МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ
КАФЕДРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЫ

Материалы Международной научно-практической конференции
(Минск, 28 октября 2022 г.)

Под редакцией В. В. Хрусталёва, А. Д. Тагановича, Т. А. Хрусталёвой

Минск БГМУ 2022

УДК 57(043.2)
ББК 28
Ф48

Редакционная коллегия: заведующий кафедрой общей химии, д.б.н., доцент В. В. Хрусталёв; заведующий кафедрой биологической химии, д.м.н., профессор А. Д. Таганович; в.н.с., к.б.н. Т. А. Хрусталёва; заведующий кафедрой медицинской и биологической физики, к.ф.-м.н., доцент М. В. Гольцев; заведующий кафедрой биоорганической химии, к.м.н., доцент О. Н. Ринейская; заведующий кафедрой биологии, к.б.н., доцент В. В. Давыдов; к.м.н., доцент А.В. Бутвиловский; к.м.н., доцент А. А. Астапов; м.м.н. В. В. Побойнев.

Рецензенты: д.б.н., профессор Стожаров А.Н., д.б.н., доцент Хрусталёв В.В., д.б.н., доцент, член-корреспондент НАН Беларуси Шалыго Н.В., м.м.н. Побойнев В.В.

Физико-химическая биология как основа современной медицины : материалы докладов участников Международной научно-практической конференции (Минск, 28 октября 2022 г) / под ред. В. В. Хрусталёва, А. Д. Тагановича, Т. А. Хрусталёвой. – Минск : БГМУ, 2022. – 408 с.
Ф48
ISBN 978-985-21-1146-1.

Представленные результаты исследований относятся к области биологической химии, медицинской химии, медицинской и биологической физики, вычислительной биологии и биохимии, а также смежным вопросам медицины и фармации, проблемам преподавания естественнонаучных дисциплин.

Материалы прошли проверку на заимствования.

Предназначено для широкого круга научных работников.

УДК 57(043.2)
ББК 28

ISBN 978-985-21-1146-1

© УО «Белорусский государственный медицинский университет», 2022

THE ALANINE AMINOTRANSFERASE, ASPARTATE AMINOTRANSFERASE, AND TOTAL BILIRUBIN LEVELS IN OVERWEIGHT PATIENTS

Ali Adeeb Hussein Ali
Postgraduate student of the Department of Biochemistry of Yanka Kupala State University of Grodno
medic_lab2015@yahoo.com

The purpose of this study *is to determine the ALT, AST, and bilirubin status of people with normal and increased BMI. Material for research: the blood serum of patients. In the study subjects, there was a significant elevation in hepatic enzymes. In both males and females with a BMI of 25–29.9, serum level of alanine aminotransferase demonstrated a significant correlation with overweight. Our results suggested that central adiposity, which is unrelated to BMI, can predict elevated levels of hepatic enzymes, most probably as a result of undiagnosed fatty liver.*

Keywords: *obesity, body mass index, ALT, AST, bilirubin.*

УРОВНИ АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ, АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ И ОБЩЕГО БИЛИРУБИНА У ПАЦИЕНТОВ С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА

Али Адиб Хуссейн Али
Аспирант кафедры биохимии Гродненского государственного университета им. Я. Купалы
medic_lab2015@yahoo.com

Целью данного исследования является определение статуса АЛТ, АСТ и билирубина у людей с нормальным и повышенным ИМТ. Материал для исследования: сыворотка крови больных. У испытуемых наблюдалось значительное повышение активности печеночных ферментов. Как у мужчин, так и у женщин с ИМТ 25–29,9 уровень аланинаминотрансферазы в сыворотке крови продемонстрировал значительную корреляцию с избыточной массой тела. Наши результаты показали, что центральное ожирение, не связанное с ИМТ, может предсказывать повышенный уровень печеночных ферментов, скорее всего, в результате не выявленного ожирения печени.

Ключевые слова: *ожирение, индекс массы тела, АЛТ, АСТ, билирубин.*

Obesity and overweight are common disorders in the world. It is characterized by an increase in fat mass, which is a major factor in increasing mortality from cardiovascular diseases [1]. The endocrine and neural systems increase adipose energy storage and have negative effects on health when there is dietary abundance (extra energy consumption) and reduced physical activity [2]. Body Mass Index (BMI), which is equal to weight in kilograms divided by height in meters squared, is the most often used method to assess obesity and overweight.

Due to their rising trends in both developed and emerging nations, general and abdominal obese are both global health concerns. In 2016, the World Health Organization (WHO) reported that 13% of individuals worldwide were obese and that 39% of persons were overweight [3].

Physicians frequently deal with the situation of elevated liver enzymes in clinical practice. However, evaluating such an issue in patients who are present with no symptoms might be difficult for many doctors. There is insufficient evidence to justify a standardized evaluation process. Although changes in liver enzymes may be a sign of a healthy liver in some circumstances, they may also signal potential liver damage in others, calling for additional investigation and treatment.

The purpose of this study is to determine the ALT, AST, and bilirubin status of people with normal and increased BMI.

Materials and methods

An assessment of changes in the enzymes of the liver (ALT and AST) and bilirubin was carried out in 100 practically healthy individuals of both sexes living in Grodno. The age of the examined people was 24.3±0.24 for females and 25.5±0.52 for males. All individuals were evaluated for body mass index (BMI). BMI (kg/m2) was calculated as follows: BMI (kg/m2) = weight (kg)/height (m2). In accordance with WHO recommendations, the study used the interpretation of BMI indicators: 18–24.9 (normal), 25–29.9 (overweight, preobesity).

Material for research: the blood serum of patients. Informed consent was obtained from all patients and participants involved in the study.

Results and discussion

To assess the features and criteria of the alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total bilirubin status affecting the increase in body mass index, the mean values of parameters in the blood serum of groups of females and males with a body mass index of 18–24.9 and 25–29.9 were calculated.

The results of statistical processing of data on the alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and bilirubin in blood serum are shown in tables 1.

Table 1 – Biochemical parameters (ALT, AST and total bilirubin) of blood serum in females and males with different BMI values.

Indicator		Females		Males	
	N	BMI 18–24.9	BMI 25–29.9	BMI 18–24.9	BMI 25–29.9
Total bilirubin	25	7.36±0.64	9.36±0.61*	11.44±1.18	12.44±1.18
ALT. IU/L	25	19.7±2.6	28.3±1.7*	24.67±3.17	30.59 ±1.9*
AST. IU/L	25	21.6±2.1	24.20±1.7	23.9±1.21	24.8±1.41

* – $p<0.05$; ** – $p<0.01$

In all the two groups, the values of ALT, AST, and bilirubin were within the normal reference range (Table 1). However, there was an increasing trend in the values from normal to overweight. The fact of changes in enzyme activity was noted: alanine aminotransferase activity is higher in individuals with higher BMI values; $p = 0.01$ and $p = 0.03$, respectively, in both groups of females and males with a BMI of 25–29.9. No significant relation was found between aspartate aminotransferase and overweight as the p value was > 0.05 when compared with the group of BMI of 18–24.9 in both groups of females and males (Table 1).

Bilirubin levels of males with a BMI of 25–29.9 were studied. No significant relation was found between bilirubin and overweight as the p value was > 0.05 when compared with the group of males with a BMI of 18–24,9 (Table 1).

A significant relation was found between bilirubin and overweight as the p value $= 0.01$ when compared between the group of females with a BMI of 18–24,9 and a BMI of 25–29,9 (Table 1).

According to the study by Rhul CE et al., they showed that 65% of the high levels of alanine aminotransferase activity were caused by being overweight or obese (BMI above 25 kg/m2) [4]. The study by Stranges S et al. demonstrated how to assess the correlation between central fat accumulation and liver function tests and body mass index [5].

Conclusions

In the study subjects, there was a significant elevation in hepatic enzymes. In both males and females with a BMI of 25–29.9, serum level of alanine aminotransferase demonstrated a significant correlation with overweight. In females with a BMI of 25 to 29.9, serum bilirubin levels were discovered to be positively correlated with being overweight. Understanding the complex association between liver enzymes and overweight in the Belarus population would require additional research with larger cohorts of participants from varying ways. Our results suggested that central adiposity, which is unrelated to BMI, can predict elevated levels of hepatic enzymes, most probably as a result of undiagnosed fatty liver.

References

1. Effect of the herbal medicines in obesity and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. /M Payab [et al.]//. Phyther. Res.– Wiley Online Library, 2020.– Vol. 34, № 3.– P. 526–545.

2. S. Llorens, Pathogenic Microenvironment from Diabetic–Obese Visceral and Subcutaneous Adipocytes Activating Differentiation of Human Healthy Preadipocytes Increases Intracellular Fat, Effect of the Apocarotenoid Crocetin // Nutrients.– Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021.– Vol. 13, № 3.– P. 1032.

3. Obesity and overweight [Electronic resource].– URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight (accessed: 03.09.2022).

4. C.E. Ruhl, J.E. Everhart, Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States // Gastroenterology.– Elsevier, 2003.– Vol. 124, № 1.– P. 71–79.

5. Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: A population-based study// Hepatology.– Wiley Online Library,/ S. Stranges S [et al.]//. – 2004.– Vol. 39, № 3.– P. 754–763.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ДИПЕПТИДНОГО ЛИГАНДА TSPO РЕЦЕПТОРА ГД-23 И ЕГО D-L-ДИАСТЕРЕОМЕРА ГД-25 НА МОДЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА IN VITRO

Антипова Татьяна Алексеевна
к.б.н., заведующая лабораторией фармакологии нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва
zenina_tatyana@mail.ru
Николаев Сергей Владимирович
Научный сотрудник лаборатории фармакологии нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва
cergej.nikolajev@gmail.com
Деева Ольга Алексеевна
Научный сотрудник лаборатории пептидных биорегуляторов ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва
olga.angstrem@gmail.com
Гудашева Татьяна Александровна
д.б.н, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва
gudasheva@academpharm.ru

Инсульт является наиболее распространенным неврологическим заболеванием с тяжелыми последствиями. Известно, что лиганды TSPO рецептора демонстрируют положительные эффекты на моделях инсульта, обеспечивая нейропротекцию. На модели окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода, в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22 первый дипептидный лиганд TSPO рецептора ГД-23 защищал клетки от повреждения при внесении за 24 ч до перекиси водорода в концентрациях 10^{-5} – 10^{-8}М, а при внесении соединения после перекиси водорода – в концентрации до 10^{-7}М. Его D-L-диастереомер ГД-25 обладал сходным нейропротекторным действием. Стереоспецифичности в нейропротекторных эффектах ГД-23 и ГД-25 выявлено не было.

Ключевые слова: *дипептид; TSPO рецептор; нейропротекция; окислительный стресс; гиппокампальные клетки НТ-22.*

STUDY THE STEREOSPECIFICITY OF THE *IN VITRO* NEUROPROTECTIVE ACTIVITY OF GD-23 AND ITS D-L-DIASTEREOMER GD-25, THE DIPEPTIDE LIGANDS OF TSPO RECEPTOR ON THE OXIDATIVE STRESS MODEL

Antipova Tatyana Alexeevna

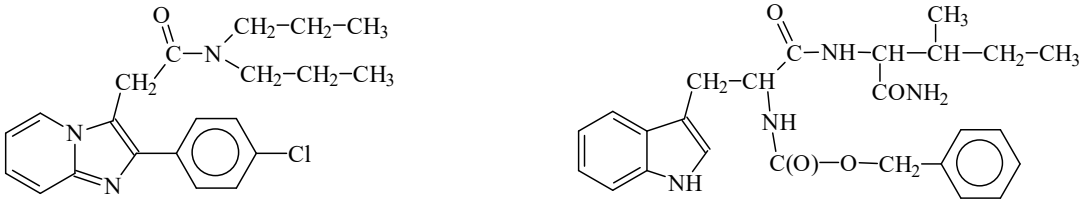
C.B.Sc., Head Neuroprotection pharmacology laboratory, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow
zenina_tatyana@mail.ru
Nikolaev Sergey Vladimirovich
Research Scientist, Neuroprotection pharmacology laboratory FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow
cergej.nikolajev@gmail.com
Deeva Olga Alekseevna
Research Scientist, Laboratory of peptide bioregulators, Department of medicinal chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow
olga.angstrem@gmail.com
Gudasheva Tatiana Alexandrovna
Dr.B.Sc., professor, RAS corresponding member, Head of medicinal chemistry department, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Russia, Moscow
gudasheva@academpharm.ru

Stroke is the most common neurological disease with severe consequences. The literature data represents that TSPO receptor ligands show positive effects in stroke models, providing neuroprotection. On the model of oxidative stress induced by hydrogen peroxide in the culture of HT-22 hippocampal cells line, the first dipeptide ligand of the TSPO, compound GD-23, protected cells from damage when applied 24 h before hydrogen peroxide at concentrations of 10^{-5}–10^{-8} M, and when added after hydrogen peroxide – in concentrations up to 10^{-7} M. Its D-L-diastereomer, compound GD-25 had a similar neuroprotective effect. Stereospecificity in the neuroprotective effects between GD-23 and GD-25 was not revealed.

Keywords: *dipeptide; TSPO receptor; neuroprotection; oxidative stress; HT-22 hyppocampal cells.*

TSPO в современной литературе рассматривают в качестве новой перспективной фармакологической мишени для создания анксиолитиков и нейропротекторов [1]. В течение почти трех десятилетий с момента открытия рецептор TSPO был известен как периферический бензодиазепиновый рецептор (peripheral benzodiazepine receptor, PBR), но в 2006 году в свете нового понимания его функций, а также его строения, этот рецептор был назван транслокаторным белком TSPO [2].Большое количество исследований показало, что TSPO участвует в транспорте холестерина от внешней к внутренней мембране митохондрии, где происходит ферментативное превращение холестерина в прегненолон – предшественник нейростероидов [3,4]. Нейростероиды обладают многочисленными физиологическими функциями [5,6]. Недостаток их синтеза связан с анксиогенезом, нейродегенерацией, нарушением процессов клеточной пролиферации, апоптозом и др. Впервые пептидные лиганды TSPO были получены в НИИ фармакологии им.В.В.

Закусова с применением оригинального подхода к созданию дипептидных лекарств, названный «drug-based peptide design» (DBPD) [7,8]. В качестве непептидного прототипа использовали Алпидем, являющийся первым представителем группы пиразолпиримидиновых лигандов TSPO [9]. Был сконструирован и затем синтезирован пептидный топологический аналог алпидема, представляющий собой амид N-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-23) (см.рис.1).



Алпидем

ГД-23
амид N-карбобензокси-
L-триптофанил-L-изолейцина

Рисунок 1 – Конструирование дипептидного лиганда TSPO на основе Алпидема.

Сконструированное соединение, как и алпидем, содержит два ароматических и один алифатический фармакофоры, сходным образом расположенные в пространстве относительно друг друга по данным молекулярного моделирования с помощью моделей Дрейдинга. Данные, полученные с помощью докинга молекул алпидема и ГД-23 в активный центр рецептора, подтверждают хорошее совпадение структур этих молекул в пространстве [10]. Соединение ГД-23 проявляло анксиолитическую активность в дозах 0,05-5,0 мг/кг внутрибрюшинно в стандартных фармакологических тестах открытого поля со световой вспышкой на мышах-самцах линии Balb/C и приподнятого крестообразного лабиринта на беспородных мышах-самцах линии CD1. Была показана стереоспецифичность эффектов дипептидного лиганда TSPO: его D,L-диастереомер (амид N-карбобензокси-D-триптофанил-L-изолейцина) не обладал анксиолитической активностью [9]. Лигандные свойства дипептида ГД-23 доказаны методом ингибиторного фармакологического анализа [9].

В данной работе была исследована стереоспецифичность нейропротекторного действия дипептида ГД-23 и его D-L-диастереомера ГД-25 в экспериментах *in vitro*.

Исследование проводили с использованием клеток линии HT-22 (иммортализованные клетки гиппокаппа мыши). Для эксперимента клетки рассеивали на 96-луночные культуральные планшеты, обработанные поли-D-лизином (5 мкг/см^2) с плотностью 20 тыс/см^2 и инкубировали в среде DMEM, содержащей 2 мМ L-глутамина и 5% эмбриональной телячьей сыворотки при

температуре 37°С в атмосфере, содержащей 5% CO_2 до образования монослоя. Окислительный стресс моделировали путем внесения перекиси водорода в конечной концентрации 1,5 мМ [11]. Спустя 30 мин среду заменяли на обычную. Через 4 ч выполняли измерение жизнеспособности клеток. Соединения ГД-23 и ГД-25 вносили в диапазоне концентраций 10^{-5}–10^{-8}М за 24 ч до H_2O_2, а также после повреждения клеток перекисью водорода. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием МТТ-теста с добавлением 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия (МТТ) [12]. Для растворения образующихся кристаллов формазана использовали диметилсульфоксид (ДМСО). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan EX при длине волны 600 нм. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные считались достоверными при $p \leq 0,05$ и представлены в виде m. ± s.d.

Окислительный стресс, вызванный H_2O_2, приводил к достоверному снижению жизнеспособности гиппокампальных клеток линии НТ-22. ГД-23 при внесении за 24 ч до перекиси водорода защищал клетки НТ-22 в концентрациях 10^{-5}М - 10^{-8}М. При внесении после повреждения максимально эффективной концентрацией оказалась 10^{-7}М. Наиболее эффективной концентрацией для ГД-25 при внесении за 24 ч до перекиси водорода оказалась 10^{-6}М. При внесении после перекиси водорода защитный эффект у ГД-25 во всех исследуемых концентрациях (таблица 1).

Таблица 1 – Нейропротекторное действие ГД-23 и ГД-25 на модели окислительного стресса гиппокампальных клеток линии НТ-22. Данные МТТ-теста представлены в % от Контроля.

Название группы, n=16	Внесение за 24 ч до H_2O_2	Внесение после H_2O_2
Контроль	100±4	100±5
H_2O_2 (1,5 мМ)	70±5*	87±6*
ГД-23 (10^{-5}М)	78±3^	96±4
ГД-23 (10^{-6}М)	77±3	99±7^
ГД-23 (10^{-7}М)	78±3^	100±5^
ГД-23 (10^{-8}М)	77±3	97±3^
ГД-25		
Контроль	100±7	100±4
H_2O_2 (1,5 мМ)	55±4*	47±4*
ГД-25 (10^{-5}М)	66±4^	59±3^
ГД-25 (10^{-6}М)	69±5^	59±3^
ГД-25(10^{-7}М)	68±3^	59±4^
ГД-25(10^{-8}М)	67±6	59±5^

Примечание: * – $p \leq 0,05$ – от Контроля; ^ – $p \leq 0,05$ от H_2O_2 (критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну.

Таким образом, соединения ГД-23 и ГД-25 на модели окислительного стресса в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22 обладали нейропротекторным эффектом. Однако в отличие от анксиолитического эффекта стереоспецифичности в нейпротекторном действии обнаружено не было.

Учитывая выявленные нейропротекторные свойства этих соединений представляется интересным их дальнейшее изучение в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Список литературы

1. B. Costa, 18-kDa translocator protein association complexes in the brain: From structure to function / B. Costa, E. Da Pozzo, C. Martini //Biochemical Pharmacology. – 2020. – V. 177. – P. 114015.

2. V. Papadopoulos, Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function / V. Papadopoulos, M. Baraldi, T.R. Guilarte, T.B. Knudsen, J.J. Lacapère, P. Lindemann, M. Gavish // Trends in pharm. sci. – 2006. – V. 27. – №. 8. – P. 402-409.

3. N. Jamin, Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor / N. Jamin, J.M. Neumann, M.A. Ostuni, T.K.N. Vu, Z.X. Yao, S. Murail, J.J. Lacapere //Mol.endocrinol. – 2005. – V. 19. – №. 3. – P. 588-594

4. J. J. Lacapere, Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis / J.J. Lacapere, V. Papadopoulos //Steroids. – 2003. – V. 68. – №. 7-8. – P. 569-585.

5. C. Schüle, Neuroactive steroids in affective disorders: target for novel antidepressant or anxiolytic drugs? / C. Schüle, D. Eser, T.C. Baghai, C. Nothdurfter, J.S. Kessler, R. Rupprecht // Neurosci. – 2011. – V. 191. – P. 55-77.

6. C. Schüle, The role of allopregnanolone in depression and anxiety / C. Schüle, C. Nothdurfter, R. Rupprecht // Progress in neurobiology. – 2014. – V. 113. – P. 79-87.

7. Т.А. Гудашева, Теоретические основы и технологии создания дипептидных лекарств //Т.А. Гудашева // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2015. – №. 9. – С. 2012-2012.

8. T. A Gudasheva, Novel technologies for dipeptide drugs design and their implantation / T.A. Gudasheva, R.U. Ostrovskaya, S.B. Seredenin//Curr. pharm. des. – 2018. – V. 24. – №. 26. – P. 3020-3027.

9. T. A. Gudasheva, Design, Synthesis and Anxiolytic Activity Evaluation of N-Acyl-tryptophanyl-Containing Dipeptides, Potential TSPO Ligands / T.A. Gudasheva, O.A. Deeva, G.V. Mokrov., A.S. Dyabina, M.A. Yarkova, S.B. Seredenin //Medicinal Chemistry. – 2019. – V. 15. – №. 4. – P. 383-399.

