N6.

Бета-тяж 210-ITDT-214 у H1N1 является полностью стабильным (обозначен цифрой 1 на рисунке), но ему у H5N6 соответствует бета-тяж 132-RPVTEIP-138, в котором только один остаток является мета-стабильным, а все остальные – нестабильными. При сохранении практически идентичной вторичной структуры, сходство между аминокислотными последовательностями этих бета-тяжей практически отсутствует.

Бета-тяж 312-YQIGY-316 у H1N1 включает два мета-стабильных остатка и три стабильных (обозначен цифрой 2 на рисунке). Бета-тяж 233-THTSKY-238 у H5N6 включает три стабильных остатка, один мета-стабильный и всего два нестабильных. Несмотря на то, что эти два относительно стабильных бета-тяжа соответствуют друг другу на трёхмерных структурах N1 и N6, антитела к одному из них точно не смогут распознать другой по причине отсутствия сходства в аминокислотных последовательностях.

Длинный бета-тяж 392-IKQDIVGINEW-403 у H1N1 включает пять стабильных, три мета-стабильных и только три нестабильных С-концевых остатка (обозначен цифрой 3 на рисунке). Ему соответствует бета-тяж 314-SHQIVNNQNW-324 у H5N6, в котором три остатка стабильны, один мета-стабилен, а остальные семь являются нестабильными. Хотя четыре остатка в этих бета-тяжах консервативны (выделены жирным подчёркнутым шрифтом), вероятность воспроизведения вторичной структуры для бета-тяжа из N6 низка, так как образующий с ним бета-шпильку бета-тяж крайне нестабилен.

Помимо бета-тяжей, иммуногенными в составе пептида могут быть и петли. Однако для воспроизведения своей структуры петле желательно находиться между двумя стабильными бета-тяжами и быть достаточно консервативной. Консервативным фрагментом обладает петля 430-RPKENTIW-438, «нависающая» над активным центром нейраминидазы H1N1. Ей соответствует петля 353-RPKESSVLW-361 фермента вируса штамма H5N6. Бета-тяж, обращённый «внутри» полости, образующей активный центр нейраминидазы (обозначен цифрой 4 на рисунке), ещё более консервативен: 419-RPCFWVELIRG-429 у H1N1 и 344-CFYVELIRG-352 у H5N6. Второй бета-тяж в шпильке (обозначен цифрой 5 на рисунке) имеет менее консервативную аминокислотную последовательность: 439-TSGSSISFCGV-449 у H1N1 и 362-TSNSIVALCGS-372 у H5N6.

В целом вся бета-шпилька, образованная бета-тяжами, обозначенными цифрами 4 и 5 на рисунке, у H1N1 включает девять стабильных остатков и девять мета-стабильных, бета-шпилька у H5N6 включает шесть стабильных и девять мета-стабильных остатков. У нейраминидаз обоих штаммов вируса между этими бета-тяжами существуют не только водородные связи и гидрофобные взаимодействия, но и дисульфидная связь. В связи с этим целесообразным представляется синтез вакцинного пептида с дисульфидной связью между N-концевым и С-концевым остатками цистеина, соответствующего фрагменту

нейраминидазы H5N6 с аминокислотной последовательностью: CFYVELIRGRPKESSVLWTSNSIVALC. Этот пептид (сокращённо – CC27) также можно будет конъюгировать с белком-носителем через сульфгидрильные группы концевых остатков цистеина.

Можно рассчитывать на то, что иммунизация пептидом CC27 заставит «проснуться» В-клетки, содержащие гены, кодирующие антитела, выработанные к линейному эпитопу «IRGRPKE», экспонированному водному окружению, общему для обоих типов нейраминидазы. Перспективным в плане «пробуждения» ранее выработанных клонов В-клеток является и линейный эпитоп «WTSNS», расположенный у основания петли, также доступный растворителю, образующий конформационный эпитоп с упомянутой выше последовательностью. Антитела, способные распознать этот эпитоп, могут быть способными к стерическому блокированию активного центра нейраминидазы, тем самым препятствуя работе фермента. Нельзя не отметить, что известны несколько трёхмерных структур комплексов нейраминидазы с антителом, в которых фрагмент последнего взаимодействует с интересующей нас областью, закрывая активный центр фермента (PDB ID: 6Q23, 6LXI, 6LXJ, 6LXK, 6PZE, 6V4N). На этих структурах одна из петель антиген-связывающего домена антитела «врывается» внутрь полости, образующей активный центр нейраминидазы [7].

**Заключение.** Осуществлён дизайн вакцинного пептида из нейраминидазы птичьего вируса гриппа H5N6. Его аминокислотная последовательность: CFYVELIRGRPKESSVLWTSNSIVALC.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № X22КИ-022.

### Список литературы

1. From original antigenic sin to the universal influenza virus vaccine / C. Henry [et al.] // Trends. Immunol. – 2018. – Vol. 39. – P. 70-79.
2. Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination / J. S. Turner [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 586. – P. 127-132.
3. Human exposures to H5N6 avian Influenza, England, 2018 / A. C. Thornton [et al.] // J. Infect. Dis. – 2019. – Vol. 220. – P. 20-22.
4. Khrustalev, V. V. The PentaFOLD 3.0 algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides / V. V. Khrustalev // Protein Pept. Lett. – 2021. – Vol. 28. – P. 573-588.
5. Molecular characterizations of surface proteins hemagglutinin and neuraminidase from recent H5Nx avian Influenza viruses / H. Yang [et al.] // J. Virol. – 2016. – Vol. 90. – P. 5770-5784.
6. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase / D. Stadlbauer [et al.] // Science. – 2019. – Vol. 366. – P. 499-504.

7. Structure-based modification of an anti-neuraminidase human antibody restores protection efficacy against the drifted Influenza virus / H. Jiang [et al.] // mBio. – 2020. – Vol. 11. – P. 2315-2320.

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ И ЗАНЯТИЯ СПОРТОМ

**Чиркин А.А.**

*д. м. н., профессор кафедры химии и естественнонаучного образования  
учреждения образования «Витебский государственный университет имени  
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
chir@tut.by*

**Степанова Н.А.**

*к. б. н., доцент кафедры химии и естественнонаучного образования  
учреждения образования «Витебский государственный университет имени  
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
nadezhda-stepanova-52@mail.ru*

**Чиркина А.А.**

*к. б. н., доцент кафедры информационных технологий и управления  
бизнесом учреждения образования «Витебский государственный университет  
имени П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
channa@tut.by*

*В статье обсуждается возможность совершенствования алгоритма выявления метаболического синдрома посредством замены или дополнения первого просеивающего критерия (индекс массы тела) на процент жировой составляющей тела. Минимально допустимый уровень ХС ЛПВП поставлен на второе место как просеивающий тест. У спортсменов с низким ХС ЛПВП проявляются признаки нарушений функционального состояния печени, почек, водного обмена, сердечно-сосудистой системы. У небольшой части спортсменов с низким уровнем ХС ЛПВП проявляются нарушения транспорта энергоемких молекул – глюкозы и триацилглицеролов, т.е. проявляются признаки инсулинорезистентности.*

**Ключевые слова:** метаболический синдром; алгоритм; спорт; ЛПВП

## METABOLIC SYNDROME AND EXERCISE

**Chirkin A.A.**

*Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Chemistry and  
Natural Science Education of the Educational Institution "Vitebsk State University  
named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus  
chir@tut.by*

**Stepanova N.A.**

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of  
Chemistry and Natural Science Education of the Educational Institution "Vitebsk  
State University named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus  
nadezhda-stepanova-52@mail.ru*

**Chirkina A.A.**



*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Information Technologies and Business Management of the Educational Institution "Vitebsk State University named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus  
channa@tut.by*

*The article discusses the possibility of improving the algorithm for detecting metabolic syndrome by replacing or supplementing the first screening criterion (body mass index) with the percentage of body fat. The minimum acceptable level of HDL cholesterol is ranked second as a sieve test. Athletes with low HDL cholesterol show signs of violations of the functional state of the liver, kidneys, water metabolism, and the cardiovascular system. A small proportion of athletes with low levels of HDL cholesterol show impairments in the transport of energy-intensive molecules - glucose and triacylglycerols, i.e. signs of insulin resistance appear.*