10. О.А. Деева, Новый дипептидный лиганд TSPO / О.А. Деева, А.С. Пантилеев, И.В. Рыбина, М.А. Яркова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин //Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 484. – №. 2. – С. 228-232

11. G.R. Jackson, Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells / G.R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E.L. Ezell // Brain Res. – 1992. – V.592 – №.1–2. – P. 239–248.

12. Y.Liu, Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction / Y. Liu, D.A. Peterson, H. Kimura, D. Schubert // Journ. of Neurochem. – 1997. – V.69. – №.2.- P.581–593.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КЛЕЙ К УБИКВИТИНЛИГАЗНОМУ КОМПЛЕКСУ $CRL4^{CRBN}$

Баньковский Андрей Алексеевич
студент Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
andreybankouski@gmail.com
Ринейская Ольга Николаевна
к.м.н., доцент, заведующий кафедрой биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
ryneiskaya@mail.ru

Целью исследования явилось изучение in silico эффективности связывания ряда производных талидомида с цереблоном в контексте механизма молекулярных клеев. При помощи методов молекулярного докинга и компьютерных средств визуализации проведена сравнительная оценка аффинности образца 1(2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона) и Помалидомида. Энергия связывания для образца 1 составила -9,28 ккал/моль, в то время как для Помалидомида этот показатель составил -8,97 ккал/моль.

Ключевые слова: *аффинность; Талидомид, Помалидомид; молекулярный докинг; цереблон; молекулярные клеи.*

POTENTIAL MOLECULAR GLUE TO UBIQUITIN-LIGAS COMPLEX $CRL4^{CRBN}$

Bankovsky Andrew A.
Student of Belarusian State Medical University, Minsk
andreybankouski@gmail.com
Ryneiskaya Volha M.
C.M.Sc., Head of Bioorganic Chemistry Department of Belarusian State Medical University, Minsk
ryneiskaya@mail.ru

The aim of the study was to study in silico the efficiency of binding a number of thalidomide derivatives to cereblon in the context of the mechanism of molecular glues. The affinity of 1(2-(2,6-dioxo-1,2,5,6-tetrahydropyridin-3-yl)isoindoline-1,3-dione) and Pomalidomide was compared using molecular docking methods and computer visualization tools. The binding energy for sample 1 was -9.28 kcal/mol, while for Pomalidomide this figure was -8.97 kcal/mol.

Keywords: *affinity; Thalidomide; Pomalidomide; molecular docking; cereblon; molecular glues*

Долгое время существовало множество гипотез тератогенного действия Талидомида – молекулярные механизмы действия этого препарата были

совершенно неясны. В 2010 году исследователи из Токийского медицинского университета при помощи метода аффинной хроматографии идентифицировали талидомид-связывающие белки: ими оказались цереблон (CRBN) и белок, связывающий поврежденную ДНК (DDB1). CRBN напрямую связывался с лекарственным средством, а DDB1 косвенно взаимодействовал с Талидомидом, посредством соединения с CRBN. Более того CRBN и DDB1 вместе с некоторыми другими белками образуют целый комплекс класса убиквитинлигаз E3 [1]. В настоящее время этот комплекс носит название $CRL4^{CRBN}$, где CRBN выступает в роли рецептора, который способен к распознаванию определенных субстратов. Значение этого комплекса, как и всех убиквитинлигаз, заключается в способности специфически «помечать» конкретные субстраты убиквитином, что предполагает их деградацию в протеасомах.

Связывание производных талидомида с CRBN индуцирует привлечение чужеродных субстратов к $CRL4^{CRBN}$ и их последующую протеасомную деградацию. Те субстраты, которые распознаются $CRL4^{CRBN}$ только в присутствии Талидомида или его производных, называются неосубстратами [1].

Иными словами, Талидомид и его производные проявляют свою фармакологическую активность, связываясь с CRBN и изменяя его субстратную специфичность, что приводит к распознаванию неосубстратов. То есть, Талидомид и его производные действуют как молекулярные клеи между CRBN и неосубстратами.

В контексте миеломной болезни, многие из этих неосубстратов являются факторами транскрипции, крайне необходимыми для различных жизненно важных для миеломной клетки процессов, таких как пролиферация, ангиогенез, устойчивость к различным ксенобиотикам и общая выживаемость

Эта стратегия направленной (таргетной) деградации белков резко расширяет спектр целевых протеинов, подвергающихся лекарственной деградации, поскольку такой метод не требует наличия четкого активного сайта на белках-мишенях.

Таким образом развитие концепции молекулярных клеев открывает двери в лечении ранее неизлечимых заболеваний. Возможность вызывать таргетную деградацию таких протеинов, как факторы транскрипции может повысить шансы в борьбе против различных онкологических заболеваний, а также других заболеваний, связанных с генетикой.

Целью работы явилась оценка in silico эффективности связывания ряда производных Талидомида с цереблоном в контексте механизма молекулярных клеев.

Материалы и методы. Трехмерная структура талидомид-связывающего домена цереблона была взята из базы данных RCSB Protein Data Bank (код в базе данных – 7bqu). Стереохимическое качество структуры, взятой для докинга, оценивалось в программе PROCHECK путем генерации карты Рамачандрана [2].

AutoDock версии 4.2.6 использовался для стыковки рецептора лигандов. Визуализация полученных комплексов проводилась при помощи программы PyMol.

Результаты и их обсуждение. CRBN человека представляет собой белок состоящий из N-концевого домена, подобного сериновым бактериальным протеазам, и С-концевого талидомид-связывающего домена, который и был выбран мишенью для докинга лигандов. Так как одна из функций сериновых бактериальных протеаз заключается в распознавании крупных белков, то в случае с цереблоном, его N-концевой домен распознает белок DDB1 и связывается с ним. DDB1-связывающий регион CRBN состоит из серии α-спиралей, расположенных в аминокислотных остатках 188–248 этого домена.

С целью проверки стереохимического качества полученной из базы данных PDB 3D-структуры цереблона была сгенерирована карта Рамачандрана при помощи ресурса PROCHEK. Анализ полученных данных указывает на хороший результат, так как 91,6 % остатков аминокислот попали в предпочитаемую область (рисунок 1).

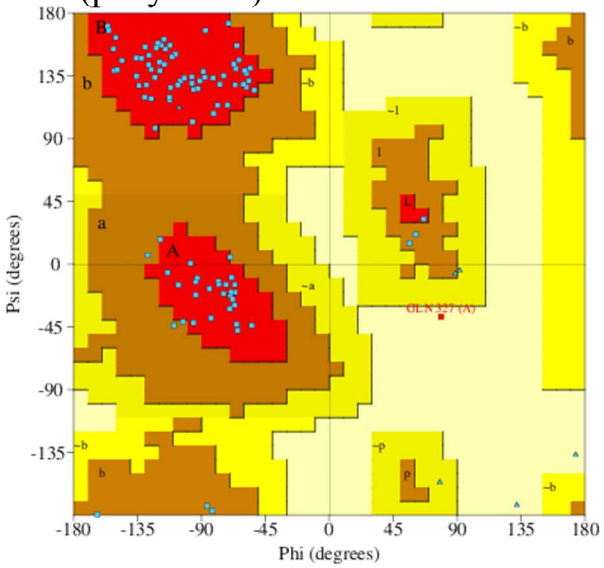


Рисунок 1 – Карта Рамачандрана CRBN: красные области соответствуют полностью разрешенным конформациям; коричневые – возможным конформациям при неблагоприятных контактах; ярко-желтые – конформациям при изменениях углов связей; светло-желтые – запрещенным конформациям

Ранее нами [3] проводился «слепой» докинг ряда структур с целью установления приблизительной области связывания лигандов. Далее проводилася повторная стыковка в идентифицированной области связывания лигандов с целью повышения точности; размер карты сетки потенциалов уменьшался, в то время, как ее плотность была повышена. Аффинность предложенных соединений оценивалась при помощи двух основных характеристик взаимодействия малых молекул с макромолекулами: свободная

энергия Гиббса (энергия связывания) и константа ингибирования.

Результаты показали, что лучший лиганд - образец 1 (2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион) - продемонстрировал более высокую аффинность к CRBN не только по сравнению с Талидомидом, но и с наиболее эффективным среди его производных, применяющихся в клинике – Помалидомидом (4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндол-1,3-дион) [3]. Энергии связывания для образца 1 составила -9,28 ккал/моль, в то время как для Помалидомида этот показатель составил -8,97 ккал/моль.

Стоит отметить, что подобные вычисления не могут носить абсолютный характер, поскольку концепция молекулярного докинга носит характер модели (молекулярное моделирование). Полученные численные результаты могут служить лишь в качестве средства для сравнения аффинностей различных соединений. Далее нами была предпринята попытка разобраться в причинах более эффективного связывания образца 1, поскольку именно структурное понимание взаимодействий лежит в основе разработки и рационального дизайна новых препаратов.

Принципиальное отличие заключается в строении самого образца 1. Молекула данного соединения не имеет хиральных центров в отличие от остальных предложенных лигандов. Это обусловлено наличием двойной связи в глутаримидном цикле, благодаря чему атом углерода приобретает sp^2 гибридизацию с копланарной конфигурацией (рисунок 2), что исключает таутомерию какого-либо типа.

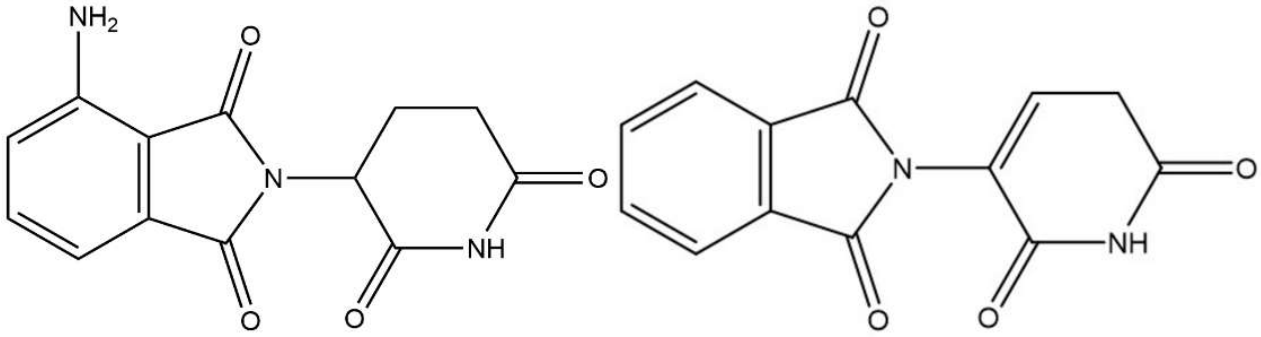


Рисунок 2 – Структурные формулы Помалидомида (слева) и образца 1 (справа)

При анализе молекулы AutoDock выявил этот факт, обозначив молекулу как жесткую, не обнаружив никаких торсионных степеней свободы. Это повлекло за собой нулевую конформационную энтропию и, следовательно, нулевую свободную энергию вращения. Вероятно, именно из-за этой закономерности выявились следующие важные особенности в образовавшемся комплексе. Заметно, что образец 1 погружается в структуру CRBN своим ароматическим фрагментом, чего нельзя сказать о молекуле Помалидомида (рисунок 3).

Поскольку ранее идентифицированный сайт связывания [3] представляет собой высоко гидрофобный ароматический триптофановый карман, то при погружении ароматического фрагмента образца 1 в этот карман, возникают π-стэкинговые взаимодействия между изоиндолиновым ядром лиганда с одной стороны и индольными фрагментами триптофанов Trp380, Trp386, Trp400 с другой (рисунок 4).

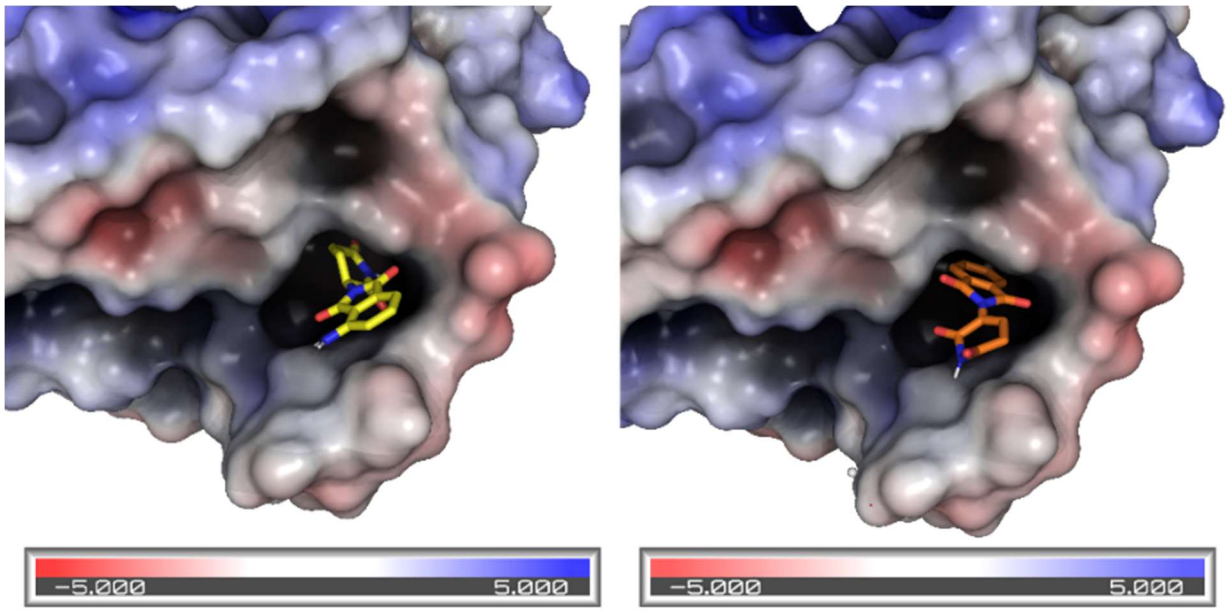


Рисунок 3 – Положение молекул Помалидомида (слева) и образца 1 (справа) относительно сайта связывания CRBN, молекулярная поверхность которого представлена в виде электростатического потенциала

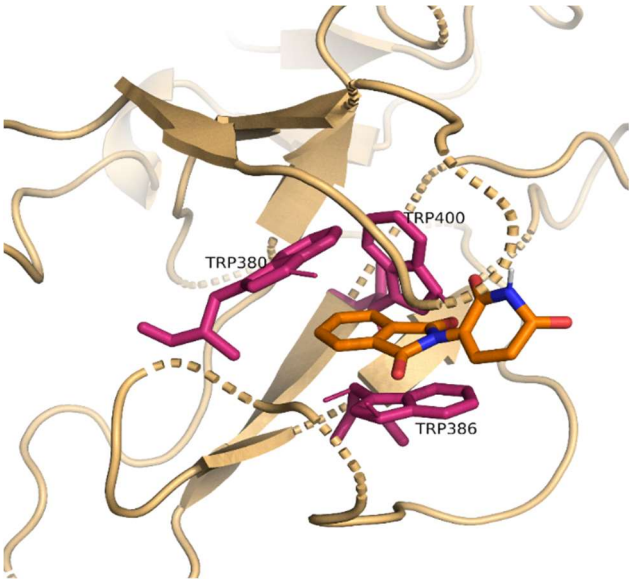


Рисунок 4 – Стэкинг взаимодействия образца 1 и CRBN в триптофановом кармане

Обсуждая возможные биологические эффекты предложенного соединения, стоит отметить, что эффективное связывание молекулы с CRBN не единственный фактор, отвечающий за антимиеломный ответ, хотя и весьма важный. Существенным также является то, насколько эффективно образец 1 «приклеивает» известные неосубстраты, подвергая их тем самым направленной протеасомной деградации. Так же возможно, что данное соединение может явиться молекулярным клеем, способным связывать еще неидентифицированные неосубстраты. Поэтому актуальным направлением разработки лекарственных средств является поиск новых неосубстратов, деградация которых вызывает антимиеломный эффект, а также анализ аффинности уже известных неосубстратов к полученному комплексу.

Список литературы

1. T. Ito, Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity / T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa // Science. – 2010. – Vol. 327, №5971. – P. 1345-1350.

2. R.A. Laskowski, PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures / R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton // J. App. Cryst. – 1993. – Vol. 26, – P. 283–291.

3. О.Н. Ринейская, Поиск эффективных средств с антимиеломной активностью на основе талидомида при помощи методов молекулярного докинга / О.Н. Ринейская, А.А. Баньковский // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сборник научных трудов / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Белорусский государственный медицинский университет. – Минск: БГМУ, 2022. – Вып. 12. В печати.

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ГЕМОЛИМФЕ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Бородина Екатерина Сергеевна
Махотин Родион Аркадьевич
Осипенко Татьяна Алексеевна
Пацевич Ольга Юрьевна
Шило Дорофея Дмитриевна
студенты 3-го курса, Белорусский государственный университет, Минск
physiology@bsu.by
Сандаков Дмитрий Борисович
к.б.н., доцент, Белорусский государственный университет, Минск
d.sandakov@mail.ru
Сидоров Александр Викторович
д.б.н., профессор, Белорусский государственный университет, Минск
sidorov@bsu.by

Посредством глюкозооксидазного метода оценено содержание глюкозы в гемолимфе модельного нейробиологического объекта Lymnaea stagnalis при развитии экспериментальной гипергликемии и последующей нормализации глюкозного гомеостаза.

Ключевые слова: *глюкоза; гемолимфа; беспозвоночные.*

DYNAMICS OF GLUCOSE CONTENT IN THE HEMOLYMPH OF MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS* UNDER EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA

Borodina Ekaterina Sergeevna
Makhotin Rodion Arkadievich
Osipenko Tatyana Alekseevna
Patsevich Olga Yurievna
Shilo Dorofea Dmitrievna
students (3d course), Belarusian State University, Minsk
physiology@bsu.by
Sandakov Dmitry Borisovich
C.B.Sc., Docent, Belarusian State University, Minsk
d.sandakov@mail.ru
Sidorov Alexander Viktorovich
Dr.B.Sc., Professor, Belarusian State University, Minsk
sidorov@bsu.by

Glucose oxidase method was used to determine glucose content in the haemolymph of the model invertebrate Lymnaea stagnalis during experimental hyperglycemia and subsequent normalization of glucose homeostasis.

Key words*: glucose; haemolymph; invertebrates.*

Беспозвоночные животные широко используются в качестве модельных организмов для оценки действия различных физических и химических факторов на организм [1, 2]. Среди них особое место занимает пресноводный лёгочный моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный), высокая степень изученности нервной системы которого, как на уровне нейронных сетей мозга, так и находящимися под их контролем различных форм поведения, позволяет оценить нейротропные эффекты того или иного действующего вещества.

В последние годы существенно возрос интерес к вопросам, связанным с действием «рядовых» метаболитов, представляющими собой либо компоненты пищи, либо продукты метаболических превращений составляющих её элементов. Среди большого разнообразия таких веществ особое место занимает глюкоза – специализированные, глюкозочувствительные, клетки представлены в ЦНС как позвоночных, так и беспозвоночных организмов, преимущественно в составе пищевой сети [3 ,4]. В то же время, эффекты данной молекулы в отношении нейронов другой функциональной специфичности остаются малоизученными.

Изучение поведения является классическим подходом для оценки деятельности центральной нервной системы. Высокая проницаемость кожных покровов водных беспозвоночных для относительно низкомолекулярных соединений (до 1 кДа) открывает возможность неинвазивного введения таких веществ за счёт ипользования их растворов, куда и помещается экспериментальное животное. Такой подход снимает артефакты, связанные с механическим (тактильным) стимулом (вплоть до повреждения кожных покровов) при инъекции, что особенно важно для животных небольших линейных размеров.

С другой стороны, инкубация в растворах веществ заданной концентрации ещё не означает автоматического достижения такого же уровня и во внутренней среде организма. В частности, проведённые нами ранее работы [5] показали, что нахождение моллюсков в течение 2-х часов в 100 мМ, но не 10 мМ, водном растворе глюкозы приводит к почти 10-ти кратному и выше возрастанию концентрации глюкозы в гемолимфе, с 0,1–0,2 до 1–4 мМ. Не менее важен и вопрос, свзанный с особенностями вымывания такого привнесённого компонента при перенесении животных в аквариумы, содержащие воду без следов действующего вещества, другими словами – каков временно́й диапазон действия препарата? Водный обмен у прудовика весьма интенсивен – весь объём гемолимфы может обновиться в течение часа несколько раз [6].

Целью данной работы было изучить динамику изменения содержания глюкозы в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* после развития острой

экспериментальной гипергликемии, развивающейся в результате нахождения животных в высококонцентрированном водном растворе глюкозы.

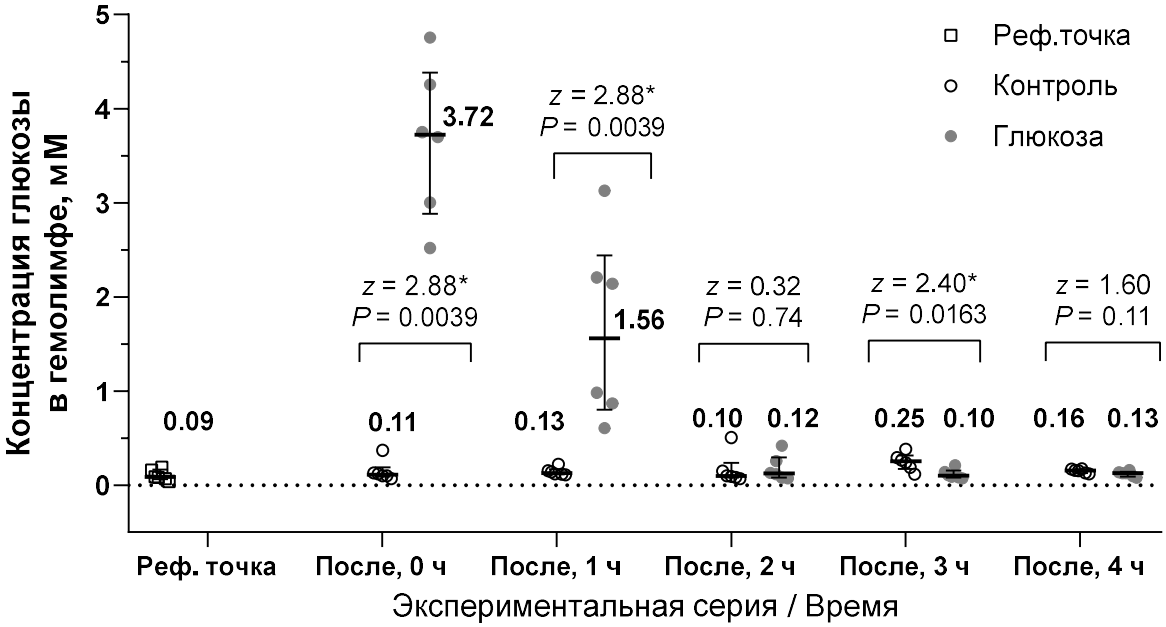
Работа выполнена на представителе пресноводных моллюсков прудовике обыкновенном – *Lymnaea stagnalis*. Животных собирали в летний период в мелких мелиоративных каналах Минской области. В лаборатории их содержали в аквариумах с отстоявшейся водопроводной водой (не менее 1 л на особь), при температуре 25 ± 1 ºС. Пищей служили молодые листья одуванчика (питание *ad libitum*). Экспериментальные группы (по 6 для контрольной и опытной серий, включающих по шесть моллюсков в каждой) комплектовались животными одинакового размерного класса: высота раковины 4,0 – 5,0 см, масса 4–7 г. Для создания условий экспериментальной гипергликемии моллюсков переносили в сосуды с «чистой» водой или содержащие глюкозу (100 мМ), где они и находились в течение 2-х часов. Забор гемолимфы для последующего определения содержания в ней глюкозы проводили сразу после, спустя 1, 2, 3 и 4 часа после инкубации (животные были возвращены в аквариумы их постоянного содержания), отдельно по группам контрольной и опытной серий. В качестве референтной точки использовали данные по концентрации глюкозы в гемолимфе моллюсков, не подвергавшихся 2-х часовой экспозиции в условиях эксперимента.

Для определения содержания глюкозы тактильной стимуляцией ноги вызывали реакцию полного втягивания тела, сопровождающуюся выбросом части гемолимфы (объёмом ок. 500 мкл). Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (реагенты «Анализ Х», Беларусь). Оптическую плотность измеряли на λ = 520 нм (спектрофотометр Cary 50, Varian Inc., Австралия). Объём материала – 100 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) – 30 мин. В качестве стандарта использовали 100 мкл свежеприготовленного 1 или 5 мМ раствора глюкозы.

Нормальность распределения оценивали при помощи W-теста Шапиро–Уилка. Поскольку она не была подтверждена для всех без исключения экспериментальных групп использовали непараметрические критерии сравнения: *U*-критерий Манна–Уитни (z) или *H*-критерий Крускала–Уоллиса (Kruskal-Wallis ANOVA) при сравнении двух или нескольких независимых групп соответственно. В случае отсутствия статистически значимых различий проводили дополнительную проверку посредством дисперсионного анализа (ANOVA) по однофакторной схеме (для нормального распределения), во избежание статистической ошибки 2-го рода. Для обработки и представления данных (медиана / нижний; верхний квартили) использовании статистические возможности программ Statistica 6.0 и GraphPad Prism 8.0. Достоверными считали данные при уровне значимости (*P*) меньшем 0,05.

Референтное значение содержания глюкозы в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* находится на уровне 0,1–0,2 мМ, что вполне согласуется как с нашими

предшествующими данными [5], так и результатами более ранних работ [7]. Инкубация животных в 100 мМ растворе глюкозы по прошествии 2-х часов вызывает резкое, более чем на порядок, статистически достоверное (z = 2,88, P = 0,0039) увеличение концентрации глюкозы в гемолимфе (рисунок 1).



Точки диаграммы – данные по каждому моллюску отдельно. Приведены медианные значения показателя и дополнительно указан интерквартильный размах. Представлены значения U-критерия Манна-Уитни (z) и уровня значимости P при сравнении животных опытной (глюкоза) и контрольной групп в одинаковом временно́м интервале (* – различия статистически достоверны).

Рисунок 1 – Уровень глюкозы в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* до и после развития экспериментальной гипергликемии

Однако уже по прошествии одного часа после нормализации условий содержания животных, значение оцениваемого показателя уменьшалось примерно наполовину от наблюдаемого сразу по завершении инкубации, но всё ещё было существенно выше референтного показателя, т.е. наблюдаемые различия были статистически значимыми (z = 2,88, P = 0,0039). Спустя 2, 3 и 4 часа после окончания инкубации в высококонцентрированном растворе глюкозы значения концентрации глюкозы в гемолимфе статистически достоверно не отличались от референтного значения: z = 0,96, P = 0,3367; z = 0,64, P = 0,5218 и z = 0,42, P = 0,4711 соответственно. Проведённый дисперсионный анализ (Kruskal-Wallis ANOVA) так же, с высокой степенью достоверности (H = 24,70, P = 0,0002), подтверждает статистическую значимость колебания уровня глюкозы в гемолимфе животных этой экспериментальной серии.

У животных, подвергшихся 2-х часовой экспозиции в воде, не содержащей глюкозу, количество глюкозы в гемолимфе, по сравнению с референтным значением, статистически достоверно не отличалось в большинстве оцениваемых временных интервалов: сразу (z = 0,88, P = 0,3785), через 1 (z = 1,28, P = 0,2002), 2 (z = 0,56, P = 0,5751) и 4 (z = 1,28, P = 0,2002) часа. Лишь в отношении данных, соответствующих 3-х часовому интервалу после окончания инкубации, было отмечено статистически значимое (z = 2,56, P = 0,0104) увеличение искомого показателя. Однако дисперсионный анализ как для непараметрического (H = 10,92, P = 0,0531), так и параметрического (F = 1,4871, P = 0,2235) распределения данных указывает на отсутствие различий между группами, т.е. отмеченные выше колебания следует отнести к случайным. Тем не менее, это лишний раз подчёркивает достаточно большую степень дисперсии оцениваемого показателя (содержание глюкозы в гемолимфе) у свободно передвигающихся животных, отмечаемого и другими группами исследователей [8, 9], что может быть связано с индивидуальными особенностями той или иной особи (возраст, масса, степень насыщения и т.п.), как это отмечено и в отношении других химических показателей гемолимфы, в частности, для её pH [10]. Фактически, это означает необходимость постоянного контроля за этим показателем при выполнении экспериментальных работ, связанных с изучением содержания глюкозы в гемолимфе моллюсков.

Нормализация содержания глюкозы в гемолимфе характеризуется отчётливой линейной зависимостью. Значение уравнения линейной регрессии, построенное по данным для трёх временны́х отрезков (сразу после, через 1 и 2 часа по окончании инкубации) составило $y = 123x+12$ при уровне аппроксимации в 0,78. По всей видимости, нарастание уровня глюкозы в гемолимфе, при помещении животных в высококонцентрированный водный раствор глюкозы, тоже подчиняется такой закономерности. Другими словами, увеличение времени экспозиции моллюсков в таком растворе будет приводить к более существенному увеличению содержания глюкозы в гемолимфе. С другой стороны, временно́е окно, когда в гемолимфе создаётся достаточно эффективная концентрация веществ со схожей молекулярной массой (ок. 200 Да) ограниченно 2-х часовым интервалом, что необходимо учитывать при длительных наблюдениях за животными.

Таким образом, инкубация моллюсков в высококонцентрированном растворе глюкозы в течение 2-х часов гарантированно вызывает развитие экспериментальной гипергликемии, выражающееся как минимум в 10-ти кратном увеличении содержания глюкозы в гемолимфе с базовым уровнем. Степень её выраженности и продолжительность можно регулировать за счёт времени экспозиции животных в экспериментальных растворах.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б22-105).

Список литературы

1. I. Fodor, R. Svigruha, G. Kemenes, I. Kemenes, Z. Pirger, The Great Pond Snail (Lymnaea stagnalis) as a Model of Aging and Age-Related Memory Impairment: An Overview // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2021. Vol. 76. P. 975–982.

2. A.V. Sidorov, V.B. Kazakevich, Dependence of electric activity of motoneurons and locomotor behavior of Lymnaea stagnalis on environmental temperature // J. Evol. Biochem. Physiol. 2001. Vol. 37. P. 252–258.

3. A. Tups, J., Benzler, D. Sergi, S.R. Ladyman, L.M. Williams, Central regulation of glucose homeostasis // Compr. Physiol. C. 2017. Vol. 7. P. 741–764.

4. A.J. López-Gambero, F. Martínez, K. Salazar, M. Cifuentes, F. Nualart, Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis // Mol. Neurobiol. 2019. Vol. 56, P. 769–796.

5. В.Н. Шаденко, А.В. Сидоров, Индукция экспериментальной гипергликемии у моллюска Lymnaea stagnalis при инкубации животных в высококонцентрированном растворе глюкозы // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2019. № 1. С. 79–84.

6. W.J. Van Aardt, Quantitative aspects of the water balance in Lymnaea stagnalis (L.) // Neth. J. Zool. 1967. Vol. 18. P. 253–312.

7. F.E. Friedl, Hemolymph glucose in the freshwater pulmonate snail Lymnaea stagnalis: Basal values and an effect of ingested carbohydrate // Comp. Biochem. Physiol. A. 1971. Vol. 39. P. 605–610.

8. J.P. Veldhuijzen, Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail Lymnaea stagnalis // Neth. J. Zool. 1974. Vol. 25. P 89–102.

9. M.V. Karanova, Seasonal variation in the content of free reducing sugars in body fluids of freshwater mollusk Lymnaea stagnalis // Biol. Bull. 2006. Vol. 33. P. 382–386.

10. A.V. Sidorov, Coordination of locomotor activity of mollusc Lymnaea stagnalis at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH) // J. Evol. Biochem. Physiol. 2006. Vol. 42. 1. P. 43–48.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДГЕЗИИ ФОТОКОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ФИКСАЦИИ НЕСЪЕМНОГО РЕТЕЙНЕРА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ПРОТРАВЛИВАНИЯ ЭМАЛИ ЗУБОВ

Бутвиловский Александр Валерьевич
д.м.н., доцент, доцент кафедры эндодонтии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
alexbutv@rambler.ru
Алшарифи Али Абдолхади Меджбел
Аспирант кафедры эндодонтии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
dralsharifiali@gmail.com
Бутвиловский Валерий Эдуардович
к.м.н., доцент, доцент кафедры биологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
alexbutv@rambler.ru

Целью исследования являлся анализ адгезии фотокомпозиционного материала для фиксации несъемного ретейнера при различной длительности протравливания эмали зубов. После очищения удаленных интактных постоянных резцов нижней челюсти проводили протравливание эмали гелем 37% ортофосфорной кислоты в течение 15 секунд (группа №1) или 60 секунд (группа №2), далее проводили адгезивную подготовку (универсальной адгезивной системой), наносили и полимеризовали текучий фотокомпозиционный материал. Для определения адгезии на шлифах зубов измеряли микротвердость при нагрузке 200 г для наведения трещины. Установлено, что адгезия фотокомпозиционного материала к эмали зубов в группе 2 составила 38,9 (38,2-39,0) МПа, что на 11,8% превосходило (U=0, p<0,01) таковую в группе 1 (34,8 (34,5-35,0) МПа).

Ключевые слова: *адгезия, несъемный ретейнер, длительность протравливания эмали.*

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ADHESION OF A LIGHT-CURING COMPOSITION MATERIAL FOR FIXING OF NON-REMOVABLE RETAINER WITH DIFFERENT DURATION OF TOOTH ENAMEL ETCHING

Butvilovsky Alexander Valerievich
Dr.M.Sc., Associate Professor, Associate Professor of the Department of Endodontics of the Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk
alexbutv@rambler.ru
Alsharif Ali Abdolhadi Mejbel
Postgraduate student of the Department of Endodontics of the Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk

dralsharifiali@gmail.com
Butvilovsky Valery Eduardovich
C.M.Sc., Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biology of the Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk
alexbutv@rambler.ru

The aim of the research was to analyze the adhesion of a light-curing composite material for making a fixed retainer at different durations of tooth enamel etching. After cleaning the extracted intact permanent incisors of the lower jaw, the enamel was etched with a 37% phosphoric acid gel for 15 seconds (group 1) or 60 seconds (group 2), then adhesive preparation was carried out (with a universal adhesive system), a flowable light-curing composite material was applied and polymerized. To determine adhesion on thin sections of teeth, microhardness was measured at a load of 200 g to induce a crack. It was found that the adhesion of the light-curing composite material to the tooth enamel in group 2 was 38.9 (38.2-39.0) MPa, which was 11.8% higher (U=0, p<0.01) than in group 1 (34.8 (34.5-35.0) MPa).

Key words: *adhesion, non-removable retainer, duration of enamel etching.*

Несъемные ретейнеры широко используются после завершения активного ортодонтического лечения для удержания зубов в достигнутом положении. В настоящее время при изготовлении несъемных ретейнеров врачи-стоматологи-ортодонты Республики Беларусь предпочитают использовать металлические арматуры и текучие фотокомпозиционные материалы [1]. Изучение влияния длительности протравливания эмали на адгезию к ней ретейнера при использовании универсальных адгезивных систем ранее не проводилось, что определяет актуальность данного исследования.

Цель исследования: проанализировать адгезию фотокомпозиционного материала для фиксации несъемного ретейнера при различной длительности протравливания эмали зубов.

Материалы и методы. Исследование проводилось на удаленных по причине заболеваний маргинального периодонта постоянных резцах нижней челюсти с интактными твердыми тканями. Зубы очищали щеточкой с пастой без фтора, промывали водой и высушивали. Затем в группе №1 (n=6) проводили протравливание эмали гелем 37% ортофосфорной кислоты в течение 15 секунд, промывали водой, высушивали, далее проводили адгезивную подготовку (универсальной адгезивной системой), наносили и полимеризовали текучий фотокомпозиционный материал в соответствии с рекомендациями производителя. В группе №2 (n=6) выполняли те же манипуляции с увеличением времени протравливания эмали до 60 секунд.

Определение адгезионной прочности границ элементов несъемных ретейнеров проводилось на шлифах зубов с использованием светового микроскопа «MeF-3» («Reichert», Австрия) при увеличении ×200 (рисунок 1)

путем измерения микротвердости на микротвердомере «Micromet-II» («Buehler», Швейцария) с нагрузкой 200 г для наведения трещины на границе зуба и фотокомпозиционного материала. Вычисление адгезии проводили на основании измерения диагонали трещины [2, 3].

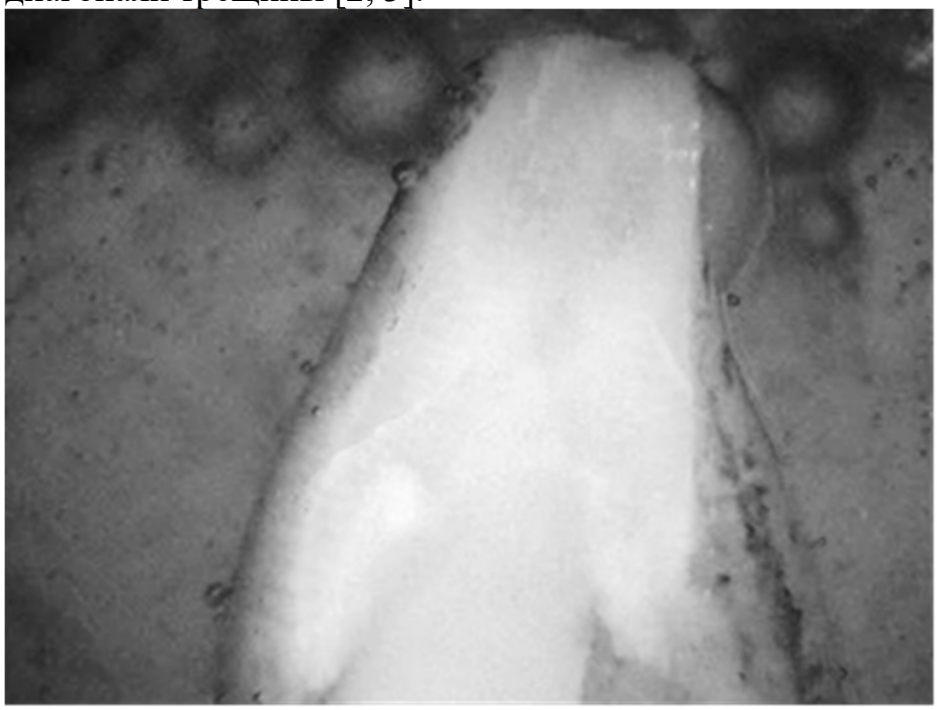


Рисунок 1. – Общий вид исследуемого сечения «фотокомпозиционный материал-зуб» (×200)

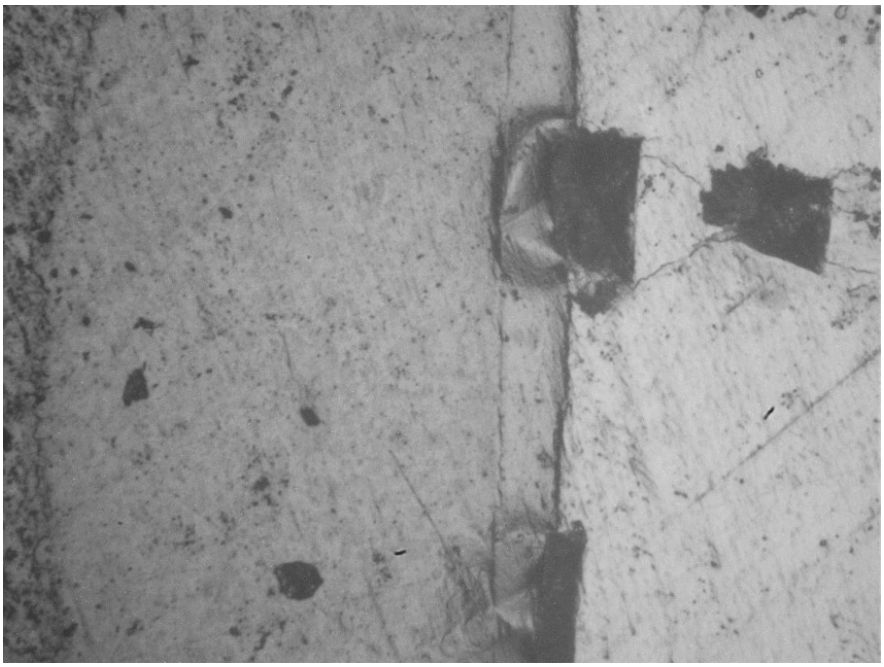


Рисунок 2. – Граница соединения фотокомпозиционного материала и эмали зуба в образце группы 1 с уколами микротвердости (×200)

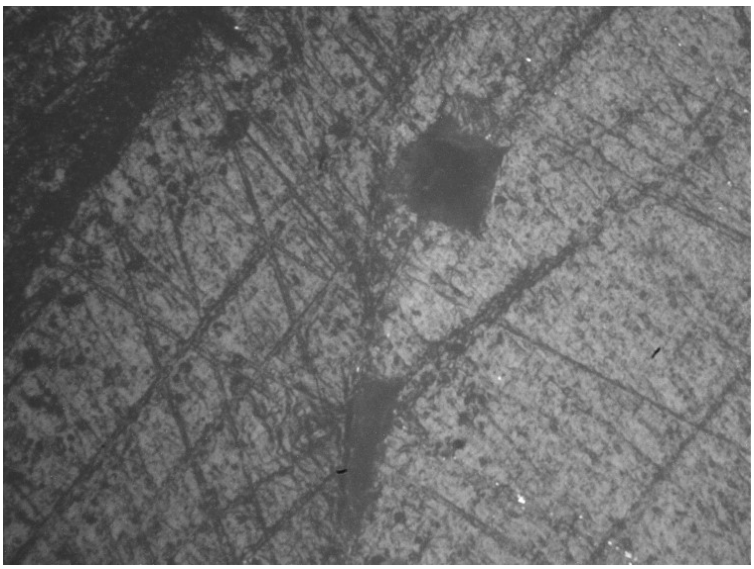


Рисунок 3. -– Граница соединения фотокомпозиционного материала и эмали зуба в образце группы 2 с уколами микротвердости (×200)

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью программ Microsoft Excel for Windows и Past 3.0 [4, 5]. Описание количественных переменных представлено в виде медианы, нижнего и верхнего квантиля Me (Q1-Q3). Значимость различий при сравнении двух независимых групп определена по критерию U (Манна-Уитни) с критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез, равном 0,05.