**Key words:** *metabolic syndrome; algorithm; sport; HDL*

**Введение.** Экспериментальными и клиническими исследованиями было доказано, что развитие инсулинорезистентности связано с окислительным стрессом на фоне недостаточности антиоксидантных систем [1,2]. Метаболический синдром (МС) может быть причиной внезапной смерти человека в состоянии видимого здоровья. Поэтому исследования молекулярных механизмов развития МС являются актуальным. Расшифровку биохимических механизмов развития и создания строгих критериев выявления МС следует рассматривать как биологическую проблему, поскольку возникновение компонентов этого синдрома тесно сопряжено с общими негативными явлениями урбанизации общества. Распространенность МС составляет 25–35% населения. Метаболический синдром является одной из важнейших причин нарушения здоровья, связанного с отходом от принципов здорового образа жизни, в том числе при регулярных экстремальных физических нагрузках [3]. В соответствии с Государственной программой развития физической культуры и спорта в Республике Беларусь на 2016 – 2020 годы количество лиц, занимающихся физической культурой и спортом, достигло 25% от общей численности населения. Поэтому требуется не затратный, но объективный контроль эффективности выполнения такой программы.

**Материал и методы.** Под наблюдением было 1594 человека, в том числе 415 женщин и 1179 мужчин. Все наблюдаемые лица систематически использовали дозированные физические нагрузки, занимаясь физической культурой или различными видами спорта. В работе применен пятиэтапный алгоритм выявления метаболического синдрома [4]: 1. Отбирают обследуемых лиц с повышенными величинами индекса массы тела (ИМТ). 2. Затем отбирают обследуемых лиц с уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) <0,9 ммоль/л у мужчин и ХС ЛПВП <1,2 ммоль/л у женщин). 3. Из оставшихся обследуемых отбираются лица с гипергликемией (уровень глюкозы сыворотки >5,55 ммоль/л). 4. Среди лиц с тремя элементами метаболического

синдрома выделяются пациенты с уровнем триацилглицеролов (ТГ)  $>1,8$  ммоль/л. 5. И, наконец, отбирают пациентов, у которых выставлен диагноз «артериальная гипертензия» (АГ) [4]. О составе тела обследуемых лиц судили по результатам биоэлектрического импедансного анализа, проводимого с помощью аппарата BODY Analyzer 2040 (Италия). Оценка функционального состояния спортсменов осуществлялась аппаратно–программным комплексом «Омега–С», предназначенным для оперативного контроля физического состояния спортсменов в тренировочном процессе и в период подготовки к соревнованиям.

**Результаты и обсуждение.** При анализе индекса массы тела установлено, что состояние гипотрофии выявлено у юношей чаще в 6,4 раза и у девушек – в 10,3 раза, по сравнению с взрослыми спортсменами. Нормальная масса тела выявлена у достаточно близкого количества юношей и взрослых спортсменов-мужчин, но у девушек нормальная масса тела встречается в 1,5 раза реже по сравнению с взрослыми. Избыточная масса тела зарегистрирована в 3,5 раза чаще у взрослых спортсменов-мужчин по сравнению с подростками; у взрослых женщин-спортсменов избыточная масса тела встречается всего лишь в 1,5 раза чаще по сравнению с подростками. И, наконец, индекс массы тела диапазона «ожирение» характерен, в основном, для взрослых мужчин-спортсменов.

При использовании разработанного алгоритма оказалось, что отбор спортсменов с факторами риска МС практически завершается после двух первых этапов. Установлено, что в пересчете на 1000 обследуемых среди юношей-спортсменов можно выявить 17 человек с двумя факторами риска МС и 8 человек – с тремя факторами риска МС; у взрослых мужчин-спортсменов удастся выделить 16 человек с двумя факторами риска и 2 человека с тремя факторами риска. Среди девушек-спортсменок 18 человек имели два фактора риска МС и 4 человека три фактора риска МС; среди взрослых женщин-спортсменок был выделен 21 человек с двумя факторами риска. Эти данные показывают, что показатель ХС ЛПВП является важнейшим этапом скрининга метаболического синдрома у спортсменов. Но диапазоны скрининга «избыточная масса тела» и «ожирение» у спортсменов могут зависеть от соотношения безжировой массы тела (мышцы) и жира. Анализ показал, что диапазону «избыточная масса тела» соответствует доля жира 23%. Среди 297 взрослых спортсменов-мужчин 51 человек имел долю жира более 23% (примерно 17% от обследованных), ХС ЛПВП менее 0,9 ммоль/л был выявлен у 5 спортсменов (примерно 2% от всей группы и 10% - от лиц с повышенным содержанием жира) и из них у одного спортсмена была выявлена гипергликемия. Если ужесточить алгоритм и считать чаще всего встречаемую у спортсменов норму жировой составляющей тела в 15%, то из 297 спортсменов у 220 человек имеется повышенная масса тела (74%), из них у 11 человек выявлена гипо-альфа-холестеролемиа (примерно 4% от всей группы и 5% от лиц с избытком жира) и у двух спортсменов выявлена гипергликемия, сочетающаяся с гипер-триацилглицеролемией. Исходя из вышеизложенного, совершенствование алгоритма выявления метаболического

синдрома, может быть связано с заменой первого просеивающего критерия (индекс массы тела, окружность талии и бедер) на компоненты состава тела человека. Из анализа корреляционных зависимостей между величинами индекса массы тела и показателями состава тела спортсменов мужчин и женщин следуют два важных заключения: 1) половые различия заключаются в том, что у женщин существенно выше отрицательная корреляционная зависимость между величиной ИМТ и безжировой массой тела, а также тесная корреляционная зависимость между ИМТ и массой жира; 2) по всей видимости, систематические занятия физическими нагрузками вызывают у спортсменов независимо от пола одинаковые по силе корреляционные зависимости между ИМТ, с одной стороны, и общей и внутриклеточной водой, с другой.

Предложен возможный путь развития метаболического синдрома у спортсменов: увеличение массы тела за счет жировой составляющей; активация эндогенных антиоксидантов (у девушек повышение содержания билирубина, у юношей - мочевой кислоты); нарушение систем гомеостаза (у девушек изменение транспорта железа, у юношей недостаточность ХС ЛПВП); нарушения фильтрационной функции почек, печени, водно-солевого обмена; у женщин нарушение функциональных показателей реактивности организма, у мужчин проявления проатеросклеротических изменений транспорта липидов.

Исследование биохимических показателей обмена веществ в общей популяции жителей Витебской области показало, что у мужчин по сравнению с женщинами повышены все показатели, за исключением общего белка и активности альфа-амилазы, а содержание ХС ЛПВП у мужчин оказалось ниже, чем у женщин [5]. По сравнению с общей популяцией у спортсменов независимо от пола оказались повышенными содержание креатинина, общего билирубина, активности креатинфосфокиназы и сниженными уровни общего белка, активности аланин-аминотрансферазы и альфа-амилазы. Половые различия биохимических показателей у спортсменов по сравнению с общей популяцией были следующими: повышение общего холестерина у женщин и снижение у мужчин; снижение ХС ЛПВП у женщин; повышение триацилглицеролов у женщин и снижение у мужчин; повышение величины индекса атерогенности у женщин и отсутствие изменений у мужчин; снижение активности аспартат-аминотрансферазы у женщин и отсутствие изменений у мужчин; снижение гамма-глутамилтрансферазы у мужчин и отсутствие изменений у женщин. Рассматривая эти данные применительно к технологиям выявления метаболического синдрома, следует отметить, что женщины-спортсменки по сравнению с мужчинами-спортсменами имеют большую вероятность выявления гипергликемии, снижению ХС-ЛПВП и повышению триацилглицеролов, т.е. основных просеивающих показателей верификации метаболического синдрома.