Результаты и обсуждение. Трещины, наведенные после индентирования, в образцах групп 1 и 2 показаны на рисунках 2 и 3. Установлено, что размеры диагонали трещины в группе 1 колебались в диапазоне от 33,4 до 34,2 мкм, медиана составила 33,9 (33,7-34,1) мкм. В группе 2 аналогичные показатели варьировали от 32,0 до 32,8 мкм при медиане 32,1 (32,0-32,6) мкм.

Адгезия фотокомпозиционного материала к эмали зубов в группе 2 составила 38,9 (38,2-39,0) МПа, что на 11,8% превосходило ($U=0$, $p<0,01$) таковую в группе 1 (34,8 (34,5-35,0) МПа).

Заключение. Увеличение времени протравливания эмали с 15 до 60 секунд приводит к статистически значимому увеличению адгезии фотокомпозиционного материала к эмали (на 11,8%). Полученные результаты определяют целесообразность проведения дальнейших исследований в клинике.

Список литературы

1. А.А.М. Алшарифи, Анализ предпочтений врачей-стоматологов-ортодонтов при выборе изделий медицинского назначения при изготовлении несъемных ретейнеров / А.А.М. Алшарифи, А.В. Бутвиловский, А.В. Мадатян // Современная стоматология. – 2022. - №3. – С. 58-63.

2. H.J. Spies, Beurteilung des Bruchverhaltes nitrierter Bauteile mit Hilfe der Eindruck-Bruchmechanik / K. Brock, H.J. Spies // Neue Hutte. – 1982. – N. 11. – P. 430-432.

3. G. Tutzchky, Informationstheoretiche Charakterisierung des Leistungsvermogens serstorungsfreier Prufverfahren / K. Danzer, G. Tutzchky // Neue Hutte. – 1980. – N. 8. – P. 308-312.

4. О.Ю. Реброва, Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва // М. Медиасфера. – 2002. – 312 с.

5. O. Hammer, PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis /O. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan // Palaeontologia Electronica. – 2001. – Vol. 4(1). – P. 1-9.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF 4-((7-ETHYL-3,7-DIHYDRO-3-METHYL-1H-PURINE-2,6-DIONE-8-YL)AMINO)PROPANOIC, BUTANOIC AND HEXANOIC ACIDS UNDER INHIBITION OF SUPEROXIDE DISMUTASE BY NITROGEN ACTIVE FORMS

Galitsa Vadim Vyacheslavovich
Dr.Ch.Sc., Senior Lecturer, Department of Chemistry and Chemical education, Melitopolsky State Pedagogical University name Bogdana-Khmelnitsky, Zaporozhye
halytsyavadym@gmail.com
Dyuzhikova Tatyana Nikolaevna
C.P.Sc., Associate Professor Department of Chemistry and Chemical education,Melitopolsky State Pedagogical University name Bogdana-Khmelnitsky, Zaporozhye
dyuzhikova1970@gmail.com
Galitsa Irina Vladimirovna
Student of Melitopolsky State Pedagogical University name Bogdana-Khmelnitsky, Zaporozhye
james-81@yandex.com

The antioxidant activity of 4-((7-ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1H-purin-2,6-dion-8-yl)amino)propanoic, butanoic and hexanoic acids was studied in this research.

The investigation was carried out in the test of NO· formation in vitro. Also the protective activity of these compounds under inhibition of superoxide dismutase with excessive NO· and $ONOO^-$ production was studied. NO· induction was performed under the action of light on sodium nitroprusside sample. The investigation of substances was carried out in supernatant obtained from the brain of white Wistar rats. For nitrosative stress modeling dinitrozole complex of iron and cysteine was utilized.

In conclusion, our data show that 4-((7-ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1H-purin-2,6-dion-8-yl)amino)propanoic, butanoic and hexanoic acids show antioxidant activity in NO· induction in vitro. 4-((7-ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1H-purin-2,6-dion-8-yl)amino)butanoic acid revealed to be the most active one, which excelled N-acetilcysteine in antioxidant properties.

Keywords: *active forms of Nitrogen; antioxidant activity; nitrosative stress; superoxide dismutase; 4-((7-ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1H-purin-2,6-dion-8-yl)amino) butanoic acid.*

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ 4-((3-МЕТИЛ-3,7-ДИГИДРО-7-ЭТИЛ-1*Н*-ПУРИН-2,6-ДИОН-8-ИЛ)АМИНО)ПРОПАНОВОЙ, БУТАНОВОЙ И ГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ АЗОТА

Галица Вадим Вячеславович
д.х.н., старший преподаватель кафедры химии и химического образования Мелитопольского государственного педагогического университета имени

Богдана Хмельницкого, г. Запорожье
halytsyavadym@gmail.com
Дюжикова Татьяна Николаевна
к.п.н., доцент кафедры химии и химического образования Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого, г. Запорожье
dyuzhikova1970@gmail.com
Галица Ирина Владимировна,
Студентка Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого, г. Запорожье
james-81@yandex.com

В работе исследована антиоксидантная активность 4-((3-метил-3,7-дигидро-7-этил-1Н-пурин-2,6-дион-8-ил)амино)пропановой, бутановой и гексановой кислот.

Исследования проводили в тесте образования NO· in vitro. Также изучено протекторное действие соединений при ингибировании супероксиддисмутазы избыточной продукцией NO· и $ONOO^-$-радикалов. Индукцию NO· осуществляли действием света на образцы с нитропруссидом натрия. Изучение активности соединений проводили в супернатанте, полученном из гомогената головного мозга белых крыс линии Вистар. Для моделирования нитрозирующего стресса использовали динитрозольный комплекс железа с цистеином.

Полученные результаты демонстрируют, что 4-((3-метил-3,7-дигидро-7-этил-1Н-пурин-2,6-дион-8-ил)амино)пропановая, бутановая и гексановая кислоты проявляют антиоксидантную активность при индукции NO· in vitro. Среди них выявлено наиболее активное соединение – 4-((3-метил-3,7-дигидро-7-этил-1Н-пурин-2,6-дион-8-ил)амино)бутановая кислота, которое по антиоксидантным свойствам превзошло N-ацетилцистеин.

Ключевые слова: *активные формы азота; антиоксидантная активность; нитрозирующий стресс; супероксиддисмутаза; 4-((3-метил-3,7-дигидро-7-этил-1Н-пурин-2,6-дион-8-ил)амино)бутановая кислота.*

One of the active forms of Nitrogen is the free radical NO·, which acts as a universal messenger of the central nervous system (CNS) under normal and pathological conditions. NO· takes a part in the regulation of blood circulation, neurotransmission, modulation of neuroendocrine function and behavioral activity.

Under conditions of CNS pathology, NO· can acts as a pathogenic factor under conditions associated with ischemia, strokes, neurodegenerative diseases, epilepsy, primarily causing nitrosative stress of the cell.

As a result of nitrosative stress nitration of metals and thiol groups in protein molecules takes a part, fragmentation of nucleic acids occurs, the level of ATP decreases, and the functions of mitochondrial enzymes is inhibited. The main

neurotoxic factor of nitrosative stress is a peroxynitrite-anion $ONOO^-$, which is formed under the interaction of excess of $NO^{\bullet}$ and superoxide radical.

The peroxynitrite molecule exists in a stable *cis*-form and is able to diffuse over a distance of the several cell body diameters. As a strong oxidizing agent, $ONOO^-$ is characterized by a high level of cytotoxicity, which contributes to the oxidative modification of sulfhydryl groups of protein fragments of enzymes, receptors, ion channels, lipoproteins and DNA [4].

Peroxynitrite interacts with the metals of the superoxide dismutase (SOD) active center, resulting in the formation of a highly toxic nitrosonium-ion (NO_2^+), which attacks the phenyl radicals of protein molecules, namely tyrosine. In this case, the violation of the signal transmission mechanism in the CNS is damaged.

Under the $ONOO^-$ side, superoxide dismutase undergoes both reversible and irreversible oxidative changes and loses activity. Inhibition of SOD activity enhances the effect of neurotoxicity.

The antioxidant activity of 4-((3-methyl-3,7-dihydro-7-ethyl-1H-purin-2,6-dion-8-yl)amino)propanoic, butanoic and hexanoic acids in the experiment under inhibition of SOD by Nitrogen active forms ($NO^{\bullet}$ and $ONOO^-$) has been investigated. The antioxidant activity of the researched compounds was evaluated by the $NO^{\bullet}$ induction method *in vitro*. The induction was carried out by the action of light on samples with $Na_3[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ from a 300W source with a wavelength of 425 nm, focusing it with a lens and passing it through the water filter to prevent overheating. Irradiation of aqueous solutions of sodium nitroprusside (1,0 mM) was carried out for 30 min in a quartz cuvette with an optical path length of 1 mm. The efficiency of $NO^{\bullet}$ generation (in the control experiment) and the antioxidant activity of the researched substances were tested by the rate of oxidation of 40 μM of ascorbic acid at 265 nm. The researched substances were added to the samples before irradiation at a concentration of 10^{-6} M. The optical density was measured before and after irradiation. The antioxidant activity was expressed as a percentage of ascorbic acid oxidation. The antioxidant activity of substances was studied under the SOD inhibition on the model of nitrosative stress *in vitro*. The researches were carried out in the supernatant obtained from the brain of white Wistar rats (weight 200-250 grams). After decapitation, the rats brain was quickly removed and washed in ice-cold isotonic solution, homogenized in five volumes of 50 mM Tris-HCl buffer (pH = 7,4) cooled to 5°C, containing 0,5 mM Na_2EDTA and 1 mM dithiothreitol. The homogenate was centrifuged at 11000g for 30 min at 4°C. For modelation of nitrosative stress the dinitrosole complex of iron with cysteine, as a stable $NO^{\bullet}$ complex, which can be considered as a transport form of this radical, which provides a long-term inhibitory effect on various groups of proteins was used [1, 5]. A stable $NO^{\bullet}$ cysteine complex was added to the supernatant (content of protein is 5 mg/ml) at a concentration of 100 μM and incubated for 10 min at the temperature of 4°C. The researched substances were added before incubation at a concentration of 10^{-6} M. For assessing the degree of nitrosative stress *in vitro* and

activity of compounds, the products of protein oxidative modification were researched. SOD activity was also determined. In an aliquot of the supernatant, the protein was precipitated with a 20% trichloroacetic acid solution. 1 ml of a 0.1 M solution of 2,4-dinitrophenylhydrazine in 2 M hydrochloric acid was added to the denatured proteins and incubated at 37°C for 1 hour. After incubation, the samples were centrifuged at 3000g for 20 min. The precipitate was washed three times with a mixture of ethanol–ethyletanoate (1:1). The precipitate was dried in a thermostat at 40°C and then dissolved in an 8 M urea solution. Urea was added in a volume of 3 ml. To improve solubility, 0.01 ml of 2 M hydrochloric acid solution was added. The optical density of 2,4-dinitrophenylhydrazones was recorded at a wavelength of 274 nm (carbonyl compounds) and 363 nm (carboxylic compounds). The degree of protein oxidative modification was measured in units of optical density per 1 g of protein.

The method of determination the activity of SOD is based on the ability of adrenaline to autoxidize in an alkaline medium with the formation of a superoxide radical. In the presence of SOD, the reaction is inhibited. 4.4 ml of a 0.5 mM hydrogen carbonate buffer solution (pH = 10.2) was added to a cuvette of a spectrophotometer with an optical path of 1 cm; 0.1 ml of the supernatant and 0.5 ml of an adrenaline solution in citric acid were added. The kinetics of reaction was fixed at 480 nm. SOD activity was expressed in units per 1 mg of protein · min [2].

N-acetylcysteine was chosen as a reference drug.

Statistical data analysis was carried out using the Statistic for Windows software package. To assess the significance of differences between groups, the Mann-Whitney test was used.

4-((7-Ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1*H*-purin-2,6-dion-8-yl)amino)propanoic, butanoic and hexanoic acids showed expressed antioxidant activity in test of photoinduction of $Na_3[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$. At the same time, the compound 4-((7-ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1*H*-purin-2,6-dion-8-yl)amino)butanoic acid showed the maximal activity (51%).

The modeled nitrosative stress in the rats brain supernatant was characterized by inhibition of the activity of the antioxidant enzyme – superoxide dismutase, as well as increasing in the formation of protein oxidative modification products that react with 2,4-dinitrophenylhydrazine with maximum absorption at 270 and 363 nm. Thus, the activity of SOD decreased by 52.6%, and the products of oxidative modification of protein observed at 270 nm increased by 87.5%, and at 363 nm – by 65.2%.

Other objects of the destructive effect of nitrosative stress are antioxidant enzymes, an inhibition of which is due to the formation of nitrosol complexes with metals that are part of the active centers of enzymes.

Decrease of activity of antioxidant enzymes and the level of thiol antioxidants, hyperproduction of NO_2^+ and OH^- during the decay of $ONOO^-$ leads to a significant increase in the level of free radical oxidation.

Decrease of SOD activity is due to the interaction of nitrosonium-ions with

copper(I)-ions, which are part of the SOD prosthetic group. Under conditions of nitrosative stress, unfavorable conditions for cell life are created: the activity of tyrosine kinases and other enzymes of oxidative reactions is inhibited, protein phosphorylation is disturbed. Addition of 4-((7-ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1*H*-purin-2,6-dion-8-yl)amino)butanoic acid (at a concentration of 10^{-6} M) into the incubation medium before modeling of nitrosative stress led to limited inhibition of SOD.

Thus, the researched substance reduced the formation of 2,4-dinitrophenylhydrazones by 34,1% and 65,8%, N-acetylcysteine by 13,7% and 18,9%, respectively, 4-((7-ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1*H*-purin-2,6-dion-8-yl)amino)butanoic acid prevented the modification of SOD during nitrosative stress. The activity of SOD in samples with 4-((7-ethyl-3,7-dihydro-3-methyl-1*H*-purin-2,6-dion-8-yl)amino)butanoic acid was significantly higher by 65.8% than in nootropic ones.

In the case of N-acetylcysteine, SOD activity was only 23,2% higher. N-acetylcysteine is able to bond $NO^{\bullet}$ with the formation of nitrosocompounds, and after interaction with $ONOO^{-}$ or NO_2^{+}, sulfoximes are formed. N-acetylcysteine competes for active forms of Nitrogen with sulfhydryl groups of proteins, reducing the development of necrosis and the creation of nitrotyrosine.

References

1. А.Ф. Ванин, Динитрозольные комплексы железа и *S*-нитротиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – Т.63, Вып.7. – С. 924-938.

2. Ю.І. Губський, Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у дослідах *in vitro* / Ю.І. Губський [та ін.] // Метод. реком. – Київ: ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.

3. Y. Chen, Synthesis and biological activities of novel methylxanthine derivatives / Y. Chen, B. Wang. Chem. Res. Chin. Univ. – 2014. – Vol. 30. – P. 98-102.

4. B. Scott, Oxidative stress, oxidants and antioxidants [Text] / B. Scott, O. Auroma // Exp. Physiol. – 1999. – Vol. 8. – P. 291-295.

5. Nitrosonium [Электронный ресурс]: Nitroxyl Anion to Downregulate NMDA Receptor Activity, Ameliorating Neurotoxicity– Режим доступа: https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/nitrosonium – Дата доступа: 07.09.2022.

ПОЛУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО 7-НИТРОБЕНЗОКСАДИАЗОЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ВАНКОМИЦИНА

Глинская Лилия Игоревна
Стажёр младшего научного сотрудника, лаборатории биохимии лекарственных препаратов НИИ ФХП, Белорусский государственный университет, Минск
lilyaglinskaya@gmail.com
Кузьменок Анастасия Сергеевна
Студентка 4 курса Белорусского государственного медицинского университета, Минск
anastasiya_alekseeva153@mail.ru
Фалетров Ярослав Вячеславович
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск
yaroslav82@tut.by
Шкуматов Владимир Макарович
д.б.н., профессор, заведующий лаборатории биохимии лекарственных препаратов научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, Минск
biopharm@bsu.by

Цель исследования – разработать эффективную методику получения флуоресцентного 7-нитробензоксадиазольного (NBD) производного антибиотика ванкомицина. Методы: органический синтез, масс-спектрометрия, TLC, микробиологические. С помощью оригинальной методики, включающей проведение модификации ванкомицина NBD-Cl в смеси диметилсульфоксид/ацетонитрил с последующим высаждением петролейным эфиром, позволяющим одновременную отмывку продукта от избытка NBD-Cl и ряда побочных продуктов. Производные (NBDVanc, NBD_2Vanc) сохранили способность подавлять рост грам-положительных бактерий Bacillus subtilis.

Ключевые слова: *7-Нитробензоксадиазол (NBD); ванкомицин.*

SYNTHESIS OF FLUORESCENT 7-NITROBENZOXADIAZOLE DERIVATIVE OF VANCOMYCIN

Glynskaya Liliya Igorevna
Trainee of junior researcher of Laboratory of Biochemistry of Medical Drugs, Research Institute for Physical-Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk
lilyaglinskaya@gmail.com

Kuzmenok Anastasia Sergeevna
4 year student of Belarusian State Medical University, Minsk
anastasiya_alekseeva153@mail.ru
Faletrov Yaroslav Vycheslavovich
C.Ch.Sc., Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Biochemistry of Medicinal Products, Research Institute of Physical and Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk
yaroslav82@tut.by
Shkumatov Vladimir Makarovich
Dr.B.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of Drugs of the Research Institute of Physical and Chemical Problems of the Belarusian State University, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
biopharm@bsu.by

The aim of the study is to develop effective method for synthesis fluorescent 7-nitrobenzoxadiazol (NBD) derivative of vancomycin. Methods: organic synthesis, mass-spectrometry, TLC; microbiology. Using an original method, including modification of vancomycin by NBD-Cl in a mixture of dimethylsulfoxide/acetonitrile followed by sedimentation by petrol ether allows simultaneous washing of NBD-Cl excess and some hydrophobic side-products. The products (NBDVanc, NBD_2Vanc) save ability of their precursor to suppress growth of gram +ve bacteria Bacillus subtilis.

Key words: *7-nitrobenzoxadiazol (NBD); vancomycin.*

Ванкомицин (vancomycinum, ВАН) – антибиотик из группы трициклических гликопептидов, выделенный из Amycolatopsis orientalis. Механизм действия ВАН в отношении грамположительных бактерий обусловлен его способностью ингибировать биосинтез клеточной стенки путем образования стабильных комплексов с С-концевыми дипептидными остатками пептидогликана D-Ala-D-Ala [1]. Использование флуоресцентно-меченных производных ВАН позволяет наблюдать специфическую флуоресценцию клеточной стенки бактерий, а также области деления клеток из-за протекания в ней активного биосинтеза пептидогликана [2–4].

Материалы и методы. Все реагенты были производства Sigma-Aldrich. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol (силикагель на подложке из алюминия). Масс-спектрометрию осуществляли на приборе Shimadzu LCMS2020. Непатогенный штамм бактерий *B. subtilis* культивировали на жидкой питательной среде LB при 200 оборотах в минуту и 37С, вещества добавляли в концентрации 100 мкг/мл.

Результаты и обсуждение. Путем модификации ВАН реагентом 7-нитробензофуразан-4-ил хлоридом (NBD-Cl) с помошью оригинальной

методики, включающей первичное проведение реакции в смеси диметилсульфоксид/ацетонитрил с последующим осаждением продукта петролейным эфиром в сочетании с центрифугированием. Такой подход позволяет экспрессно получить чистый продукт, минуя необходимость проведения врмя затратной колоночной хроматографии. Чистота и идентичность продукта подтверждалась с помощью ТСХ (Rf = 0,3 против Rf = 0 для в SiO2/ацетон: уксусная кислота 4:1). Масс-спектрометрический анализ в режиме положительной ионизации выявил образование двух продуктов: моно- (NBDVanc) и ди-NBD- (NBD2Vanc, рисунок 1) производных, молекулы которых при масс-спектрометрическом анализе дали ионы с сигналами m/z 1612 и 1777, соответственно (рисунок 2).

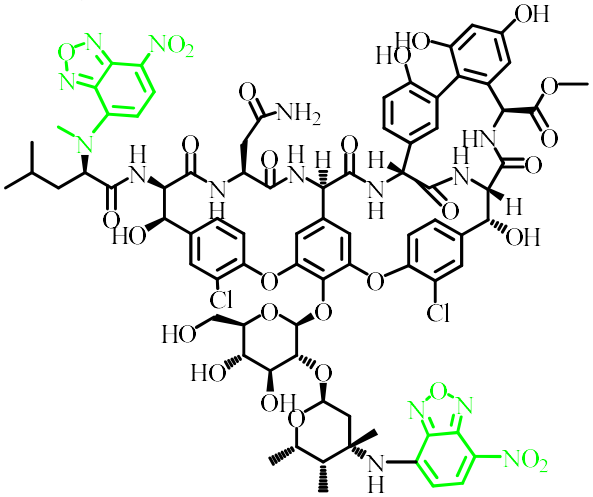


Рисунок 1 – Структурная формула NBD2Vanc.