**Заключение.** Анализ распространенности индекса массы тела среди спортсменов показал, что занятия спортом в подростковом периоде сопряжены с более частым выявлением гипотрофии. Систематические занятия спортом в этом

периоде приводят к дополнительным изменениям метаболизма, его регуляции и функционального состояния организма подростка. Поэтому необходимы комплексные биохимические и функциональные исследования, позволяющие получить наиболее адекватное представление о развитии адаптационных процессов в организме спортсменов подросткового периода. Среди взрослых спортсменов существенно больше мужчин, которые относятся к диапазонам «избыточная масса тела» и «ожирение». Эти диапазоны массы тела являются первым просеивающим этапом оригинального алгоритма выявления метаболического синдрома. Но к этим диапазонам могут относиться как спортсмены с увеличенной массой мышечной ткани, так и лица на этапе развивающегося метаболического синдрома. Поэтому в статье обсуждается возможность совершенствования алгоритма выявления метаболического синдрома посредством замены или дополнения первого просеивающего критерия (индекс массы тела, окружность талии и бедер) на компоненты состава тела человека (процент жировой составляющей тела). В статье обсуждена важная роль показателя холестерол липопротеинов высокой плотности, поскольку ЛПВП являются важным компонентом эндогенной антиоксидантной системы, обеспечивают обратный транспорт холестерина, играют центральную роль в поддержании гомеостаза холестерина, необходимого для синтеза желчных кислот, глюкокортикоидов, минералокортикоидов, прогестерона, мужских и женских половых гормонов, витамина D. Исходя из этого, минимально допустимый уровень ХС ЛПВП поставлен на второе место как просеивающий тест. У спортсменов с низким ХС ЛПВП проявляются признаки нарушений функционального состояния печени, почек, водного обмена, сердечно-сосудистой системы. У небольшой части спортсменов с низким уровнем ХС ЛПВП проявляются нарушения транспорта энергоемких молекул – глюкозы и триацилглицеролов, т.е. проявляются признаки инсулинорезистентности.

### Список литературы

1. Bisbal, C. Antioxidants and glucose metabolism disorders / C. Bisbal, K. Lambert, A. Avignon // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2010. – Vol.13 (4). – P. 439-446.
2. Микаелян, Н.П. Активность процесса перекисного окисления липидов и состояние системы антиоксидантной защиты у больных сахарным диабетом 2-го типа / Н.П. Микаелян, И.О. Кулаева, А.Е. Гурина [и др.] // *Вопр. биол. мед. фарм. хим.* – 2013. – №4. – С. 64-68.
3. Чазова И.Е., Мычка В.Б. *Метаболический синдром.* – М.: Медиа Медика, 2004. – 168 с.
4. Степанова, Н.А. Создание и апробация алгоритма выявления метаболического синдрома X / Н.А. Степанова // *Вестник ВГМУ.* – 2006. – Т.5, №2. – С. 37-42.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

5. Чиркин, А.А. Физиологические значения лабораторных тестов у населения Республики Беларусь: справочное пособие / А.А. Чиркин, А.А. Chirkin, Э.А. Доценко, В.С. Камышников и др.: под редакцией В.С. Улащика. – Минск: Адукацыя і выхаванне, 2010. - 88 с.

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ  
ЗАНЯТИЯХ СПОРТОМ В ПУБЕРТАТНОМ ВОЗРАСТЕ**

**Чиркин А.А.**

*д. м. н., профессор кафедры химии и естественнонаучного образования  
учреждения образования «Витебский государственный университет имени  
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
chir@tut.by*

**Степанова Н.А.**

*к. б. н., доцент кафедры химии и естественнонаучного образования  
учреждения образования «Витебский государственный университет имени  
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
nadezhda-stepanova-52@mail.ru*

**Чиркина А.А.**

*к. б. н., доцент кафедры информационных технологий и управления  
бизнесом учреждения образования «Витебский государственный университет  
имени П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
channa@tut.by*

**Алтани Мершид Сулеман,**

*аспирант кафедры химии и естественнонаучного образования  
учреждения образования «Витебский государственный университет имени  
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь  
morshedaltany12345@gmail.com*

*Установлены биохимические показатели сыворотки крови, уровень которых поддерживается на постоянном уровне в пубертатном возрасте независимо от пола и типа дозированных физических нагрузок – общий белок, ХС ЛПВП, индекс атерогенности, отношения Глю/ХС ЛПВП и КФК/ЩФ. Дозированные физические нагрузки у подростков мужского пола в возрастной группе 12-15 лет ускоряют изменения содержания мочевины, глобулинов, триглицеридов, калия, активности ГГТ и величины отношения А/Г до уровня подростков контрольной подгруппы 16–18 лет, что указывает на развитие адаптационных процессов. У девушек в этой возрастной группе дозированные физические нагрузки снижают содержание глюкозы, альбуминов, ХС ЛПНП, активности щелочной фосфатазы и отношения АсАТ/АлАТ – что может указывать на биохимические признаки напряжения обмена веществ. В этом возрастном периоде подростки часто не могут преодолеть норматив квалификации «мастер спорта» из-за особенностей обмена веществ, условно обозначенных «биохимическим выгоранием».*

**Ключевые слова:** пубертатный возраст; спорт; биохимические показатели; гендерные различия

**BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD SERUM DURING  
SPORTS EXERCISES AT THE AGE OF PUBERTY**

**Chirkin A.A.**

*Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the Educational Institution "Vitebsk State University named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus  
chir@tut.by*

**Stepanova N.A.**

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the Educational Institution "Vitebsk State University named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus  
nadezhda-stepanova-52@mail.ru*

**Chirkina A.A.**

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Information Technologies and Business Management of the Educational Institution "Vitebsk State University named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus  
channa@tut.by*

**Altani Mershid Suleman**

*post-graduate student of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the educational establishment "Vitebsk State University named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus  
morshedaltany12345@gmail.com*

*Biochemical parameters of blood serum were established, the level of which is maintained at a constant level at puberty, regardless of gender and type of dosed physical activity - total protein, HDL cholesterol, atherogenic index, Glu / HDL cholesterol and CPK / ALP ratios. Dosed physical activity in male adolescents in the age group of 12-15 years accelerates changes in the content of urea, globulins, triglycerides, potassium, GGT activity and the value of the A / G ratio to the level of adolescents in the control subgroup 16-18 years old, which indicates the development of adaptation processes. In girls in this age group, dosed physical activity reduces the content of glucose, albumin, LDL cholesterol, alkaline phosphatase activity and the AsAT / ALAT ratio - which may indicate biochemical signs of metabolic stress. In this age period, adolescents often cannot overcome the qualification standard "master of sports" due to the peculiarities of metabolism, conventionally designated "biochemical burnout".*

**Key words:** *puberty; sport; biochemical indicators; gender differences*

**Введение.** В консенсусном заявлении Международного олимпийского комитета по спортивному развитию молодежи, включающем основные принципы развития спорта, указано на необходимость эффективно проводить лабораторные испытания для стимуляции участия молодежи в спорте с целью достижения спортивных результатов [1]. В многоцентровом европейском

исследовании Helena-CSS (The Healthy Lifestyle by Nutrition in Adolescence Cross-Sectional Study) при исследовании 3528 подростков 12,5-17,5 лет в 10 городах 9 европейских стран был изучен кардиометаболический риск и был сделан вывод, что физическая активность является наиболее значимым способом защиты подростков от сердечнососудистой патологии [2]. Половое созревание (пубертатный период, пубертат) – процесс изменений в организме подростка, вследствие которых он становится взрослым и способным к продолжению рода. В этом периоде прирост массы тела для подростков мужского пола составляет в среднем 35 кг, а у подростков женского пола – 25 кг. В периоде пубертата прирост длины тела у мальчиков составляет в среднем 36,3 см и замедляется к 14 годам, а у девочек на 2 года раньше (увеличение роста на 24,5 см с годовыми колебаниями от 6 см до 10,5 см). Однако плато роста мышечной массы и силы наступает у мальчиков примерно на 2 года раньше по сравнению с девочками. Физические упражнения ускоряют формирование костно-мышечной системы и могут способствовать увеличению безжировой массы тела. Считают, что к 12 годам большинство детей физически и когнитивно способны решать сложные задачи, возникающие при занятиях различными видами спорта и при участии в соревнованиях [3, 4].

Цель исследования – изучить особенности возрастной динамики биохимических показателей сыворотки крови у лиц пубертатного возраста при систематических и контролируемых воздействиях физических нагрузок.

**Материал и методы.** Исследования проводились на базах Витебского областного диспансера спортивной медицины и Витебского областного диагностического центра в сертифицированных лабораториях на протяжении 2011–2019 годов в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (1964 г., с изменениями 1975–2008 годы), с учетом международных норм и стандартов, а также закона Республики Беларусь «О здравоохранении» от 18.06.1993 г. №2435-ХІІ, статья 46. Под наблюдением было 1245 подростков, из них 375 – женского пола (49 – контрольная группа и 326 – спортсмены) и 870 подростков мужского пола (144 – контрольная группа и 726 – спортсмены). В контрольную группу включены лица, приступившие к занятиям спортом, но не получившие спортивной квалификации, что отвечает формированию более адекватных контрольных групп для сравнения с группой спортсменов. Различия в спортивной нагрузке контрольных групп и спортсменов определены как «тип физических нагрузок».

В сыворотке крови подростков определяли содержание глюкозы (Глю) (глюкозооксидазный метод), триглицеридов (ТГ) и общего холестерина (ОХС) (метод СНОД-РАРэнзиматический), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) (прямой ферментативный метод), мочевины (уреазный кинетический метод), калия (тетрафенилборатный метод с осаждением), кальция



(преципитация с карбонатом магния) – эти показатели выражали ммоль/л; общего белка (биуретовый метод), альбумина (А) (с бромкрезоловым зеленым) и глобулинов (Г) – выражали их в г/л; общего и прямого билирубина (метод Йендрашека-Грофа), мочевой кислоты (МК) (уриказный метод), креатинина (реакция Яффе без депротенинизации), железа сывороточного (метод Nitro-RAPS), общей железосвязывающей активности (ОЖСС) (арсенатный метод) – выражали их мкмоль/л; оценивали активность аланин- и аспартат-аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) (метод IFCC), щелочной фосфатазы (ЩФ) (с DEA-буфером), альфа-амилазы (кинетический метод с CNPG<sub>3</sub>), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) (метод с 3-карбоксинитроанилидом), креатинфосфокиназы (КФК) (метод DOKS) – выражали их в МЕ/л. В работе использованы наборы фирмы BioSystems (Spain) и анализатор Mindray (Китай). Рассчитывали индекс атерогенности (ИА) – (ОХС–ХС ЛПВП/ХС ЛПВП) и коэффициенты А/Г, АсАТ/АлАТ, КФК/АсАТ, глюкоза/ОХС (Глю/ОХС), глюкоза/ХС ЛПВП (Глю/ХС ЛПВП), КФК/ЩФ, глюкоза/ХС ЛПНП (Глю/ХС ЛПНП), которые выражали в условных единицах, поскольку в числителе и знаменателе отношений были одинаковые размерности (г/л, МЕ/л, ммоль/л). Статистическую обработку цифрового материала производили методами непараметрической статистики (Statistica 10.0, PASW Statistics 18).

**Полученные результаты и обсуждение.** В процессе выполнения работы были получены результаты, которые можно сгруппировать в четыре пункта. Во-первых, удалось установить неизменяемые биохимические показатели здоровья в периоде пубертата (контроль): показатели, которые не изменяются у обследованных подростков контрольных групп независимо от возраста и пола (индекс атерогенности, ХС ЛПНП, альфа-амилаза, железо и коэффициент Глюкоза/ХС ЛПВП); показатели, которые не изменяются у подростков мужского пола (глюкоза, альбумин, коэффициент АсАТ/АлАТ); показатели, которые не изменяются у подростков женского пола (мочевина, креатинин, общий белок, альбумин, ХС ЛПВП, триглицериды, ХС ЛПНП, АлАТ, КФК, кальций, ОЖСС, калий, коэффициенты КФК/АсАТ, Глю/ХС ЛПНП). Во-вторых, установлены неизменяемые биохимические показатели здоровья в периоде пубертата у спортсменов: показатели, которые не изменяются у обследованных подростков-спортсменов независимо от возраста и пола (индекс атерогенности, общий белок, ХС ЛПВП, коэффициенты Глюкоза/ХС ЛПВП и КФК/ЩФ); показатели, которые не изменяются у обследованных подростков-спортсменов мужского пола (глюкоза, общий билирубин, ОХС, ЛПНП и коэффициент Глюкоза/ОХС); показатели, которые не изменяются у обследованных подростков-спортсменов женского пола (креатинин, триглицериды, кальций, калий, сывороточное железо, активность АлАТ, КФК, ГГТ, альфа-амилаза, ОЖСС, коэффициенты КФК/АсАТ, Глюкоза/ХС ЛПВП и КФК/ЩФ). В-третьих, установлены возможные изменения у спортсменов в диапазоне квалификаций «юношеский разряд – мастер спорта» в возрасте 12-15 лет: повышение показателей у

подростков – спортсменов обоего пола (ИМТ, активность АсАТ, коэффициент Глю/ЛПНП); снижение показателей у подростков – спортсменов обоего пола (ОЖСС); повышение показателей у спортсменов (содержание мочевины и триглицеридов, активность альфа-амилазы); снижение показателей у спортсменов (содержание кальция, коэффициент А/Г); снижение показателей у спортсменок (активность щелочной фосфатазы). В возрастном периоде 12-15 лет подростки часто не могут преодолеть норматив квалификации «мастер спорта» из-за особенностей обмена веществ, условно обозначенных «биохимическим выгоранием». В-четвертых, выявлены возможные изменения у спортсменов в диапазоне квалификаций «юношеский разряд – мастер спорта» в возрасте 16-18 лет: противоположные по направленности изменения показателей у спортсменов и спортсменок (содержание ЛПНП, активность АсАТ и коэффициент Глю/ЛПНП); повышение показателей у спортсменов (содержание мочевины, креатинина, значения индекса атерогенности); снижение показателей у спортсменов (активность АлАТ, щелочной фосфатазы, креатинфосфокиназы, коэффициент КФК/АсАТ); повышение показателей у спортсменок (содержание общего билирубина, коэффициент Глю/ОХС); снижение показателей у спортсменок (содержание ОХС).

**Заключение.** Изменения в биохимических показателях, сохраняющихся в пубертатном периоде на постоянном уровне у подростков контрольных групп и у подростков, привлеченных к занятиям дозированными физическими нагрузками, могут сигнализировать о нарушениях обмена веществ и процессов полового созревания. Такие показатели могут служить для целей коррекции условий протекания пубертата и коррекции нарушений, вызванными физическими нагрузками в рамках возрастной и клинической биохимии.

Исследованные в работе 8 представителей метабомики, 12 представителей протеомики, 3 неорганических биорегулятора и 8 относительных показателей для оценки взаимосвязей обмена веществ могут быть основой для дальнейшего детального протеомного и метаболомного профилирования сыворотки крови с целью выявления точных биохимических маркеров полового созревания и ответа организма подростков на физические воздействия. Для таких исследований требуется широкое внедрение методов капиллярного электрофореза, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрии, ЯМР и др. [5, 6].

### Список литературы

1. Bergeron, M.F. International Olympic Committee consensus statement on youth athletic development / M.F. Bergeron [et al.] // Br. J. Sports. Med. - 2015. - Vol. 49. - P. 843–851.
2. Cristi-Montero, C. Cardiometabolic risk through an integrative classification combining physical activity and sedentary behavior in European

adolescents: HELENA study / C. Cristi-Montero [et al.] // J.Sport Health Sci. – 2019. - Vol. 8, issue 1. – P. 55-62.

3. Brown, K.A. Participation in sports in relation to adolescent growth and development / K.A. Brown, D.R. Patel, D. Darmawan // Transl. Pediatr. - 2017. - Vol. 6, №3. - P. 150-159.

4. Julian-Almarcegui, C. Combined effects of interaction between physical activity and nutrition on bone health in children and adolescents: a systematic review / C. Julian-Almarcegui [et. al.] // Nutr. Rev.- 2015. - Vol. 73. №3. - P. 127-139.