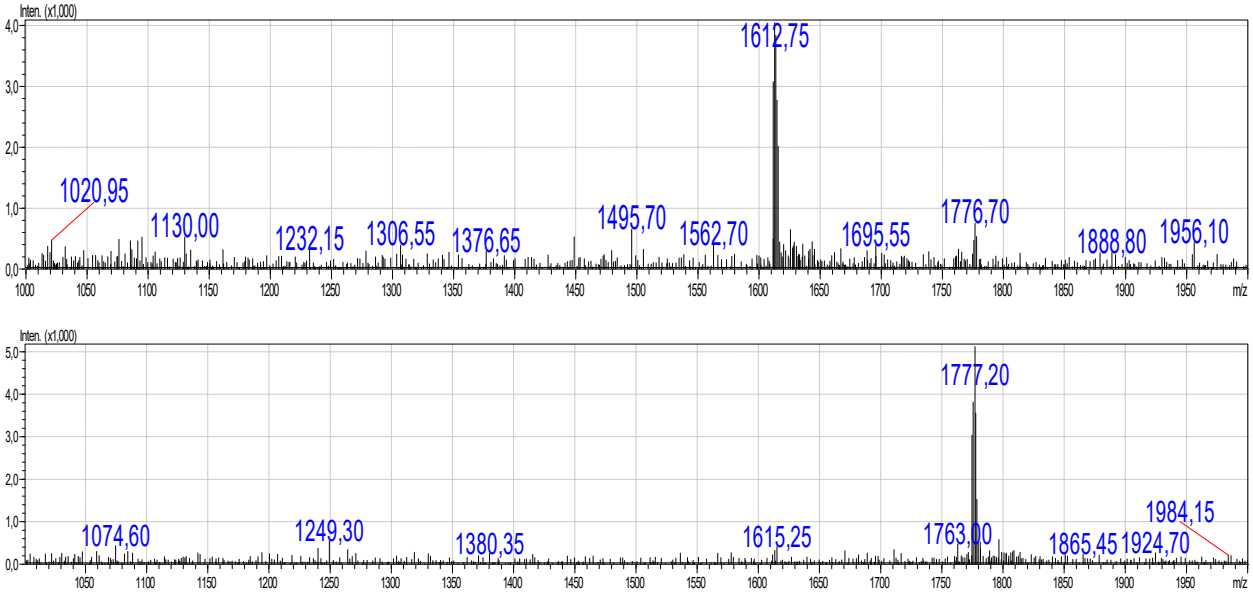


Рисунок 2 – Масс-спектры, показывающие сигналы положительных ионов типа [M+H]+ с m/z 1612 и 1777, соответствующие рассчитанным молекулярным массам NBDVanc и NBD2Vanc.

Показано, что NBDVAN и NBD2Vanc сохраняет способность подавлять рост граммположительных бактерий *Bacillus subtilis*. Из данных литературы о новом гликопептидном антибиотике телаванцине, являющегося гидрофобным производным ВАН, можно предположить, что NBD2Vanc также может быть применим в отношении штаммов, приобретшим резистентность в отношении препарата -прототипа, однако это требует детальных микробиологических исследований [5]. На данный момент, полученные производные могут использоваться как молекулярные пробы для исследования бактерий методами флуоресцнтной микроскопии.

Заключение. С помощью оригинальной методики, включающей проведение модификации ванкомицина NBD-Cl в смеси диметилсульфоксид/ацетонитрил с последующим высаждением петролейным эфиром, позволяющим одновременную отмывку продукта от избытка NBD-Cl и ряда побочных продуктов. Производные (NBDVanc, NBD2Vanc) сохранили способность подавлять рост грам-положительных бактерий *Bacillus subtilis*.

Финансирование работы. Работа проведена при поддержке грантов ГПНИ № г.р. 20210560 (Я.В.Фалетров, В.М. Шкуматов). Авторы благодарят студентку химфака 2021 года выпуска Барановскую Анну Александровну за помощь в разработке методики.

Список литературы

1. Pedro M. Pereira, Sergio R. Filipe, Alexander Tomasz et. al. Fluorescence Ratio Imaging Microscopy Shows Decreased Access of Vancomycin to Cell Wall Synthetic Sites in Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – Vol. 51. – P. 3627-3633.

2. Lu Miao, Weiwei Liu, Qinglong Qiao et. al. Fluorescent antibiotics for real-time tracking of pathogenic bacteria // J. Pharm. Anal. – 2020. – Vol. 10. – P. 444-451.

3. J.N. Louvet, C. Carrion, T. Stalder et. al. Vancomycin sorption on activated sludge Gram+ bacteria rather than on EPS; 3D Confocal Laser Scanning Microscopy time-lapse imaging // Water Res. – 2017. – Vol. 124. – P. 290-297.

4. Ling Gui Ning, Shuai Wang, Xue Feng Hu et. al. Vancomycin-conjugated polythiophene for the detection and imaging of Gram-positive bacteria // J. Mater. Chem. B. – 2017. – Vol. 5. – P. 8814-8820.

5. L. Charneski, Telavancin: a novel lipoglycopeptide antibiotic / Charneski, L., Patel, P.N., and Sym, D.//. Ann. Pharmacother - 2009. – Vol. 43. – P. 928–938.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ НАПИТКИ: СОСТАВ, ВЛИЯНИЕ НА ОРГАНИЗМ

Глинский Станислав Павлович
студент УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
stanislavglinskiy_bsmu@mail.ru
Юзефович Ольга Николаевна
старший преподаватель кафедры медицинской химии, УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
o.yuzefovic4@gmail.com

Актуальность: молодое поколение часто отдает предпочтение широко разрекламированным напиткам-энергетикам, не задумываясь о их негативном влиянии на организм.

Цель: установить характер воздействия энергетических напитков на организм, подтвердить или опровергнуть теорию о гипервитаминозах, возникающих на фоне систематического употребления этих напитков.

Методы исследования: анализ состава различных энергетических продуктов, который заявлен производителем, сравнение этих сведений с принятыми нормами МЗ РБ; социологический опрос студентов различных ВУЗов РБ, употребляющих энергетические напитки; t-тест для относительных величин.

Основные результаты работы: при употреблении исследованных продуктов не более одной упаковки (450 мл) в сутки, явление гипервитаминоза на фоне негативных проявлений (поллакиурия, повышенная эмоциональность, бессонница, аддикция) не установлено.

Ключевые слова: *энергетические напитки; гипервитаминоз, вызванный избыточным их употреблением.*

ENERGY DRINKS: COMPOSITION, EFFECT ON THE BODY

Glinsky Stanislav Pavlovich
student of Belarusian State Medical University, Minsk
stanislavglinskiy_bsmu@mail.ru
Yuzefovich Olga Nikolaevna
Senior Lecturer, Department of Medical Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
o.yuzefovic4@gmail.com

Relevance: the younger generation often prefers widely advertised energy drinks, without thinking about their negative impact on the body.

Purpose: to establish the nature of the impact of energy drinks on body, to confirm or refute the theory of hypervitaminosis that occurs due to the systematic use of these drinks.

Research methods: analysis of the composition of various energy products, declared by the manufacturer, comparison of these data with the accepted norms of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, a sociological survey of students of various universities of the Republic of Belarus, who consume energy drinks, t-test for relative values.

The main results of the work: during people's using the studied products no more than one package (450 ml) per day, the phenomenon of hypervitaminosis against the background of negative manifestations (pollakiuria, heightened emotionality, insomnia, addiction) has not been established;

Key words: *energy drinks; hypervitaminosis due to their excessive use.*

Результаты социологического опроса студентов различных ВУЗов РБ. (доверительные интервал представлен с условием p=95%).

Всего анкетирование прошел 101 человек. По половой принадлежности респонденты разделились следующим образом: мужчины – 25,7±9%, женщины – 74,3±9%. Мужчины употребляют напитки-энергетики чаще, чем женщины (♀: всего: 75 жен; употребляют: 28 жен; m_p=0,056; ♂: всего: 26 муж; употребляют: 17 муж; m_p=0,093 => $t_{иск}$=2,58; $t_{иск}\geq 2$ (при p=95%) => *разность считается достоверной*). Разделение по возрастной группе составило «14-18» - 49,5±14,14 %; «19-23» - 48,5±14,28 %, оставшийся процент – люди «старше 23». Среди респондентов энергетические напитки (— далее ЭН) употребляют 55,4±9,89%. С учетом лидирующего возрастного признака употребление ЭН разделилось следующим образом: «14-18» - 44,6±14,06%, «19-23» - 39,8±13,99%. Среди употребляющих регулярно напитки-энергетики (– группа А) установлено, что 95,6±6% имеют в кругу общения знакомых/друзей, которые употребляют энергетические напитки, а среди лиц, не употребляющих напитки-энергетики (– группа Б), процент присутствия таких людей – составил 78,6±11%. (Группа А: 45; доля употребляющих лиц из круга общения: 0,956; m_p=0,031; Группа Б: 56, доля употребляющих лиц из круга общения: 0,786, m_p=0,054; => $t_{иск}$=2,71; $t_{иск}\geq 2$ (при p=95%) => *разность считается достоверной*). В группе А 82,2±11,4% человек обладают знанием о вреде напитков-энергетиков, а в группе Б – 78,6±10,96%. (Группа А: 45; доля лиц, знающих о вреде: 0,822; m_p=0,057; Группа Б: 56; доля лиц, знающих о вреде: 0,786, m_p=0,055; => $t_{иск}$= 0.46 => $t_{иск} < 2$ (при p=95%) => разность считается *не достоверной*). Действие кофеина в группе А ощущают 60±14,6% респондента, а в группе лиц, редко употребляющих ЭН (далее – А`), ощущают 18±19,8% (Группа А: 45; доля лиц, чувствующих действие кофеина: 0,6; $m_p$= 0,073; Группа А`:15, доля лиц, чувствующих действие кофеина: 0,18; m_p= 0,099 => $t_{иск}$= 3,41 ≥2 (при p=95%) => *разность считается достоверной*). В группе А отмечается использование поливитаминных комплексов (14,3±10,22%), а в группе Б процент составил 19,6±10%. По версии опрашиваемых основной вред приходится на нервную, сердечно-сосудистую и

пищеварительную системы. Анкетирующие выделяли следующие причины употребления ЭН: для получение вкусового удовольствия, для активной деятельности головного, «за компанию вместе с друзьями». Также респонденты отмечали положительные эффекты от ЭН (улучшение настроения, улучшение деятельности головного мозга, уверенность в себе) и отрицательные эффекты (бессонница, поллакиурия, повышенный эмоциональный фон, формирующаяся аддикция, ухудшение памяти).

Таблица 1 – Таблица витаминов энергетического напитка «GORILLA», которые не соответствуют принятым МЗ РБ нормам.

Витамины	FLASH UP ENERGY ($V_{напитка}$=450 мл)	Норма по постановлению министерства здравоохранения Республики Беларусь (мг/сутки) [7]		
		14 - 18 лет		18 - 59 лет
		юноши	Девушки	
B3	26,6	20	18	20
B5	6,8	5	4	5
B6	2,7	2	1,6	2

Таблица 2 – Таблица витаминов энергетического напитка «GORILLA», которые не соответствуют принятым МЗ РБ нормам.

Витамины	Gorilla (мг/ 100 $см^3$)	ИТОГО ($V_{напитка}$=450 мл)	Норма по постановлению министерства здравоохранения Республики Беларусь (мг/сутки)[7]		
			14 - 18 лет		18 - 59 лет
		мг в 450 мл	юноши	Девушки	
B5	0,96	4,32	5	4	5
B7	0,024	0,108	0,05	0,05	0,05
B12	0,00083	0,003735	0,003	0,003	0,003

Анализ витаминного состава и химических компонентов энергетических напитков на примере двух продуктов «FLASH UP ENERGY» (далее – FUE) в таблице 1 и «GORILLA» (– G) в таблице 2.

При превышении норм употребления исследуемых напитков возможны следующие негативные последствия для организма человека, перечисленные в таблице 3.

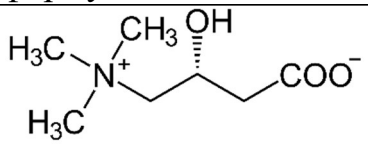
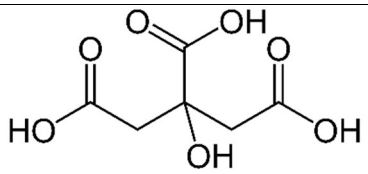
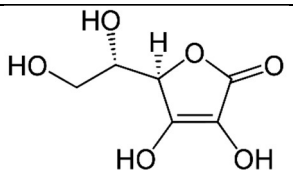
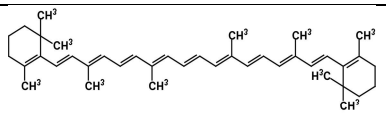
Вывод: явление гипервитаминоза от употребления «GORILLA», «FLASH UP ENERGY» сводится к нулю, так как водорастворимые витамины группы B

полностью выводятся с мочой, при употреблении данных продуктов в рекомендованных дозах (450 мл/сутки).

Таблица 3 – Негативные эффекты гипервитаминоза

Витамин	Эффект гипервитаминоза
B3	Гиперемия лица, аллергическая реакция, потливость, тахикардия, тошноту, рвоту, диарею.
B5	Проявляется диареей и другими расстройствами пищеварения [5].
B6	Прогрессирующая атаксия, потеря вибрационной чувствительности нижних конечностей (болевая, температурная и тактильная чувствительная сохранены) [5].
B7	Приводит к учащённому мочеиспусканию и повышенному потоотделению [5].
B12	Неврологическая дисфункция, когнитивные расстройства.

Таблица 4 – Химические вещества энергетического напитка «GORILLA» и их влияние на организм

Название вещества	Химическая формула	Влияние на организм
L-Картинин		Способствует удалению ксенобиотиков, ↓ уровень общего холестерина и триглицеридов, ↑ липопротеиды высокой плотности.
Лимонная кислота (E330) и цитрат натрия (E331)		Ускоряет метаболизм.
Аскорбиновая кислота (E300)		Участвует в реакциях образования: коллагена, серотонина, катехоламинов, кортикостероиды. Влияет на синтез интерферонов.
β-Каротин(E160A)		При употреблении в больших дозах может спровоцировать рак легких.

Также был проведен анализ количества кофеина и таурина в исследованных продуктах и негативного действия при превышении суточной нормы.

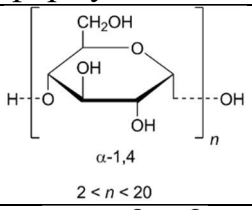
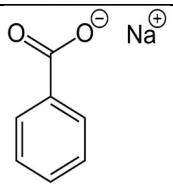
Норма **кофеина**: <400 мг в сутки, за 1 прием – не более 100-200 мг; норма **таурина**: 500-2000 мг в сутки [4]. В 1 упаковке (450 мл) ЭН «FUE» содержание

кофеина составляет 117,5 мг, таурина – 540 мг. А в ЭН «G» содержание кофеина – 135 мг, а таурин отсутствует. Действие превышенной дозы кофеина: у взрослых вызывает артериальную гипертензию, инсулинорезистентность, диабет 2-го типа, у беременных – недоношенность, патологию плода или его гибель, у детей – неврологические и сердечно-сосудистые нарушения, депрессию, снижение когнитивных способностей. Действие превышенной дозы таурина: у взрослых усиливает негативные эффекты кофеина, перевозбуждает нервную систему, обостряет язвы, гастрит, у детей – провоцирует таурин-индуцированную токсическую энцефалопатию [4].

Вывод: исследованные напитки-энергетики можно употреблять не более 3-х упаковок (по 450 мл) в сутки. При этом полностью исключить из рациона другие напитки и лекарства, содержащих кофеин и таурин.

Также в процессе работы был проведен анализ влияния всех компонентов, содержащихся в составе указанных продуктов на организм человека (таблицы 4, 5).

Таблица 5 – Химические вещества энергетического напитка «FLASH UP ENERGY» и их влияние на организм

Название вещества	Химическая формула	Влияние на организм
Маталь-декстрин (патока)		Может вести к набору веса, повышению уровня холестерола и триглицеридов в крови [6].
Бензоат натрия (Е211)		Является консервантом, способен провоцировать аллергические реакции, обладает кумулятивным свойством.

Негативное влияние, входящих в состав напитка «FLASH UP ENERGY», сорбата калия (Е202), сахарного колера I(Е150А) не установлено. В данном продукте также присутствует лимонная кислота (Е330) и цитрат натрия (Е331) (см. табл. 4).

Список литературы

1. Л.Д. Шалыгин, Р.А. Егарян Энергетические напитки – реальная опасность для здоровья детей, подростков, молодежи и взрослого населения. Часть 1. Состав энергетических напитков и влияние на организм их отдельных компонентов // Профилактическая медицина. – 2016. – №1. – С. 56-63.

2. Л.К. Хныченко, Н.С. Сапронов, Фармакологическая активность аминокислоты таурина // Обзоры по клинической. фармакологии. и лекарственной терапии. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 15-19.

3. П.Ф. Литвицкий Нарушения обмена витаминов // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – №4. – С. 40–47.

4. Nutrition, Health, and Regulatory Aspects of Digestible Maltodextrins / D. L. Hofman [et al.] // Crit Rev Food Sci Nutr. – 2016. – Vol. 56. – P. 2091-2100.

5. Акт МЗ РБ "Об утверждении Санитарных норм и правил «Требования к питанию населения: нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Республики Беларусь» и признании утратившим силу постановления МЗ РБ от 14 марта 2011 г. № 16" от 20.11.2012 №180.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОГО КОНТЕНТА С ЭЛЕМЕНТАМИ ДИСТАНЦИОННОГО И СМЕШАННОГО ОБУЧЕНИЯ В ОБРАЗОВАТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ

Гольцев Михаил Всеволодович
к.ф-м.н., доцент, заведующий кафедрой медицинской и биологической физики УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск
mgoltsev@mail.ru
Белая Ольга Николаевна
к.ф-м.н., доцент кафедры медицинской и биологической физики УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск
medbiophiz@bsmu.by
Кухаренко Людмила Валентиновна
к.ф-м.н., доцент кафедры медицинской и биологической физики УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск
medbiophiz@bsmu.by
Гольцева Марина Владимировна
старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск
mgoltseva@yandex.ru
Гузелевич Ирина Александровна
старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск
medbiophiz@bsmu.by

Аннотация: в работе представлены некоторые аспекты применения электронных образовательных ресурсов при подготовке студентов на теоретической кафедре медицинского университета, в том числе в условиях неблагоприятной эпидемиологической обстановки.

Ключевые слова: *фармацевтическое образование, электронный образовательный ресурс, дистанционное и смешанное обучение.*

SOME ASPECTS OF APPLICATION OF ELECTRONIC CONTENT WITH ELEMENTS OF DISTANCE AND BLENDED LEARNING IN THE EDUCATIONAL PROCESS

Goltsev Mihail Vsevolodovich
C.P-M.Sc., Associate Professor, Head of the Department of Medical and Biological Physics, Belarusian State Medical University, Minsk
mgoltsev@mail.ru
Belaya Volha Nikolaevna
C.P-M.Sc., Associate Professor, Department of Medical and Biological Physics, Belarusian State Medical University, Minsk
medbiophiz@bsmu.by

KukharenkoLydmila Valentinovna
C.P-M.Sc., Associate Professor, Department of Medical and Biological Physics, Belarusian State Medical University, Minsk
medbiophiz@bsmu.by
Goltseva Marina Vladimirovna
Senior Lecturer, Department of Medical and Biological Physics, Belarusian State Medical University, Minsk
mgoltseva@yandex.ru
Guzelevich Irina Alexandrovna
Senior Lecturer, Department of Medical and Biological Physics, Belarusian State Medical University, Minsk
medbiophiz@bsmu.by

Annotation: some aspects of application of electronic educational resources for training students at theoretical department of medical university including teaching in an unfavorable epidemiological situation are presented in the work.

Key words: *the higher pharmaceutical education, electronic educational resource, distance education and blended learning.*

Современные методики дистанционного и смешанного обучения в современном высшем медицинском и фармацевтическом образовании – способ организации процесса обучения, основанный на использовании информационных технологий, позволяющих осуществлять обучение и контроль за усвоением материала с помощью компьютерной сети Интернет на расстоянии без непосредственного контакта между преподавателем и учащимся, это внедрение электронного контента и активное использование новых информационных систем и цифрового учебного оборудования в образовательном процессе, взаимодействия в видеосистемах удаленного присутствия. В данном контексте можно уверенно говорить о появлении термина «медийная среда образования» как новой открытой среде в информационном обществе, что дает уникальные возможности для непрерывного образования и самообразования [1]. Целью настоящего исследования являлся анализ использования дистанционного и смешанного обучения с применением электронного контента для организации самостоятельной работы студентов на кафедре медицинской и биологической физики Белорусского государственного медицинского университета по освоению учебного материала ряда учебных дисциплин естественнонаучного профиля с чередующимися компонентами очного и заочного обучения, при котором теоретическую подготовку по изучаемой теме студенты проводят самостоятельно по указанным преподавателем учебным материалам, в первую очередь по электронным.