5. Карцова, Л.А. Применение хроматографических и электрофоретических методов в метаболомных исследованиях / Л.А. Карцова, С.А. Соловьева // Журнал аналитической химии. – 2019. – Т. 74, №4. – С. 243-253.

6. Zheng, F. Development of a plasma pseudotargeted metabolomics method based on ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry/ F. Zheng [et al.] // Nat. Protoc. – 2020. – Vol. 15. – P. 2519–2537.

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС КАК  
ОТРАЖЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОРГАНИЗМ  
ИНГАЛЯЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВО-АНТИГЕННЫХ  
КОМПЛЕКСОВ ПЫЛИ СУХИХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ  
МОЛОКА**

**Шевляков В.В.**

*д. м. н., профессор, главный  
сотрудник лаборатории промышленной  
республиканского унитарного предприятия  
«Научно-практический центр гигиены», г. Минск, Беларусь,*

**Баранов С.А.**

*младший научный сотрудник лаборатории промышленной  
токсикологии республиканского унитарного предприятия  
«Научно-практический центр гигиены», г. Минск, Беларусь,  
mfantastikas1992@mail.ru;  
shev-vitaliy@mail.ru*

*Растворимые комплексы сывороточных и казеиновых белков молока при их экспериментальном ингаляционном воздействии на белых крыс только в высоких концентрациях (3,0 и 1,0 мг/м<sup>3</sup> по белку) проявляли дозозависимое токсическое действие на организм, которое отражают установленные однотипные сдвиги ряда изученных биохимических показателей крови опытных белых крыс, свидетельствующие о характерных нарушениях метаболических процессов и функционального состояния печени, активации показателей перекисного окисления липидов.*

***Ключевые слова:** комплексы растворимых сывороточных или казеиновых белков коровьего молока; модельное ингаляционное воздействие; биохимические показатели крови белых крыс*

**BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD IN WHITE RATS AS A  
REFLECTION OF TOXIC EFFECTS ON THE BODY INHALATION  
EXPOSURE OF PROTEIN-ANTIGENIC COMPLEXES OF DUST OF DRY  
MILK PROCESSING PRODUCTS**

**Shevlyakov V.V.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Scientific  
industrial toxicology laboratory worker  
republican unitary enterprise  
"Scientific and Practical Center for Hygiene", Minsk, Belarus,  
shev-vitaliy@mail.ru*

**Baranov S.A.**

*Junior Researcher, Industrial Laboratory  
toxicology of the republican unitary enterprise*

*"Scientific and Practical Center for Hygiene", Minsk, Belarus,  
mfantastikas1992@mail.ru;*

*Soluble complexes of whey and casein proteins of milk with their experimental inhalation effect on white rats only in high concentrations (3.0 and 1.0 mg/m<sup>3</sup> for protein) exhibited a dose-dependent toxic effect on the body, which reflects the established similar shifts in a number of studied blood biochemical parameters experienced white rats, indicating characteristic disorders of metabolic processes and functional state of the liver, activation of lipid peroxidation indicators.*

**Key words:** *complexes of soluble whey or casein proteins of cow's milk; model inhalation exposure; biochemical parameters of blood of white rats*

Для экспериментального обоснования гигиенических нормативов содержания в воздухе рабочей зоны пыли разнообразных сухих продуктов переработки коровьего молока (СППБ) весьма актуальным является выявление и оценка характера и механизмов дозозависимых общетоксических эффектов в организме белых крыс при ингаляционном воздействии комплексов сывороточных и казеиновых белков молока (СБМ и КБМ), выявленных по существенным сдвигам в биохимическом статусе опытных животных.

**Цель** – установить характерные проявления дозозависимого токсического действия комплексов сывороточных и казеиновых белков молока при ингаляционном поступлении в последовательно снижающихся концентрациях в организм белых крыс по сдвигам биохимических показателей крови.

**Материалы и методы исследования.** Экспериментальные исследования по гигиеническому нормированию пыли СППБ выполнялись в соответствии с требованиями методических указаний № 11-11-10-2002 [1]. У белых крыс после завершения ингаляционного воздействия в течение месяца полученными оригинальными методиками [2] концентратами растворимых комплексов СБМ и КБМ в последовательно снижающихся расчетных концентрациях на уровне 3,0-1,0-0,3-0,1 мг/м<sup>3</sup> по белку определяли в сыворотке крови комплекс биохимических показателей на автоматическом анализаторе «Ассент 200» (Польша), а также известными методами в гемолизате крови показатели системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты.

**Результаты.** Ингаляционное воздействие КБМ в концентрации на уровне 3,0 мг/м<sup>3</sup> по белку оказало выраженное общетоксическое действие на организм, проявляющееся у белых крыс 1 опытной группы значительным по сравнению с контрольной группой снижением в сыворотке крови содержания глюкозы (в 1,4 раза,  $p < 0,001$ ), тенденцией возрастания концентрации альбуминов (на 6,0 %,  $p < 0,1$ ) на фоне даже некоторого снижения на 5 % содержания общего белка, сопровождаемые возрастанием на 37,3 % ( $p < 0,01$ ) содержания железа, снижением соответственно на 45,8 % и 24,5 % концентрации общего и прямого билирубина ( $p < 0,05$ ). Азотистый

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,

Минск, 25 января 2022 г.

обмен в организме опытных животных характеризовался существенным увеличением в сыворотке крови содержания мочевины (на 31,5 %,  $p < 0,05$ ) при одновременном снижении на 28,8 % ( $p < 0,05$ ) содержания креатинина и более 5-тикратным снижением содержания мочевой кислоты ( $p < 0,01$ ) по сравнению с их средними величинами в контрольной группе белых крыс. Кроме того, у опытных белых крыс выявлено значимое угнетение обмена липидов, проявляющееся снижением по сравнению с контролем содержания в сыворотке крови триглицеридов на 46,3 % ( $p < 0,01$ ) и почти двукратным снижением холестерина ( $p < 0,001$ ), что отражает нарушение обезвреживающей и в целом метаболической функции печени. Нарушение функционального состояния гепатобилиарной системы и активацию метаболических процессов в организме животных 1 опытной группы также отражает значительное возрастание в сыворотке крови активности ферментов щелочной фосфатазы на 54,5 % ( $p < 0,01$ ), лактатдегидрогеназы на 53,7 % ( $p < 0,01$ ), аланинаминотрансферазы на 28,6 % ( $p < 0,1$ ), аспартатаминотрансферазы на 110,3 % ( $p < 0,05$ ) по отношению к таковым в контрольной группе животных. Кроме того, установлена активация в организме животных 1 опытной группы перекисного окисления липидов, что проявлялось существенным возрастанием в гемолизате крови на 62,0 % активности фермента глутатионредуктазы ( $p < 0,01$ ) с тенденцией увеличения на 39,6 % активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ( $p < 0,1$ ) с одновременным возрастанием на 30,8 % содержания SH-групп ( $p < 0,01$ ) и на 29,7 % глутатиона восстановленного ( $p < 0,05$ ) по сравнению с их средними уровнями у контрольных животных. Однако активность фермента супероксиддисмутазы в гемолизате крови опытных животных увеличилась незначительно. Снижение ингалируемой концентрации КБМ до 1,0 мг/м<sup>3</sup> по белку сопровождалось у опытных животных 2 группы формированием в основном однотипных по направленности, но менее выраженных сдвигов изученных морфофункциональных показателей организма. Также установлены значимое по сравнению с контрольной группой снижение содержания в сыворотке крови глюкозы (на 22,5 %,  $p < 0,01$ ), общего билирубина (на 55,5 %,  $p < 0,01$ ), мочевой кислоты (на 77,3 %,  $p < 0,05$ ) и креатинина (на 19,8 %,  $p < 0,05$ ), триглицеридов (на 51,4 %,  $p < 0,01$ ) и холестерина (на 53,8 %,  $p < 0,001$ ). Активация перекисного окисления липидов регистрировалась по возрастанию в гемолизате крови содержания SH-групп (на 22,3 %,  $p < 0,05$ ) и глутатиона восстановленного (на 24,0 %,  $p < 0,05$ ) на фоне увеличения на 44,6 % ( $p < 0,05$ ) активности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по отношению к контрольной группе. У опытных белых крыс после ингаляционного воздействия СБМ в высокой концентрации (3,0 мг/м<sup>3</sup> по белку) установлены менее распространенные и даже разнонаправленные сдвиги биохимических показателей крови по сравнению с воздействием КБМ. Так, в сыворотке крови опытных животных

регистрировали возрастание содержания глюкозы на 19 % ( $p < 0,05$ ) и общего белка на 29 % ( $p < 0,05$ ), однотипное увеличение активности ферментов лактатдегидрогеназы на 44,5 % ( $p < 0,001$ ), аланинаминотрансферазы на 18,3 % ( $p < 0,1$ ) и липазы ( $p < 0,001$ ) на фоне значимого снижения содержания железа на 8,31 % ( $p < 0,05$ ) и общего билирубина на 30,8 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с этими показателями в контрольной группе животных.

Сходные, но менее выраженные проявления токсического действия СБМ в ингалируемой концентрации на уровне  $1,0 \text{ мг/м}^3$  по белку отмечались и у белых крыс 2 опытной группы, у которых также выявлено значительное возрастание в сыворотке крови содержания глюкозы (на 22,8 %,  $p < 0,05$ ), существенное снижение содержания альбуминов (на 21,1 %,  $p < 0,05$ ) на фоне некоторого возрастания общего белка (на 24,2 %, но  $p > 0,05$ ), снижение уровня общего билирубина (на 27,3 %,  $p < 0,05$ ) и креатинина, снижение в гемолизате крови содержания только глутатион восстановленного (на 13,2 %,  $p < 0,1$ ) и SH-групп (на 13,4 %,  $p < 0,05$ ).

В концентрациях на уровне 0,3 и  $0,1 \text{ мг/м}^3$  по белку как КБМ, так и СБМ не вызывали в организме белых крыс существенных сдвигов всех изучаемых биохимических показателей крови по сравнению с контрольными группами животных.

Следовательно, ингаляционное воздействие КБМ и СБМ на организм в высоких концентрациях вызывало развитие у опытных животных ряда значимых токсических эффектов, которые отражали нарушения метаболических процессов и функционального состояния печени, активация перекисного окисления липидов на избыточное поступление белков молока, что, в общем, характерно для всех органических белоксодержащих аэрозолей как животного, так и растительного происхождения при их экспериментальном ингаляционном воздействии в высоких концентрациях по белку на лабораторных животных [3].

**Выводы.**

Растворимые комплексы сывороточных и казеиновых белков коровьего молока в ингалируемых высоких концентрациях вызывают в организме опытных белых крыс нарушения метаболических процессов и функционального состояния печени, активацию ПОЛ, отражающие токсическое действие, что следует учитывать при гигиеническом нормировании содержащих их пыли СППМ.

### **Список литературы**

1. Требования к постановке токсиколого-аллергологических исследований при гигиеническом нормировании белоксодержащих аэрозолей в воздухе рабочей зоны : метод. указания № 11-11-10-2002 / В. В. Шевляков [и др.] / М-во здравоохран. Респ. Беларусь // Сборник офиц. документов по медицине труда и производственной санитарии. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – Ч. XIV. – С. 4–49.

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,

Минск, 25 января 2022 г.

2. Методы получения экстрактов-аллергенов из пыли сухих продуктов переработки молока, пригодных для токсиколого-аллергологических исследований / С. А. Баранов [и др.] // Здоровье и окружающая среда : матер. междунар. науч.-практ. конф., 14-15 ноября 2019 г., г. Минск / редкол. С. И. Сычик (гл. ред.), Н. В. Дудчик (зам. гл. ред.) [и др.]. – Минск : РИВШ, 2019. – С. 380–382.

3. Шевляков, В. В. Влияние на биохимические показатели крови лабораторных животных субхронического ингаляционного воздействия белоксодержащих субстанций органической пыли / В. В. Шевляков, С. А. Баранов, Т. И. Крыж // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тезисы докл. Междунар. науч. конф., посвящ. 75- летию со дня рождения проф. Е. В. Барковского (Минск, 21 мая 2021 г) / под ред. В. В. Хрусталёва, А. Д. Тагановича, Т. А. Хрусталёвой. – Минск: БГМУ, 2021. – С. 352-354.



**КОМБИНАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ И ЦИНКА АСПАРТАТА  
УВЕЛИЧИВАЕТ ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО НЕЗАМЕНИМЫХ  
АМИНОКИСЛОТ В ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШКАХ**

**Шейбак В.М.**

*д. м. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии им.С.И.Гельберга учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет», г.Гродно, Беларусь  
vsheibak@gmail.com*

**Павлюковец А.Ю.**

*к. б. н., доцент, заведующий отделом государственного учреждения здравоохранения «Гродненский областной центр трансфузиологии», г.Гродно, Беларусь  
anastasiayk@mail.ru*

**Смирнов В.Ю.**

*к. б. н., доцент, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет», г.Гродно, Беларусь  
vit\_sm@mail.ru*

*В данной статье рассмотрены особенности формирования аминокислотного фонда пейеровых бляшек после курсового введения интактным животным комбинации аминокислот и цинка аспартата, показано, что введение аминокислотной композиции изменяет общее количество незаменимых аминокислот, в том числе АРУЦ (изолейцин, лейцин, валин) в пейеровых бляшках.*

**Ключевые слова:** пейеровы бляшки; цинк; аминокислоты

**COMBINATION OF AMINO ACIDS AND ZINC ASPARTATE  
INCREASES THE TOTAL AMOUNT OF NON-REPLACEABLE  
AMINO ACIDS IN PEYER'S PLACES**

**Sheibak V.M.**

*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after S.I. Gelberg, educational institution "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus  
vsheibak@gmail.com*

**Pavlyukovets A.Yu.**

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of the State Healthcare Institution "Grodno Regional Center of Transfusiology", Grodno, Belarus  
anastasiayk@mail.ru*

**Smirnov V.Yu.**

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Senior  
Researcher of the Research Laboratory of the Educational Institution "Grodno  
State Medical University", Grodno, Belarus  
vit\_sm@mail.ru*

*This article discusses the features of the formation of the amino acid pool of Peyer's patches after course administration of a combination of amino acids and zinc aspartate to intact animals; it is shown that the introduction of an amino acid composition changes the total amount of essential amino acids, including ARUC (isoleucine, leucine, valine) in Peyer's patches.*

**Key words:** *Peyer's patches; zinc; amino acids*

Кишечник является самым большим иммунным органом человеческого организма: около 80% всех иммунокомпетентных клеток локализовано в слизистой оболочке кишечника (25% клеток являются иммунологически активными). Иммунная система кишечника является частью общей иммунной системы организма человека и в то же время отличается определенной автономностью. Главной ее задачей является распознавание и устранение антигенов или формирование иммунологической толерантности к ним [1].

Белковая недостаточность снижает интенсивность иммунного ответа и повышает восприимчивость к инфекции. Аминокислоты являются энергетическими субстратами для клеток иммунной системы, а также выполняют ряд других жизненно важных функций. Очевидно, что адекватная обеспеченность аминокислотами имеет важное значение для функционирования иммунной системы. Активация иммунного ответа сопровождается перепрограммированием метаболизма и переключением производства цитокинов с провоспалительного на противовоспалительные типы. Обеспеченность аминокислотами играет роль иммуномодулятора, обеспечивая оптимальное функционирование иммунной системы [2].

**Целью** исследования явился количественный и качественный анализ свободных аминокислот в пейеровых бляшках крыс после курсового введения аминокислотной композиции, дополненной цинка аспартатом.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводились на беспородных крысах, которые в течение 10 суток получали внутрижелудочно комбинацию, состоящую из аминокислот (аргинин, таурин, триптофан) и цинка аспартата в дозе 500 мг/кг массы. Определение свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ в хлорнокислых экстрактах пейеровых бляшек кишечника.