Методы дистанционного и смешанного обучения с применением электронного контента, предложенные для организации самостоятельной

работы студентов, включали в себя использование электронных ресурсов на платформе SunRav Software и в широко распространенной бесплатной программной оболочке LMS MOODLE. Учащиеся получают информацию дома по видео лекциям с использованием дистанционных информационно-коммуникационных технологий, им предоставляется доступ к электронным образовательным ресурсам для домашней подготовки, а на занятии в классе на основе этого выполняются практические задания по этим темам. Преподаватель не только методически организовывал эти занятия, но и консультировал студентов, направляя их практическую работу. Производился анализ ряда зарубежных электронных информационных ресурсов и программных оболочек, реализованных в системе дистанционного обучения в разных странах и регионах: REDCLASS, WebTutor, TopClass, Sakai, Kseny, STELLUS, АСДО «ДОЦЕНТ», СДО «ОРОКС», «Прометей» 4.0 , СДО Competentum.Magister, eLearning 3000, а также бесплатной платформы типа широко используемой LMS MOODLE [2].

Можно уверенно констатировать факт, что в системе медицинского (по стандартной программе MD) и фармацевтического образования, в отличие от других специальностей, прежде всего гуманитарного профиля, дистанционные курсы являются поддерживающими при наличии регулярных аудиторных занятий с учетом специфики обучения - дистанционные программы не подходят для развития коммуникабельности и овладения профессиями, где необходимо много практики. Для студентов же заочной формы обучения созданная учебно-образовательная среда, насыщенная электронным контентом, позволяет работающим студентам совмещать учебу с работой, обеспечивая принцип «образование без границ». Преподаватель должен обладать не только искусством модератора, но и обладать высоким профессионализмом и быть активным пользователем IT-систем при организации этих занятий [3].

Вместе с тем очевидно, что здесь возрастает доля ответственности самого обучающегося и стимулируется развитие его личностных характеристик и метапредметных навыков [4]. На примере развития дистанционного обучения современное общество убедилось в том, что инфокоммуникационные технологии повышают ценность образования как важнейшего компонента развития личности и общества, а дистанционное обучение – это технология, которая сама по себе представляет ценность, поскольку формирует возможности развития личности в образовании, ее способности адаптации к сложному и противоречивому миру, тем самым предоставляя гражданам ресурсы для участия в жизни общества. Обзор указанных выше зарубежных программных оболочек REDCLASS, WebTutor, TopClass, Sakai, Kseny, STELLUS, АСДО "ДОЦЕНТ", СДО "ОРОКС", система "Прометей" 4.0 , СДО Competentum.Magister, система eLearning 3000 показал, что все они имеют свои возможности, преимущества и ограничения [2].

Первый опыт использования электронных ресурсов SunRav Software в отечественном высшем фармацевтическом образовании начался с внедрением компьютерного тестирования и создания электронных учебников [3]. Однако у платформы SunRav был ряд недостатков, ограниченность в правах администрирования и редактирования материала. Поэтому ещё с 2013 года медицинские университеты начали использовать бесплатную оболочку LMS MOODLE, хорошо подходившую для дистанционного обучения и тестирования, позволявшую контролировать активность и время работы студентов, предоставлявшую преподавателям - разработчикам дистанционных курсов права администратора курса: размещение учебных материалов любых форматов, аудио и видео фрагменты или другие учебные материалы в аудио/видео формате; организацию среды интерактивного общения учителя и учащихся; создание системы контроля знаний; постоянный мониторинг всех действий учащихся. Образовательный процесс представляет собой точную модель реального образовательного процесса, зарегистрированные в системе дистанционного обучения студенты разделены на группы и курсы и подписаны на учебные дистанционные курсы, в соответствии с учебным планом LMS MOODLE позволяла также предоставлять дидактические материалы и в интерактивном режиме отвечать на вопросы обучаемого в процессе его домашней подготовки.

Система дистанционного обучения позволяет не только использовать высоко насыщенный электронный контент, размещать материалы курса лекций в любом удобном преподавателям формате, но и организовать виртуальный лабораторный практикум, а также как тренировочные тесты для самоподготовки, так и контрольные тесты с любым количеством вопросов с фиксированным числом попыток, что с успехом было применено как в текущем контроле знаний и как первый этап государственного экзамена для студентов заочной формы обучения по специальности «Фармация» [2].

Пятилетняя практика работы по применению системы дистанционного обучения с использованием LMS MOODLE показала активизацию процесса изучения предложенных дисциплин. Сравнительной анализ роста общей успеваемости в группах, пользующимися данными методиками на 100%, составил порядка 22,3 %, по сравнению с группами, применяющими данные методики менее активно. Также в указанных группах достигнута 100% успеваемость на итоговых занятиях, что также в определенной степени связывается нами с использованием указанных методик.

Особенно необходимо выделить практически двухлетний опыт работы по применению системы дистанционного обучения с использованием LMS MOODLE вкупе с использованием видеолекций и видеоуроков, записанных в видеоформате, используемым YouTube, что позволило практически без потерь качества обучения проводить весь комплекс занятий по изучению имеющихся

дисциплин. Простой статистический анализ показал 93% успеваемость на итоговых занятиях, что можно в определенной степени считать успехом применения указанных выше методик.

Вместе с тем опыт применения указанных методик показал как преимущества, так и определенные недостатки указанных технологий обучения. К неоспоримым достоинствам можно отнести не только возможность прочитать необходимую информацию, но и визуализировать ее, при этом существенно сокращалось время получения информации и нахождения у компьютера, а нетрадиционная форма организации обучения активизировал интерес к предмету.

К отрицательным аспектам (и в первую очередь со стороны преподавателя) также можно отнести существенные временные и интеллектуальные затраты на подготовку заданий, необходимость нового формата учебной педагогической нагрузки и квалификации преподавателя. Оказалось также, что не все студенты оказываются готовы взять на себя ответственность за своё обучение. Отметим также ряд технических проблем, связанных как с лимитом каналов передачи информации и обеспеченности компьютерной техникой, так и с некоторыми ограничениями возможностей программной оболочки LMS MOODLE в части процесса наполнения электронным контентом [5].

Тем не менее, очевидно, что использование дистанционных электронных образовательных ресурсов в учебном процессе, исключающем личный контакт преподавателя и обучающегося, а также на заочных отделениях в медицинском университете дает бесценную помощь студентам в условиях неблагоприятной эпидемиологической обстановки, а также студентам-заочникам получить образование без отрыва от работы и в безопасном режиме [6]. Дополняя традиционные формы обучения, дистанционные электронные технологии с насыщенным электронным контентом в современной заочной форме высшего медицинского и фармацевтического образовании в указанных выше условиях являются фактически приоритетными. Также дистанционное обучение имеет массу других преимуществ: выполнение заданий в собственном темпе, в любое удобное время суток, с любой точки мира через Интернет. В этом состоит важнейшая гуманитарная особенность дистанционного обучения – гибкость.

Список литературы

1. Инновационные обучающие технологии в медицине: сборник материалов Республиканской науч.-практ. Конф. с международным участием. /гл. ред.: проф. А.Т. Щастный. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 767 с.

2. Использование LMS MOODLE в системе дистанционного обучения биофизике в заочном высшем фармацевтическом образовании / М.В. Гольцев [и др.]. / Инновационные подходы в образовательном процессе высшей школы: национальный и международный аспекты: электронный сборник статей

международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию Полоцкого государственного университета, Новополоцк, 8-9 февр. 2018 г. / ПГУ; под. ред. Ю. П. Голубева, Н. А. Борейко. – Новополоцк, 2018.– С.103 – 106.

3. Фундаментальная наука и образовательная практика : материалы XI Респ. науч.-методолог. семинара «Актуальные проблемы современного естествознания», Минск, 3 дек. 2020 г. / редкол.: В. А. Гайсёнок (пред.) [и др.]. – Минск : РИВШ, 2020. – 320 с.

4. Гольцев, М. В. Некоторые аспекты применения информационных технологий в биофизическом образовании в медицинском университете / М. В. Гольцев и др. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сборник статей Междунар. научн. конф., ч.2, Минск, 17-20 июня 2014 г./ БГУ; редкол.: С.Н. Черенкевич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 291-293.

5. Перспективы развития высшей школы : материалы XIII Международной науч.-метод. конф. / редкол.: В. К. Пестис [и др.]. – Гродно : ГГАУ, 2020. – 332 с.

6. Особенности преподавания физики на факультете профориентации и довузовской подготовки БГМУ на современном этапе / В.Г. Лещенко [и др.] // Актуальные проблемы довузовской подготовки: материалы III международной науч.-метод. конф. / под. ред. А.Р. Аветисова. - Минск: БГМУ, 2019. – С. 159–161.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОТВАРА ЛИСТЬЕВ ГИНОСТЕММЫ ПЯТИЛИСТНОЙ (GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM) НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Губич Оксана Игоревна
к.б.н., доцент, доцент кафедры биохимии, Белорусский государственный университет, Минск
Hubich_Oksana@tut.by
Грамотнева Валерия Алексеевна
студентка 6 курса, Белорусский государственный университет, Минск
dubvalery99@mail.ru

Целью работы явилось изучение влияния отвара гиностеммы пятилистной (Gynostemma pentaphyllum) на биохимические маркеры поражения печени крыс в условиях хронической алкогольной интоксикации. Использованная модель разработана Институтом фармакологии имени А.В. Вальдмана (г. Санкт-Петербург). Определение активности аспартатаминотрансферазы, содержания билирубина и альбумина в сыворотке крови проводилось с помощью коммерческих наборов реагентов.

Установлено, что алкогольная интоксикация животных сопровождается увеличением активности аланинаминотрансферазы на 151,3 %, концентрации общего билирубина – на 97,1%, снижением содержания альбумина – на 43,7 %. 7-идневное употребление отвара гиностеммы подопытными крысами обеспечило снижение активности аланинаминотрансферазы – на 85,9%, уровня билирубина – на 84,7%, повышение концентрации альбумина – на 33,1 %. Наблюдаемый эффект был сопоставим с действием аптечного гепатопротектора – репешка обыкновенного (Agrimonia eupatoria).

Ключевые слова: *гиностемма пятилистная; гепатопротекция; хроническая алкогольная интоксикация; репешок обыкновенный; маркеры поражения печени.*

THE STUDY OF *GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM* DECOCTION INFLUENCE ON RATS BLOOD SERUM BIOCHEMICAL INDICATORS IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

Hubich Aksana Igorevna
C.B.Sc., associate professor, associate professor of the Department of biochemistry, Belarusian State University, Minsk
Hubich_Oksana@tut.by
Hramotneva Valeria Alexeevna
6th year student, Belarusian State University, Minsk

dubvalery99@mail.ru

The aim of the work was to study the effect of Gynostemma pentaphyllum decoction on biochemical markers of rats liver damage under chronic alcohol intoxication. The model used was developed by the Institute of Pharmacology named after A.V. Waldman (St. Petersburg). The determination of aspartate aminotransferase activity, bilirubin and albumin concentrations in the blood serum was carried out using commercial reagent kits.

It was found that alcohol intoxication of animals was accompanied by an increase in alanine aminotransferase activity by 151,3%, total bilirubin concentration by 97.1%, and a decrease in albumin content by 43,7%. 7-day use of Gynostemma decoction by experimental rats provided a decrease in alanine aminotransferase activity – by 85,9%, bilirubin level – by 84,7%, and an increase in albumin concentration - by 33,1%. The observed effect was comparable to the action of a pharmacy hepatoprotector – Agrimonia eupatoria.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum; hepatoprotection; chronic alcohol intoxication; Agrimonia eupatoria; liver damage markers.*

Известно, что злоупотребление алкоголем вызывает значительное повреждение печени и может приводить к алкогольному стеатозу, циррозу и гепатиту [1]. Реализация гепатотропного действия этанола реализуется как через индукцию перекисного окисления липидов в мембранах гепатоцитов, так и за счет образования оснований Шиффа между ацетальдегидом и функционально значимыми белками организма, что нарушает их биологическое действие [2].

Зафиксировать степень повреждения печени можно с помощью широко применяемых в клинической практике тестов: определения уровня общего билирубина и его фракций, активности некоторых ферментов (трансаминаз и щелочной фосфатазы), концентрации сывороточного альбумина. Измерение этих показателей позволяет оценить гепатотоксичное действие этанола и гепатопротекторное действие изучаемых растительных препаратов.

Изучение нами хронического воздействия алкоголя на организм подопытных крыс показало, что 6-инедельное добровольное употребление животными 15% этанола приводит к нарушению целостности и функционирования гепатоцитов, что подтверждается увеличением в сыворотке крови значений указанных биохимических маркеров. Так, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) повысилась на 151,3%, концентрация общего билирубина – на 97,1%, наблюдалось снижение способности печени к синтезу альбумина на 43,7% к контролю (таблица).

На следующем этапе работы крысам с хроническим алкогольным поражением печени в рацион вводили отвары гиностеммы пятилистной («Teashop», Беларусь) и препарата сравнения – репешка обыкновенного

(«Эвалар», РФ) – вместо питьевой воды в течение 7 суток. Среднее потребление отваров составляло 12–15 мл/сутки/крыса.

Как известно, трава репешка обыкновенного содержит катехины, флавоноиды (астрагалин, рутин, гиперозид, кверцетин) и их глюкозиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, никотиновую кислоту, холин, дубильные вещества. Данное растение внесено в государственную фармакопею ряда европейских стран. Отвар репешка рекомендуется для комплексной терапии болезней печени и желчного пузыря [3]. В нашей работе ежедневное семидневное применение данного отвара предсказуемо привело к снижению активности АлАТ на 133,4%, содержания общего билирубина – на 91,6 %; уровень альбумина повысился на 35,2% (таблица).

Таблица 1 – Влияние отвара гиностеммы пятилистной (*Gynostemma pentaphyllum*) и репешка обыкновенного (*Agrimonia eupatoria)* на величины маркеров поражения печени у крыс с хронической алкогольной интоксикацией

Серия	Измеряемые параметры		
	Активность АлАТ, моль НАДН/мин	Концентрация общего билирубина, мкмоль/л	Содержание альбумина, г/л
1	2	3	4
Интактные крысы	1,2±0,7 (100%)	1,9±0,3 (100%)	31,2±2,2 (100%)
Алкогольное поражение печени (15% этанол, 6 недель)	3,1±0,4 (251%)*	3,7±1,0 (197,1%)*	17,6±2,4 (56,3 %)*
Отвар гиностеммы пятилистной на фоне алкогольного поражения печени	1,9±0,6 (165,1%)*[a]	2,1±0,3 (112,4%)*[a]	29,1±3,6 (93,2%)*[a]
Отвар репешка обыкновенного на фоне алкогольного поражения печени	1,4±0,3 (117,6%)*[a]	2,0±0,7 (105,5%)*[a]	27,9±6,2 (89,4%)*[a]

Примечание: *, *[a] – результаты достоверны при $p \leq 0,05$ (n=7 для каждой серии). Достоверность эффектов этанола оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*), а эффектов отваров гиностеммы пятилистной и репешка обыкновенного, вводимых крысам с экспериментальным поражением печени – по отношению к показателям животных с данной патологией, не получавших изучаемый препарат(*[a]).

Анализ показателей крыс с алкогольным поражением печени, ежедневно употреблявших отвар гиностеммы пятилистной в аналогичном эксперименте, также демонстрирует проявление им защитного действия. Так, ежедневный его прием сопровождался снижением активности АлАТ на 85,9%, уровня общего билирубина – на 84,7%, а также стабилизацией протеин-синтезирующей

функции печени, что нашло отражение в повышении уровня альбумина в сыворотке крови на 33,1 % (таблица). Указанный эффект может быть обусловлен содержанием в отваре гиностеммы пятилистной флавоноидов (кемпферола, кверцетина, изокверцетина, рутина) [4], способных проявлять частичную защиту гепатоцитов от хронического воздействия этанола путем ограничения перекисного окисления липидов.

Таким образом, на экспериментальной модели хронического поражения печени 15% этанолом показана способность гиностеммы пятилистной (*Gynostemma pentaphyllum*) оказывать защитное действие на печень, лишь немного уступающее эффекту аптечного растительного гепатопротектора – репешка обыкновенного (*Agrimonia eupatoria)*.

Список литературы

1. Alcoholic liver disease / H. K. Seitz [et al.] // Nature Reviews Disease Primers. – 2018. – Vol. 4. – P. 1 – 22.

2. A. Louvet, Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment / A. Louvet, P. Mathurin // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2015. – Vol. 12, № 4. – P. 231 – 242.

3. А.А., Хадарцев, А.А., Платонов, Г.Т. Сухих, Химический состав органического вещества травы репешка обыкновенного (приворот обыкновенный) (Argimonia eupatoria L., семейство розоцветных – Rosaceae) / А.А. Хадарцев, А.А. Платонов, Г.Т. Сухих // Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – №4. – С. 127 – 136.

4. Characteristics, composition, and antioxidant activities in vitro and in vivo of Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino seed oil / L. Wang, [et al.] // J. Sci. Food and Agriculture. – 2016. – Vol. 97, № 7. – P. 2084 – 2093.

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДОКСОРУБИЦИН-ФУЛЛЕРЕНОЛОВЫХ АГЕНТОВ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Дикусар Евгений Анатольевич
к.х.н., старший научный сотрудник ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск
evgen_58@mail.ru
Акишина Екатерина Александровна
научный сотрудник ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск
che.semenovaea@mail.ru
Пушкарчук Александр Леонидович
к.ф-м.н., старший научный сотрудник ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск
alexp51@bk.ru
Безъязычная Татьяна Владимировна
к.ф-м.н., старший научный сотрудник ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск
kvant@ifoch.bas-net.by
Солдатов Александр Геннадьевич
к.х.н., заведующий лабораторией физики сверхпроводящих материалов ГНПО «Научно практический Центр Национальной Академии наук Беларуси по материаловедению», Минск
andreisoldatov@mail.ru
Кутень Семен Адамович
к.ф-м.н., заведующий лабораторией теоретической физики и моделирования ядерных процессов НИУ «Институт ядерных проблем» Белорусского государственного университета, Минск
kut@inp.bsu.by
Стёпин Святослав Генрихович
к.х.н., доцент кафедры органической химии Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета, Витебск
stepins@tut.by
Низовцев Александр Павлович
д.ф-м.н., ведущий научный сотрудник Центра квантовой оптики и квантовой информатики ГНУ «Институт физики им. Б.И.Степанова Национальной академии наук Беларуси», Минск
apniz@ifanbel.bas-net.by

Килин Сергей Яковлевич
академик, д.ф-м.н., профессор, заведующий Центром квантовой оптики и квантовой информатики ГНУ «Институт физики им. Б.И.Степанова Национальной академии наук Беларуси», Минск
kilin@ifanbel.bas-net.by
Кульчицкий Владимир Адамович
академик, д.м.н., профессор, руководитель Центра мозга, заместитель директора по научной работе ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск
vladi@fizio.bas-net.by
Поткин Владимир Иванович
академик, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией химии гетероциклических соединений ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск
potkin@ifoch.bas-net.by

Целью работы является квантово-химическое моделирование электронной структуры и анализ термодинамической устойчивости новых доксорубицин-фуллереноловых агентов для повышения эффективности терапии злокачественных новообразований. Необходимость предварительных исследований по моделированию такого рода объектов обусловлена чрезвычайно высокой трудоемкостью, стоимостью и сложностью их практического получения.

Ключевые слова: *DFT-моделирование электронной структуры; доксорубицин; фуллереноловые кластеры; агенты терапии злокачественных опухолевых новообразований.*

QUANTUM CHEMICAL MODELING OF ONCOLOGICAL DISEASES THERAPY BY DOXORUBICIN-FULLEREN AGENTS

Dikusar Evgenij Anatol'evich
C.Ch.Sc., Senior Researcher of the Laboratory of chemistry of heterocyclic compounds of Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus.
evgen_58@mail.ru
Akishina Ekaterina Alexandrovna
researcher of the Laboratory of chemistry of heterocyclic compounds of Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus
che.semenovaea@mail.ru
Pushkarchuk Alexander Leonidovich
C.P-M.Sc., Senior Researcher of the Laboratory of Ion Exchange and Sorption of Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus

alexp51@bk.ru
Bezyazychnaya Tatsiana Vladimirovna
C.P-M.Sc., Senior Researcher of the Laboratory of Ion Exchange and Sorption of Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belaru
kvant@ifoch.bas-net.by
Soldatov Andrei Gennad'evich
Head of Lab for Superconducting Material Physics of the State scientific and practical Association «Scientific-practical Materials Research Center of the NASB»
andreisoldatov@mail.ru
Kutsen Siamion Adamovich
C.P-M.Sc., Head of the Laboratory of Theoretical Physics and Simulation of Nuclear Processes of Belarusian State University
kut@inp.bsu.by
Stepin Svjatoslav Genrihovich
C.Ch.Sc., Associate Professor, Department of Organic Chemistry of Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University
stepins@tut.by
Nizovtsev Alexander Pavlovich
Dr.P-M.Sc., leading researcher, the Center of quantum optics and quantum informatics, B.I. Stepanov Institute of Physics, National academy of sciences of Belarus
apniz@ifanbel.bas-net.by
Kilin Sergei Yakovlevich
academitian NAS Belarus, Dr.P-M.Sc., professor, head of the Center of quantum optics and quantum iformatics, B.I. Stepanov Institute of Physics, National academy of sciences of Belarus
kilin@ifanbel.bas-net.by
Kulchitsky Vladimir Adamovich
academician NAS Belarus, Dr.M.Sc. (Neurophysiology), Professor, Head of the Brain Center
vladi@fizio.bas-net.by
Potkin Vladimir Ivanovich
academitian NAS Belarus, Dr.Ch.Sc., Professor, Head of the Laboratory of chemistry of heterocyclic compounds of Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus
potkin@ifoch.bas-net.by

The aim of this work is to quantum-chemical simulation of the electronic structure and analysis of the thermodynamic stability of new doxorubicin-fullerenol agents for improving the effectiveness of malignant tumor therapy. The need for preliminary studies of modeling such objects is due to the extremely high labor intensity, cost and complexity of their practical obtaining.