**Результаты и выводы.** Введение комбинации, состоящей из аминокислот и цинка аспартата животным повышало в пейеровых бляшках общее количество незаменимых аминокислот (с  $1701 \pm 87$  до  $1976 \pm 43$  нмоль/г), аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ) (с  $668 \pm 37$  до  $788 \pm 20$  нмоль/г) и соотношение аргинин/цитруллин (с  $1,1 \pm 0,08$  до  $1,6 \pm 0,14$ ). Среди

индивидуальных показателей свободных аминокислот наиболее значительно повышались уровни гистидина (с  $116 \pm 4$  до  $133 \pm 4,5$  нмоль/г), аргинина (с  $173 \pm 11$  до  $204 \pm 5,6$  нмоль/г), триптофана (с  $35 \pm 1,5$  до  $44 \pm 2,3$  нмоль/г), изолейцина (с  $138 \pm 7,9$  до  $172 \pm 6,5$  нмоль/г) и лизина (с  $285 \pm 20,2$  до  $369 \pm 11,3$  нмоль/г). Одновременно в пейеровых бляшках снижались концентрации азотсодержащих метаболитов аминокислот  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты (с  $22 \pm 0,5$  до  $16 \pm 0,8$  нмоль/г), этаноламина (с  $647 \pm 56,7$  до  $460 \pm 41,1$  нмоль/г) и  $\beta$ -аминомасляной кислоты (с  $31 \pm 1$  до  $27 \pm 0,7$  нмоль/г).

Таким образом, введение аминокислотной композиции изменяет общее количество незаменимых аминокислот, в том числе АРУЦ (изолейцин, лейцин, валин) в пейеровых бляшках, что создает предпосылки для активации биосинтетических процессов.

### **Список литературы**

1. Kogut M.H. Microbiome and pathogen interaction with the immune system. / M.H. Kogut, A. Lee, E. Santin // *Poult Sci.* – 2020. – Vol.99,N4. – P.1906-1913.
2. Mucosal immunity-mediated modulation of the gut microbiome by oral delivery of probiotics into Peyer's patches. / S. Lin [et al] // *Sci Adv.* – 2021. – Vol.7. –P. 66.

**ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ТОНУСА СОСУДОВ ПРИ  
МОДЕЛИРОВАНИИ СТРЕССА У КРЫС**

**Яцковская Н.М.**

*Старший преподаватель кафедры нормальной физиологии  
Учреждения образования «Витебский государственный медицинский  
университет»  
г. Витебск, Беларусь  
makarukk@mail.ru*

*В статье представлен сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ и тонуса сосудов при моделировании острого и хронического иммобилизационного стресса, а также посредством введения инициатора окислительного стресса параквата у крыс. В сыворотке крови определяли 13 биохимических маркеров обмена веществ. Тонус сосудов изучали на изолированных кольцах аорты с помощью установки TISSUEBATH 4CHANSYS, (Biopacsystems, США). Статистическая обработка цифрового материала проводили с помощью программ STSTISTICA 6.0 и Graphpad Prism 4.0. В статье обоснованы функциональные и биохимические критерии острого и хронического иммобилизационного стресса у крыс.*

**Ключевые слова:** стресс; иммобилизация; паракват; крысы; сыворотка крови; биохимические показатели; тонус сосудов

**PECULIARITIES OF SUBSTANCE EXCHANGE AND VESSEL TONE  
IN MODELING STRESS IN RATS**

**Yatskovskaya N.M.**

*Senior Lecturer, Department of Normal Physiology Educational institutions  
"Vitebsk State Medical University"  
Vitebsk, Belarus  
makarukk@mail.ru*

*The article presents a comparative analysis of changes in metabolic parameters and vascular tone in the simulation of acute and chronic immobilization stress, as well as through the introduction of the oxidative stress initiator paraquat in rats. In the blood serum, 13 biochemical markers of metabolism were determined. Vascular tone was studied on isolated aortic rings using a TISSUEBATH 4CHANSYS device (Biopacsystems, USA). Statistical processing of digital material was performed using STSTISTICA 6.0 and Graphpad Prism 4.0 software. The article substantiates the functional and biochemical criteria of acute and chronic immobilization stress in rats.*

**Key words:** stress, immobilization, paraquat, rats, blood serum, biochemical parameters, vascular tone.

Стрессом называют совокупность неспецифических реакций организма на воздействие различных факторов-стрессоров [1]. В последние десятилетия сформировано представление о тканевом стрессе (тканевом адаптационном синдроме) как универсальной для всех тканей организма неспецифической адаптационной реакции, которая формируется в ткани в ответ на действие различных стрессоров. Процесс повреждения клетки в результате окисления называют окислительным стрессом за счет действия токсичных реактивных форм кислорода (гидроксильный радикал, пероксид водорода, супероксидный анион-радикал и др.) [2]. С химической точки зрения окислительный стресс представляет собой значительное увеличение клеточного редокс-потенциала или существенное снижение восстановительной способности клеточных редокс-пар типа окисленный/восстановленный глутатион. Если уровень реактивных форм кислорода превышает способность антиоксидантных систем клетки их обезвреживать, возникают нарушения энергетики и метаболизма клеток, что может привести к гибели клеток (апоптоз, некроз, аутофагия и др.).

**Целью** исследования явился сравнительный анализ изменений показателей обмена веществ и тонуса сосудов при моделировании острого и хронического стресса.

Эксперименты поставлены на беспородных белых крыс со средней массой тела 220 г, которые были разделены на четыре группы: первая группа – интактные крысы (контроль), вторая группа – острый стресс (фиксация в положении на спине на протяжении 6 часов или помещение крыс в пенал для иммобилизации с фиксацией шеи), третья группа – хронический стресс (ежедневная иммобилизация животных в пеналах по 90 минут на протяжении 10-14 суток), четвертая группа – животным однократно интраперитонеально вводили химический индуктор окислительного стресса паракват в дозе 20 мг/кг массы тела животного. Способ основан на циклических окислительно-восстановительных реакциях в клетке: паракват получает электрон из цепей переноса электронов и превращается в радикал-катион, который при наличии кислорода быстро его восстанавливает, образуя супероксидный анион-радикал. Затем в реакции, катализируемой супероксиддисмутазой,  $O_2^{\cdot -}$  превращается в перекись водорода, а последняя в реакции с клеточным железом образует гидроксильный радикал. Образованные свободные радикалы кислорода могут инициировать изменения в геноме и его эпигеномной регуляции, истощать резервы НАДФН+H<sup>+</sup>, что ведет к нарушению биосинтезов и обезвреживания ксенобиотиков, уменьшать количество монооксида азота.

**Материалы и методы.** Для исследования кровь забиралась через 24 часа после завершающей иммобилизации. Опыты на животных проводили в соответствии с протоколом по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденным Комиссией УО «ВГМУ». Выраженность стресс-реакции оценивали по изменению относительной массы стресс-чувствительных органов – надпочечников, селезенки и тимуса, а также по

концентрации в сыворотке крови кортикостерона, тироксина, трийодтиронина и тиреотропного гормона. Концентрацию диеновых конъюгатов, малонового диальдегида в миокарде определяли по методу В.Б. Гаврилова после экстракции липидов смесью гептана в изопропиловом спирте, диеновых конъюгатов в миокарде – по методу И.Д. Стальной. Содержание диеновых конъюгатов в пробе рассчитывали, учитывая величину молярного коэффициента экстинкции при 233 нм. Малоновый диальдегид определяли при помощи 0,8% тиобарбитуровой кислоты по методу Л.И. Андреевой, И.Д. Стальной. Оценку активности процесса перекисного окисления липидов и общую антиоксидантную активность в плазме крови производили на биохемилюминиметре БХЛ-06 (Россия). Стабильные продукты деградации монооксида азота ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) определяли в сыворотке крови крыс. Метод основан на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди с последующим фотометрическим определением нитрит-ионов с помощью реакции Грисса. В сыворотке крови экспериментальных животных определяли содержание глюкозы, общего белка, общего билирубина, мочевины, общего холестерина, холестерина ЛПВП, триглицеридов, холестерина ЛПНП, активность аминотрансфераз АлАТ и АсАТ, щелочной фосфатазы, общей креатинфосфокиназы. Тонус сосудов изучали на изолированных кольцах аорты крыс с помощью установки TISSUEBATH 4CHANSYS, (Biopacsystems, США), датчиков силы TSD125, соединенных с системой накопления данных MP150 (программа AcqKnowledge 4.1, Biopacsystems, США). Препарат функционировал в изометрическом режиме. Данные заносили в компьютер, где обрабатывались при помощи программы AcqKnowledge 4.1 Biopacsystems, (США). Вазоконстрикцию изучали путем введения в перфузионный раствор возрастающих концентраций  $\alpha_1$ -адреностимулятора фенилэфрина (от  $10^{-15}$  до  $10^{-3}$  М), эндотелийзависимое расслабление изолированного кольца аорты крыс оценивали классическим способом: предсокращали гладкомышечные клетки кольца аорты фенилэфрином ( $10^{-6}$ М) с последующим кумулятивным добавлением в перфузионный раствор ацетилхолина от  $1 \times 10^{-10}$  до  $3 \times 10^{-5}$  М.

Обработку данных проводили с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2000, STSTATISTICA 6.0 и при помощи программы GraphpadPrism 4.0. Для сравнения двух количественных признаков после проверки на правильность распределения использовали параметрические методы вариационной статистики путем применения t-критерия Стьюдента. Различия принимали достоверными при значении  $p < 0,05$ .

Установлено, что содержание в миокарде крыс диеновых конъюгатов и ТБК-позитивных веществ достоверно увеличивалось при остром и хроническом стрессе. Однократная и десятикратная иммобилизации крыс не оказали влияния на активность процесса перекисного окисления липидов, но величина антиоксидантной активности оказалась сниженной на 16,4% только при остром стрессе. Содержание суммы нитратов и нитритов по реакции с реактивом Грисса

в сыворотке крови стрессированных животных повышалось в 1,35 раза при остром стрессе и 1,68 раза – при хроническом стрессе. Следовательно, можно предполагать, что нарушения сердечно-сосудистой системы при стрессе могут быть связаны с влиянием активных форм кислорода на NO-синтазные реакции. При остром стрессе по сравнению с хроническим стрессом в сыворотке крови достоверно увеличивается концентрация глюкозы, мочевины, ХС ЛПНП и уменьшается концентрация триглицеридов и общего белка. Такие изменения биохимических показателей при остром стрессе приводят к почти трехкратному повышению величины коэффициента глюкоза/триглицериды, а также к незначительному, но достоверному повышению величины коэффициента ХС ЛПНП/ХС ЛПВП. Повышенное содержание глюкозы в сыворотке крови сохраняется и при хроническом стрессе. Содержание билирубина, мочевой кислоты и общего холестерина в сыворотке крови не изменяется при обоих вариантах стрессового воздействия. Выявлено статистически достоверное увеличение активности АлАТ, АсАТ и КФК в сыворотке крови животных, подвергнутых как острому, так и хроническому стрессу. Активность щелочной фосфатазы не изменяется при обоих вариантах иммобилизационного стресса.

Под влиянием острого стресса образуются провоспалительные ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , которые способны индуцировать появление iNOS и, как следствие, усиление эндотелий-зависимой релаксации кольца аорты и ее чувствительности к ацетилхолину, а также снижение констрикторного эффекта фенилэфрина [3]. Учитывая тот факт, что изменения сосудистой реактивности при кратковременном стрессе скорее носят приспособительный характер, чем проявление патологии, можно заключить, что NO, образующийся при участии iNOS также при этом состоянии имеет протекторное значение. Хронический иммобилизационный стресс значительно уменьшает адренореактивность аорты в ответ на действие фенилэфрина и снижает ответную реакцию гладкомышечных клеток на ацетилхолин. При кратковременном стрессе в клетках аорты крыс образуется индуцибельная NO-синтаза, которая может быть в одном случае источником большого количества NO (сопряженное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы), а в другом – супероксидного анион-радикала, подавляющего его биодоступность (разобщенное состояние субъединиц индуцибельной NO-синтазы). Учитывая тот факт, что изменения сосудистой реактивности при кратковременном стрессе скорее носят приспособительный характер, все же необходимо констатировать, что NO, синтезируемый индуцибельной NO-синтазой, при этом состоянии может иметь не только протекторное значение, но и быть началом появления агрессивных веществ, повреждающих различные элементы клеток стенки сосуда.

У животных подопытной группы, перенесших интоксикацию паракватом *in vivo*, и после обработки фрагментов аорты *in vitro* паракватом наблюдались отличия в сократительных реакциях аорты на введение  $\alpha_1$ -адреностимулятора. Предварительное внутрибрюшинное введение параквата приводило к снижению

ответа на кумулятивное добавление фенилэфрина. В данной группе животных сокращение кольца аорты начиналось при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост 11% от исходного напряжения) и достигало максимума при концентрации фенилэфрина  $10^{-6}$  М - прирост 51%. Поэтому можно сделать заключение, что в этой группе животных реакция кольца аорты на действие  $\alpha_1$ -адреностимулятора была менее выражена по сравнению с контролем. Предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* обеспечила более сильную реакцию на фенилэфрин: сократительный ответ аорты начинался при концентрации фенилэфрина  $10^{-11}$  М (прирост напряжения на 46%, а в контроле на 41%); максимум прироста напряжения достигался при концентрации фенилэфрина  $10^{-6}$  М (прирост на 101,6%, а в контроле на 95%). Анализ полученного материала показал, что внутрибрюшинное введение параквата животным, вероятно, снижало чувствительность аорты к действию  $\alpha_1$ -адреностимулятора, а предварительная обработка фрагмента аорты паракватом *in vitro* повышала ее чувствительность к фенилэфрину.

Введение параквата *in vivo* (внутрибрюшинно) не приводило к изменению эндотелий зависимой вазодилатации, так как реакция изолированного кольца аорты крыс на кумулятивное добавление в перфузионный раствор ацетилхолина практически не отличалось у животных этой группы по сравнению с контролем. В данной группе животных дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $10^{-7}$  М и составляла 21,2%, максимальная эндотелий зависимая дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 63,1%. Чувствительность гладкомышечных клеток аорты животных при введении параквата *in vivo* практически не отличалась от контрольных значений  $1,67 \times 10^{-7}$ . В группе животных, у которых изолированный фрагмент аорты был обработан паракватом *in vitro*, введение параквата не изменяло базальное напряжение сосудов, но значительно снижало вазодилататорный ответ изолированного кольца аорты при кумулятивном добавлении в перфузионный раствор ацетилхолина по сравнению с контрольной группой животных. В группе животных, у которых фрагмент аорты обрабатывался паракватом *in vitro*, дилатация кольца аорты начиналась при концентрации  $3 \times 10^{-7}$  М и составляла 12,6%, максимальная эндотелий зависимая дилатация развивалась при концентрации ацетилхолина в перфузионном растворе  $3 \times 10^{-5}$  М и достигала 43,8%. При этом у животных данной группы, наблюдалось уменьшение чувствительности гладкомышечных клеток изолированного кольца аорты к ацетилхолину.  $EC_{50}$  составила при введении параквата *in vitro*  $5,67 \times 10^{-7}$ , тогда как в контроле –  $1,47 \times 10^{-7}$ .

Проведенные исследования показали наличие сложной зависимости систем, определяющих тонус сосудов при стрессе, от характера окислительного стресса.

### Список литературы

1. Селье Г. На уровне целого организма. — М: Наука, 1972.— 122 с.



СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

2. Элбакидзе Г.М. Внутритканевое регулирование клеточной массы и тканевый стресс / Г.М. Элбакидзе, А.Г. Элбакидзе. – Москва, 2007. – 150 с.

3. Солодков А.П. Изменения эндотелий зависимой дилатации и  $\alpha_1$ -адренореактивности аорты крыс, вызванные ингибированием индуцируемой NO-синтазы после ограничения двигательной активности / А.П. Солодков, Н.М. Яцковская // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. - 2013. – Т. 99, № 7. – С. 859-868.