Key words: *DFT-modeling of electronic structure, doxorubicin, fullerenol clusters, agents for the treatment of tumor neoplasms.*

С целью деструкции злокачественных новообразований применяют хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, или их комбинации, а в изотопной медицине – вводят в опухоль соответствующие короткоживущие радионуклиды (^{59}Fe, ^{90}Y, ^{95}Zr, ^{99m}Tc, ^{106}Ru, ^{114*}In, ^{147}Eu, ^{148}Eu, ^{155}Eu, ^{170}Tm, ^{177m}Lu, ^{188}Re, ^{210}Po, ^{222}Rn, ^{230}U, ^{237}Pu, ^{240}Cm, ^{241}Cm, ^{253}Es). Из-за способности вызывать в определенных условиях разрушение живых клеток производные фуллеренов также являются потенциальными противоопухолевыми агентами. Особый интерес для терапии рака представляют эндофуллерены. Помещая изотопы в прочные фуллереноловые оболочки, можно нивелировать риски интоксикации и радиоактивного заражения. Для повышения эффективности данных препаратов перспективным является введение в состав их молекул структурных фрагментов известных лекарственных форм, например, доксорубицина [1].

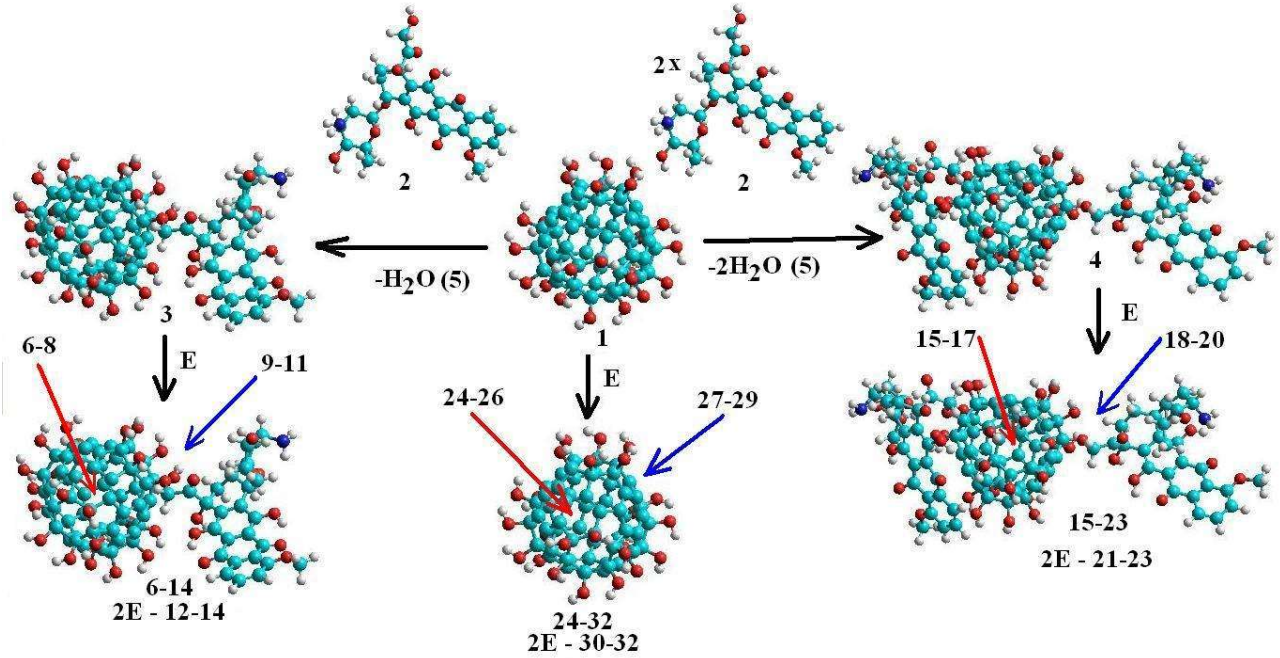
Целью настоящей работы является квантово-химическое моделирование электронной структуры и анализ термодинамической устойчивости новых эндоэдрических доксорубицин-фуллереноловых агентов для применения в терапии злокачественных опухолевых новообразований.

Материалы и методы. В исследовании применены неэмпирические квантово-химические расчеты ряда потенциальных агентов диагностики и терапии онкологических заболеваний – производных фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ и доксорубицин-фуллеренола. Расчеты соединений проведены методом DFT с применением уровня теории B3LYP1/MIDI с использованием программного пакета GAMESS и базисного набора MIDI.

Результаты и обсуждение. Проведено квантово-химическое моделирование процесса построения кластера исходя из доксорубицина и симметричного фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ [2], а также моделирование возможности нанокапсулирования радионуклидов ^{90}Y, ^{210}Po, ^{222}Rn во внутренние полости фуллеренола и его производных. Акцент на эти супрамолекулярные объекты включения во внутренние полости как самого фуллеренола, так и монодоксорубицин-фуллеренолового или бисдоксорубицин-фуллеренолового кластеров**,** обусловлен тем, что радионуклиды ^{90}Y, ^{210}Po, ^{222}Rn являются источниками терапевтического ионизирующего α-излучения (Рис. 1).

Выводы. Доксорубицин-фуллереноловые радионуклидные нанокластеры перспективны для разработки на их основе нанокапсулированных радионуклидных агентов для терапии онкологических заболеваний. Из полученных расчетов об устойчивости смоделированных бисфуллереновых кластеров можно заключить о реальности их практического использования. Инкапсулирование иттрия 33 и полония 34 вовнутрь фуллереноловых сфер

соединений 1−4 возможно проводить путем их бомбардировки ионами этих элементов (Y^{n+} и Po^{n+}) [3], а для введения атомов радона 35 могут быть применены технологии высоких и сверхвысоких давлений (вплоть до 400 тысяч атмосфер и более) [4]. Вполне вероятно, что противоопухолевое действие иттрий- (6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30) и полонийсодержащих (7, 10, 13 16, 19, 22, 25, 28, 31) фуллереноловых кластеров и их дальнейшее выведение из организма после радиоактивного распада активных элементов, не будет значительно зависеть от расположения этих элементов внутри или снаружи фуллереноловой сферы, так как они прикреплены к ним с помощью прочных ковалентных связей. Следует отметить, что радонсодержащие кластерные соединения (8, 17, 26) могут быть легко очищены от примеси неинкапсулированного радона (11, 14, 20, 23, 29, 32) простым вакуумированием.



E = ^{90}Y (6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30); ^{210}Po (7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31); ^{222}Rn (8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32); E (внутри) – 6-8, 15-17, 24-26; E (снаружи) – 9-11, 18-20, 27-29; 2E (внутри и снаружи) – 12-14, 21-23, 30-32

Рисунок 1 – Схема построения фуллереноловых (24–32), монодоксорубицин-фуллереноловых (6–14) и бисдоксорубицин-фуллереноловых (15–23) кластеров

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Конвергенция 2025».

Список литературы

1. Theranostic pH-sensitive nanoparticles for highly efficient targeted delivery of doxorubicin for breast tumor treatment / C. Pan [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2018. – Vol. 13. – P. 1119–1137.

2. Тетракозагидроксибакминстерфуллеренол – реагент будущего / Е. А. Дикусар [и др.] // «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии». Тезисы докл. XXXI Международн. научно-технич. конф. «Реактив-2018». – 2-4 Октября 2018 г., Минск, Беларусь. – Минск: Беларуская навука, 2018. – С. 22.

3. Heavy Element Research at Dubna / Yu. Ts. Oganessian [et al.] // Nucl. Phys. A. – 2004. – Vol. 734. – № 1–4. – P. 109–123.

4. Sundqvist, B. Fullerens under high pressure / B. Sundqvist // Fullerens: chemistry, physics, and technology / ed. K. M. Kadish, R. S. Ruoff. – N.-Y.: Wiley-Interscience, 2000. – 984 p.

МЕТОДОЛОГИЯ ПОИСКА СОВРЕМЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Дикусар Евгений Анатольевич
к.х.н., старший научный сотрудник ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск
evgen_58@mail.ru
Акишина Екатерина Александровна
научный сотрудник ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск
che.semenovaea@mail.ru
Стёпин Святослав Генрихович
к.х.н., доцент кафедры органической химии Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета, Витебск
stepins@tut.by
Кульчицкий Владимир Адамович
академик, д.м.н., профессор, руководитель Центра мозга, заместитель директора по научной работе ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск
vladi@fizio.bas-net.by
Поткин Владимир Иванович
академик, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией химии гетероциклических соединений ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск
potkin@ifoch.bas-net.by

Целью работы является обоснование новой методологии поиска современных биологически активных соединений и потенциальных лекарственных средств путем анализа литературных сведений об их активности и синтеза аналогов и гомологов признанных, патентованных лекарственных средств, например, дженериков, их последующей направленной функционализации для выявления влияния химической модификации фармакофорного фрагмента на рост или убыль определенной, характерной для этих лекарственных средств биологической активности, общей токсичности, растворимости в биологических жидкостях, скорости выведения продуктов его метаболизма и т.д.

Ключевые слова: *биологически активные соединения, лекарственные средства, дженерики, химическая модификация, скрининг, молекулярный докинг.*

THE METHODOLOGY FOR THE SEARCH OF CURRENT BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND PROMISING DRUGS

Dikusar Evgenij Anatol'evich
C.Ch.Sc., Senior Researcher of the Laboratory of chemistry of heterocyclic compounds of Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus.
evgen_58@mail.ru
Akishina Ekaterina Alexandrovna
researcher of the Laboratory of chemistry of heterocyclic compounds of Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus
che.semenovaea@mail.ru
Stepin Svjatoslav Genrihovich
C.Ch.Sc., Associate Professor, Department of Organic Chemistry of Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University
stepins@tut.by
Kulchitsky Vladimir Adamovich
academician NAS Belarus, Dr.M.Sc. (Neurophysiology), Professor, Head of the Brain Center
vladi@fizio.bas-net.by
Potkin Vladimir Ivanovich
academitian NAS Belarus, Dr.Ch.Sc., Professor, Head of the Laboratory of chemistry of heterocyclic compounds of Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus
potkin@ifoch.bas-net.by

The aim of this work is to substantiate a new methodology for the search for modern biologically active compounds and potential drugs by analyzing literature data on their activity and synthesizing analogues and homologues of recognized, patented drugs, for example, generics, their subsequent directed functionalization to identify the effect of chemical modification of a pharmacophore fragment on increase or a decrease in a certain biological activity characteristic of these drugs, general toxicity, solubility in biological fluids, the rate of excretion of its metabolic products, etc.

Key words: *biologically active compounds, medicines, generics, chemical modification, screening, molecular docking.*

Целью настоящей работы является обоснование новой методологии поиска современных биологически активных соединений и потенциальных лекарственных средств. Существует три основных метода поиска новых биологически активных соединений с целью разработки на их основе перспективных лекарственных средств, свободных от резистентности и обладающих низкой общей токсичностью: 1 – тотальный скрининг всех вновь синтезированных органических соединений (этот путь характерен для высокоразвитых стран или таких фармацевтических гигантов, как фирма «Bayer AG», ООО «Интербиоскрин ЛТД» и др.); 2 – молекулярный докинг,

позволяющий предсказать аффинность (сродство) и активность небольших молекул потенциальных лекарственных средств по отношению к белкам-мишеням (этот метод требует значительных вычислительных мощностей, зачастую не дает надежных результатов предсказания активности лиганда, а выбранные таким путем наиболее перспективные химические соединения бывает порой невозможно синтезировать, или их химический синтез является экономически нерентабельным); 3 – анализ литературных сведений и синтез аналогов и гомологов признанных, патентованных лекарственных средств, например, дженериков, их последующая направленная функционализация для выявления влияния химической модификации фармакофорного фрагмента на рост или убыль определенной, характерной для этих лекарственных средств биологической активности, общей токсичности, растворимости в биологических жидкостях, скорости выведения продуктов его метаболизма и т.д. Последний метод является наиболее наукоемким, но весьма перспективным для стран и организаций с ограниченной ресурсной базой.

Материалы и методы. Формально, типовые современные лекарственные средства состоят из трех компонентов: 1 – фармакофорного ядра (к примеру, гетероциклическое соединение, обладающее выраженным терапевтическим действием); 2 – так называемого трейлера (обычно, фрагмент природного происхождения или его аналоги: аминокислоты, пептиды, стероиды, сахара, нуклеотиды, нуклеозиды, и т.д.), обеспечивающего его связывание с целевыми клетками-мишенями, белками, рецепторами целевых органов, тканей и т.д.; 3 – линкерной группировки (молекулы-связки), служащей для присоединения компонента 1 к компоненту 2, и иногда обеспечивающей растворимость всего вышеназванного молекулярного ансамбля в биологических жидкостях.

В качестве связывающих линкеров (3) для объединения фармакофорных (1) и трейлерных (2) фрагментов в один ковалентный биоконъюгат весьма перспективно использование таких органических группировок, как простые эфиры (ROR^1), сложные эфиры (RCO_2R^1), азометины ($RCH{=}NR^1$) и продукты их восстановления – амины (RCH_2NHR^1), амиды [$RC(O)NR^1R^2$], пероксиды ($ROOR^1$), ацетилены ($RC{\equiv}CR^1$) и др. [3−5].

Результаты и обсуждение. В качестве примера приведены биоконъюгаты 1,2-азолов (1) с коменовой кислотой (I) и хинином (II) [1, 2] (Рис. 1).

В ряде случаев, для построения биоконъюгатов в качестве блока (**3**) целесообразно использовать такие бифункциональные молекулы, как замещенные гидроксибензальдегиды [6]. При этом отмечено, что соединения, полученные на основе гидроксибензальдегида природного происхождения – а именно, 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида [ванилина, растительного метаболита, присутствующего в виде гликозида в плодах Ванили душистой (*Vanilla planifola*)] (III) обладают значительно более высокой биологической активностью, чем аналогичные соединения, синтезированные на основе таких

синтетических продуктов, как 4-гидроксибензальдегид или изованилин (3-гидрокси-4-метоксибензальдегид) (IV) (Рис. 2) [7].

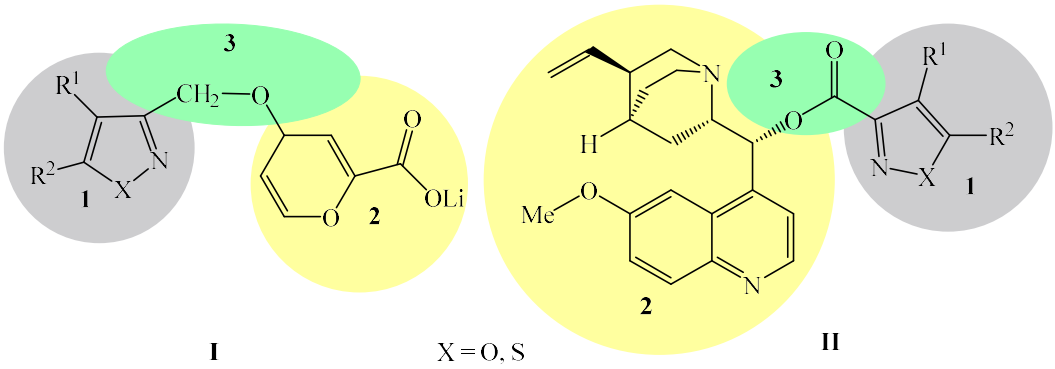


Рисунок 1 – Соединения 1,2-азольных (фармакофорных) гетероциклов (1) с фрагментами коменовой кислоты (I) или хинина (II) − (2), ковалентно связанные с помощью линкеров из простой и сложноэфирной связи (3)

.

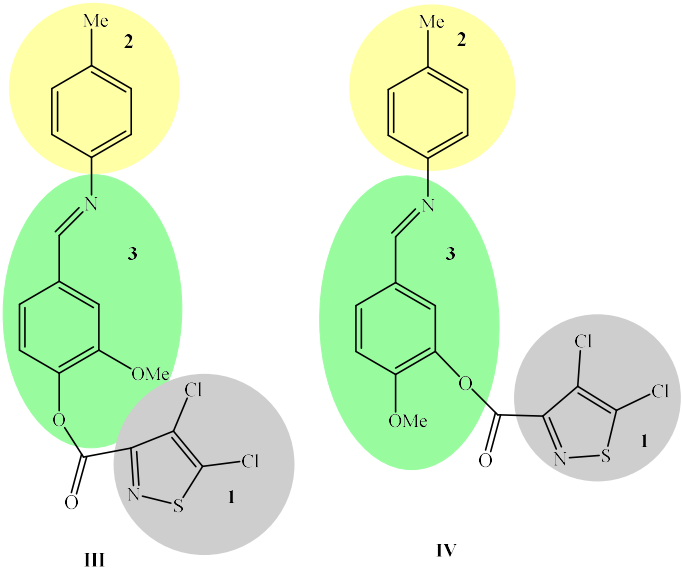


Рисунок 2 – Сложные эфиры 4,5-дихлоризотиазолкарбоновой кислоты – связанные с помощью ванилинового (III) и изованилинового (IV) линкеров

Если исходить из концепции единства происхождения жизни на Земле [8], то белковые центры (сайты) целевых клеток-мишеней, на которые и направлено действие лекарственных средств, должны обладать более высокой аффинностью к биоконъюгатам, в которых в качестве связующих линкеров (**3**) будут использоваться фрагменты молекул природного происхождения или их ближайшие аналоги, имеющие подобную пространственную структуру.

Выводы. Использование фрагментов молекул природного происхождения или их структурных аналогов в молекулярном дизайне новых потенциальных лекарственных средств, способно существенно ускорить и облегчить задачу их разработки и дальнейшего коммерческого воплощения.

Список литературы

1. Synthesis and Biological Activity of Novel Comenic Acid Derivatives Containing Isoxazole and Isothiazole Moieties / A. V. Kletskov [et al.] // Natural Product Communication. – 2018. – Vol. 13, № 11. – P. 1507–1510.

2. Quinine Esters with 1,2-Azole, Pyridine and Adamantane Fragments / G. K. Mukusheva [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27, № 11. – № 3476 (15 p.).

3. Е. А. Дикусар, Простые и сложные эфиры в линкерных технологиях. Современные аспекты молекулярного дизайна – от душистых веществ до биологически активных соединений / Е.А. Дикусар – Saarbrücken, Deutschland: LAP LAMBERT Academic Publishing / OmniScriptum GmbH & Co. KG, 2014. – 582 с.

4. Простые и сложные эфиры – от душистых веществ и биологически активных соединений до применения в медицинских нанотехнологиях / Е. А. Дикусар [и др.] // Вестник фармации. – 2014. – № 4 (66). – С. 100–108.

5. Применение простых и сложных эфиров: современные аспекты молекулярного дизайна – от душистых веществ и биологически активных соединений до применения в медицинских нанотехнологиях / Е. А. Дикусар [и др.] // Химия растительного сырья. – 2014. – № 3. – С. 61–84.

6. Основные направления синтеза функционально замещенных производных альдегидов ванилинового ряда / Е. А. Дикусар [и др.] // Химия растительного сырья. – 2013. – № 1. – С. 83–98.

7. New Data on Vanillin-Based Isothiazolic Insecticide Synergists / A. V. Kletscov [et al.] // Natural Product Communications. – 2017. – Vol. 12, № 1. – P. 105–106.

8. L. S. Borzyskowski, Biochemical unity revisited: microbial central carbon metabolism holds new discoveries, multi-tasking pathways, and redundancies with a reason / L. S. Borzyskowski, I. Bernhardsgrütter, T. J. Erb // Biological Chemistry. – 2020. – Vol. 401, № 12. – P. 1429–1441.

ПРОИЗВОДНОЕ 7-НИТРОБЕНЗОКСАДИАЗОЛ-4-ИЛ ОРТО-ФЕНИЛЕНДИАМИНА В КАЧЕСТВЕ НОВОГО МНОГОЦЕЛЕВОГО ЛИГАНДА ДЛЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ: ОЦЕНКА IN SILICO

Завалинич Виктория Алексеевна
Стажёр младшего научного сотрудника, Белорусский государственный университет, научно-исследовательская лаборатория общей и неорганической химии, Минск
viktoryiazavalinich@mail.ru
Фалетров Ярослав Вячеславович
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск
yaroslav82@tut.by
Шкуматов Владимир Макарович
д.б.н., профессор, заведующий лаборатории биохимии лекарственных препаратов научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, Минск
biopharm@bsu.by

Орто-фенилендиамин (OPD), акцептор свободных радикалов, широко применяется как субстрат во многих биоаналитических методах, может выступать в качестве регулятора апоптоза, и, следовательно, представляет интерес для применения в медицине при лечении онкологических, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. 7-Нитробензоксадиазольные (NBD) производные аминов способны хорошо поглощать видимый свет и флуоресцировать, используются как молекулярные пробы для различных белков. Известно, что наиболее близким прототипом к NBD-OPD является N-NBD-пара-аминофенол – флуорогенный субстрат тирозиназы, чем и был вызван интерес синтеза и изучения биологических, спектрофотометрических и флуорометрических свойств исследуемого соединения. Спектры были записаны на спектрофлуориметре SOLAR CM-2230. Выполнен молекулярный докинг и рассчитаны методом DFT фотохимические и электрохимические свойства.

Ключевые слова. *Орто-фенилендиамин; 7-Нитробензоксадиазол-хлорид; DFT; молекулярный докинг; металлопротеины; флуоресцентный зонд.*

7-NITROBENZOXADIAZOL-4-YL *ORTHO*-PHENYLENEDIAMINE DERIVATIVE AS A NEW MULTITARGET LIGAND FOR METALLOPROTEINS: *IN SILICO* EVALUATION

Viktoryia Alexeevna Zavalinich
Intern of Junior Researcher, Belarusian State University, Research Laboratory of General and Inorganic Chemistry, Minsk

viktoryiazavalinich@mail.ru
Yaroslav Vycheslavovich Faletrov
C.Ch.Sc, docent; leading researcher at the laboratory of biochemistry of drugs of the Research Institute of Physico-Chemical Problems of the Belarusian State University, and associate professor at the department of macromolecular compounds, Minsk
yaroslav82@tut.by
Vladimir Makarovich Shkumatov
Dr.B.Sc, Corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor; chief researcher at the laboratory of biochemistry of drugs of the Research Institute of Physico-Chemical Problems of the Belarusian State University, and professor at the department of macromolecular compounds, Minsk
biopharm@bsu.by

Ortho-phenylenediamine (OPD), a free radical acceptor, it is widely used as a substrate in many bioanalytical methods, it's able to function as a regulator of apoptosis, and, consequently, find application in medicine in the treatment of oncological, autoimmune and neurodegenerative diseases. 7-Nitrobenzoxadiazole (NBD) derivatives of amines are able to absorb visible light and fluoresce well, they are used as molecular samples for various proteins. It is known that the closest prototype to NBD-OPD is N-NBD-para-aminophenol – a fluorogenic substrate of peroxidases, which caused interest in the synthesis and study of biological, spectrophotometric and fluorometric properties of the compound under study. The spectra were recorded on a SOLAR CM-2230 spectrofluorimeter. Molecular docking was also performed and photochemical and electrochemical properties were calculated using the DFT method.

Keywords. *Ortho-phenylenediamine; 7-Nitrobenzoxadiazole-chloride; DFT; molecular docking; metalloproteins; fluorescent probe.*

О-фенилендиамин – акцептор свободных радикалов, широко применяется как субстрат во многих биоаналитических методах [1], может выступать в качестве регулятора апоптоза, и, следовательно, представляет интерес для применения в медицине при лечении онкологических, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний [2]. NBD – производные аминов способны хорошо поглощать видимый свет и флуоресцировать, используются как молекулярные пробы для различных белков [3]. Известно, что наиболее близким прототипом к NBD-OPD является N-NBD-пара-аминофенол – флуорогенный субстрат тирозиназы [4], чем и был вызван интерес синтеза и изучения биологических, спектрофотометрических и флуорометрических свойств исследуемого соединения. Спектры были записаны на спектрофлуориметре SOLAR CM-2230. Также был выполнен молекулярный докинг [5] и рассчитаны методом DFT фотохимические и электрохимические свойства.

Материалы и методы исследования. Синтез NBD-OPD проводился в среде метанола при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Реакция завершилась за 1 час. Для определения чистоты продукта была сделана тонкослойная хроматография (элюент: бензол: этанол = 10 : 1) с применением нингридрина для обнаружения исходного OPD, от которого потребовалась очистка. Успешным способом очистки NBD-OPD стала экстракция из 50 мМ раствора KH_2PO_4. Спектры были записаны на спектрофлуориметре SOLAR CM-2230. Молекулярный докинг с использованием Autodock Vina и программу-помощник FYTdock [5]. Методом DFT с помощью программы Gaussian 09W рассчитаны фотохимические и электрохимические свойства. Тесты на восстановление цитохрома С проводили в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7.4), концентрация белка составляла 5 мкМ, вещества добавляли в 5 кратном избытке из спиртовых растворов. Восстановление цитохрома С регистрировали спектрофотометрически (пик на 550 нм) [6].

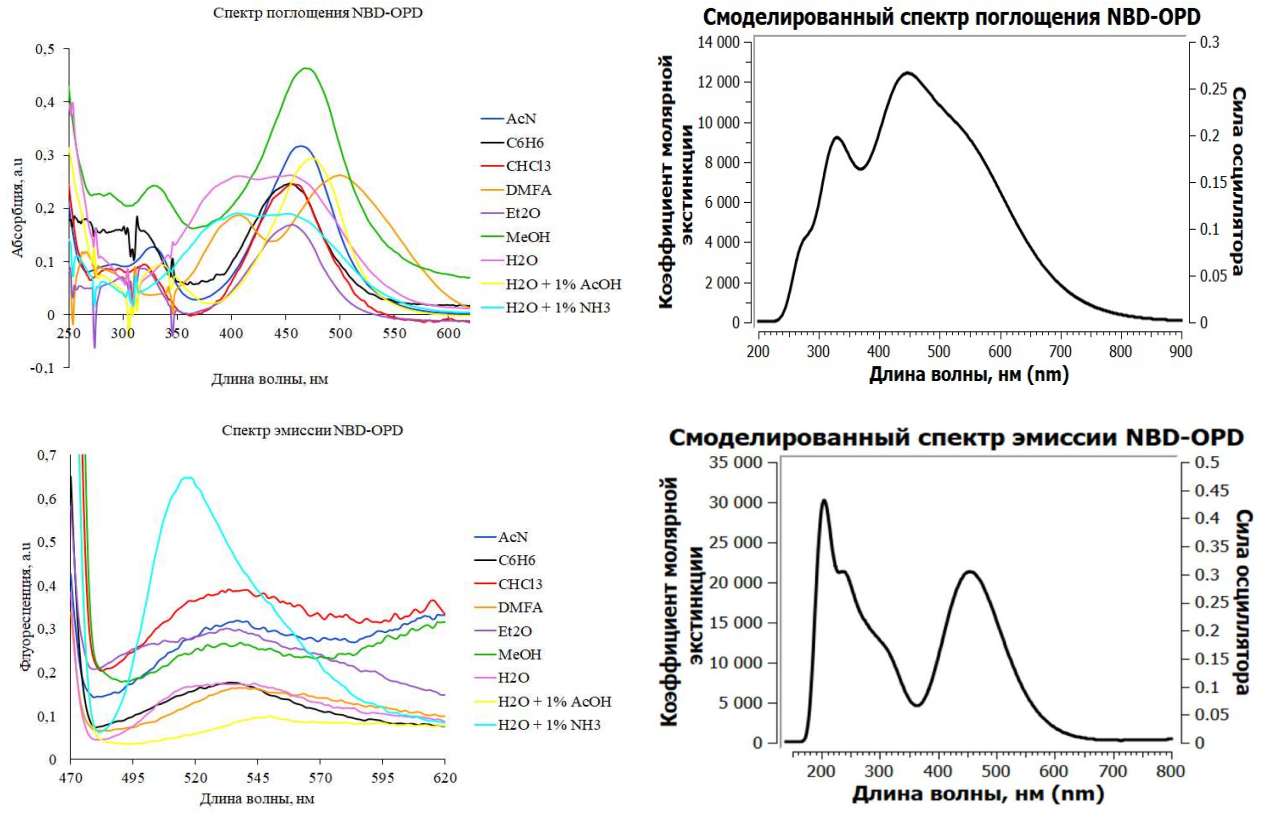


Рисунок 1 – Полученные и смоделированные спектры поглощения и эмиссии (слева представлены экспериментальные спектры абсорбции (сверху) и флуоресценции (снизу), справа представлены смоделированные в рамках DFT аналогичные спектры в среде ацетонитрила, показывающие хороший уровень корреляции экспериментальных и рассчитанных результатов для спектров поглощения)

Результаты и обсуждение. Были записаны спектры абсорбции света и эмиссии флуоресценции полученного соединения в средах различных растворителей, а также данные спектры были смоделированы в среде ацетонитрила, используя теорию фунункционала плотности (DFT) (рис.1).

Известны полосы поглощения для NBD-Cl (262 нм и 340 нм) и OPD (297 нм), для NBD-OPD, который образуется в ходе реакции нуклеофильного ароматического замещения, наблюдается новая оптическая полоса в диапазоне 467-477 нм, обусловленная внутримолекулярным переносом заряда между электронодонорной амино- и электроноакцепторными нитро- и оксадиазольной группами. Также для NBD-OPD были рассчитаны энергии основного (-26 178,4 эВ) и возбужденного S1 (-26 176,7 эВ) состояний, уровни энергии высшей занятой (HOMO) и низшей свободной (LUMO) молекулярных орбиталей и дескрипторы химической реакционной способности с использованием теории DFT//B3LYP/6-31+ g(d,p) в модельной среде ацетонитрила (табл.1).

Таблица 1 – Рассчитанные уровни энергии HOMO и LUMO и извлечённые дескрипторы химической реакционной способности для исследуемых соединений с использованием DFT//B3LYP/6-31+ g(d,p) в ацетонитриле

Соединение	Энергетические уровни		Дескрипторы химической реакционной способности		
	εHOMO (eV)	εLUMO (eV)	μ (eV)	η (eV)	W (eV)
NBD-Cl	-7,621	-3,916	-5,769	1,853	8,981
OPD	-5,469	-0,2584	-2,864	2,605	1,574
NBD-OPD	-6,046	-3,355	-4,701	1,346	8,211

OPD – известный субстрат пероксидаз и, аналогично о-катехолам и о-аминофенолам, цитохрома С. Цитохром С и пероксидазы имеют гем в качестве редокс-активной группы. Для структуры цитохрома С (PDB 6cun) была показана колокализация -NH_2 группы и Fe, что означает возможность окисления. Для подтверждения этого мы записали спектр поглощения NBD-OPD с Cyt C сразу после сливания растворов и спустя два часа от начала реакции (рис. 2).

Данный результат говорит о том, что окисление OPD и NBD-OPD действительно происходит, о чем свидетельствует появление пика на 550 нм (восстановленная форма гема С). NBD-OPD восстанавливал цитохром С медленнее из-за стерических препятствий и изменения редокс-свойст.

Для дополнительной оценки биологических свойств NBD-OPD мы провели виртуальный скрининг [5], набора PDB структур цитохромов С, Zn-содержащих бета-лактамаз бактерий и других белков (всего 500 структур). Значения теоретической энергии связывания (E_{bind}) были от -10,5 (для РНКазы, PDB 3bk2) до -5,3 (для цитохрома С, PDB 3o1y). Для структур лактамаз PDB

2hb9, 5lcf, 5mm9 и 4ua4 (E_{bind} от -9,1 до -8,8) -NH_2 группа была вблизи иона цинка, что предполагает возможность ингибирования.

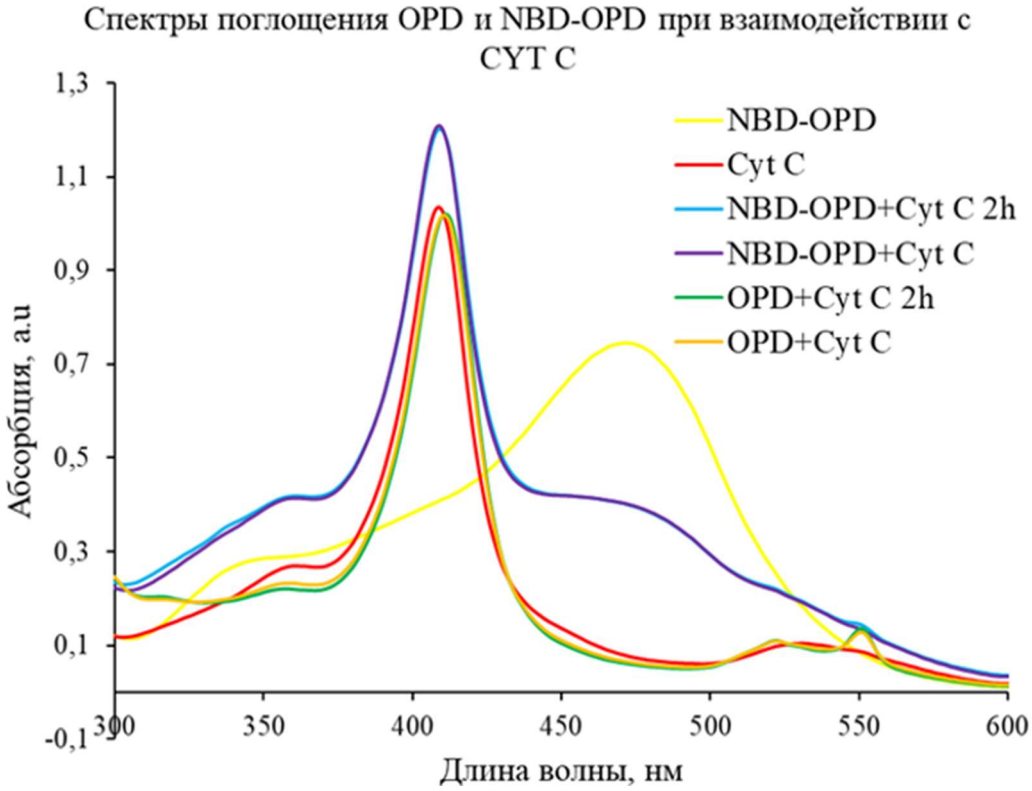


Рисунок 2 – Спектры поглощения растворов цитохрома С, инкубировавшегося с OPD и NBD-OPD, показывающие возможность восстановления гема этого белка OPD (зеленая и оранжевая линии) и NBD-OPD (голубая и фиолетовая линии) при котором наблюдается появление пика на 550 нм

Заключение. Получено 7-Нитробензоксадиазольное (NBD) производное OPD (NBD-OPD), прототипом которого является N-NBD-*napa*-аминофенол – флуорогенный субстрат пероксидаз. Были рассчитаны методом DFT ряд его фотохимических и электрохимических свойств, экспериментально записаны спектры поглощения и флуоресценции, in silico определены параметры его взаимодействия с рядом цитохромов С и металло-бета-лактамаз, а также экспериментально сравнены параметры восстановления цитохрома С NBD-OPD и OPD. Это соединение может найти применение в биомедицинских исследованих онкологических, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. NBD-OPD отправлен на биологический факультет Белорусского государственного университета для биотестирования на противоопухолевую и антивирусную активность.

Финансирование работы. Это исследование поддержано ГПНИ (Беларусь) № г.р. 20210560 и грантом Министерством образования РБ № г.р. 20220695.

Список литературы

1. Hu. Wen-Chao, Ultrasensitive Detection of Bacteria Using a 2D MOF Nanozyme-Amplified Electrochemical Detector / Wen-Chao Hu, et al. // J. Analytical Chemistry. – 2021. – V. 93 (24). – P. 8544-8552.

2. N.V. Loginova, Redox-active metal (II) complexes of sterically hindered phenolic ligands: Antibacterial activity and reduction of cytochrome c. Part II. Metal (II) complexes of o-diphenol derivatives of thioglycolic acid / N.V. Loginova, et al. // J. Polyhedron. – 2011. – V.30, №15. – P.2581-2591.

3. Я.В. Фалетров, Взаимодействие нитробензоксадиазольных производных пиперазина и анилина с бычьим сывороточным альбумином in silico и in vitro / Я.В. Фалетров, В.С. Карпушенкова, В.А. Завалинич, П.С. Яковец, А.Д. Шкредова, В.М. Шкуматов // Журнал Белорусского государственного университета. Химия. – 2021. – №2. – С. 25-35.

4. C.A. Wang, turn-on fluorescent probe for detection of tyrosinase activity / C. Wang, et al. // J. Analyst. – 2013. – V.138, I.10. – P.2825-2828.

5. Y. V. Faletrov, Application of docking-based inverse high throughput virtual screening to found phytochemical covalent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease, NSP12 and NSP16 / Y. V. Faletrov, et al. // 21 March 2022. – PREPRINT (Version 1) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1456627/v1]

6. B.E.L. Lauffer, Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability / B.E.L. Lauffer, et al. // J. Biol. Chem. – 2013. – V.288, I.37. – P.26926-26943.

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА СКОРОСТЬ МИГРАЦИИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ

Зорина Татьяна Евгеньевна
к.б.н., доцент, заведующая НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики, БГУ, г. Минск, Беларусь
zorinate@mail.ru
Кравченко Ирина Евгеньевна
старший научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики, БГУ, г. Минск, Беларусь
krav-irina@mail.ru
Ермилова Татьяна Игоревна
младший научный сотрудник ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь
tatyana.ig21@gmail.com
Шман Татьяна Викторовна
к.б.н., ведущий научный сотрудник иммунологических исследований научного отдела ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь
t_shman@yahoo.com
Кустов Андрей Владимирович
д.х.н., профессор, Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, Иваново, Российская Федерация
kustov@isuct.ru
Березин Дмитрий Борисович
д.х.н., профессор, Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Российская Федерация
berezin@isuct.ru
Зорин Владимир Петрович
к.б.н., доцент, доцент, доцент МГЭИ им. А.Д. Сахарова, БГУ, г. Минск, Беларусь
vpzorin@mail.ru

Проведено сравнение процессов распределения ряда фотосенсибилизаторов – производных хлорина e_6 в клеточных системах. Показано, что изменение состава боковых заместителей в молекуле фотосенсибилизатора оказывает различное влияние на кинетику процессов накопления в клетках и межклеточного перераспределения.

Ключевые слова: *фотосенсибилизаторы; клетки; производные хлорина e_6; биораспределение; фотоцитотоксичность.*

NFLUENCE OF THE CHEMICAL STRUCTURE OF A PHOTOSENSITIZER ON THE RATE OF ITS MIGRATION BETWEEN CELLS

Zorina Tatiana Evgen'evna
C.B.Sc., Associate Professor, Head of the Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Department of Biophysics, BSU, Minsk, Belarus
zorinate@mail.ru
Kravchenko Irina Evgen'evna
Senior Researcher, Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Department of Biophysics, BSU, Minsk, Belarus
krav-irina@mail.ru
Ermilova Tatiana Igorevna
Junior Researcher, State Institution "Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology", Minsk, Belarus
tatyana.ig21@gmail.com
Shman Tatiana Viktorovna
C.B.Sc., Leading Researcher, 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
Kustov Andrey Vladimirovich
Dr.Ch.Sc., Professor, Institute of Chemistry of Solutions named after G.A. Krestov Russian Academy of Sciences, Ivanovo, Russia
kustov@isuct.ru
Berezin Dmitriy Borisivich
Dr.Ch.Sc., Professor, Ivanovo State University of Chemical Technology, Ivanovo, Russia
berezin@isuct.ru
Zorin Vladimir Petrovich
C.B..Sc., Associate Professor, Associate Professor, Internftional Sakharov Environmental Institute (ISEI), BSU, Minsk, Belarus
vpzorin@mail.ru

The processes of distribution of a number of photosensitizers – derivatives of chloride e6 in cellular systems are compared. It is shown that the change in the composition of lateral substituents in the photosensitizer molecule has a different effect on the kinetics of accumulation processes in cells and intercellular redistribution.

Key words: *photosensitizers; cells; chlorin e_6 derivatives; biodistribution; photocytotoxicity.*

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод лечения патологий различной этиологии опухолевого или инфекционного происхождения, во многих случаях может являться альтернативой химиотерапии и другим, более инвазивным,

традиционным режимам лечения. ФДТ использует комбинированное воздействие фотосенсибилизатора (ФС) и света для избирательного воздействия на патологические клетки и ткани вследствие инициализации фотохимического повреждения биологических структур в присутствии молекулярного кислорода.

Успех ФДТ в значительной степени определяется процессами биораспределения и локализации ФС в организме пациента. Вследствие этого результативность ФДТ зависит как от физико-химических свойств ФС, так и от состава и особенностей структурной организации тканей мишеней. Поэтому ФС, работающие при одном типе патологии, могут оказаться малоэффективными при другом. Результаты исследования *in vitro*, в которых сравниваются различные по химической структуре фотоактивные соединения, служат базовой информацией в поисках оптимального ФС для конкретного клинического применения.

Исследования последних лет показали, что важное значение в контроле локализации ФС в новообразованиях имеют механизмы их транспорта в васкулярной системе, а также особенности процессов распределения в паренхиме опухолевой ткани. Последний фактор контролирует не только скорость накопления ФС в ткани, но и определяет однородность окрашивания ФС клеток, различающихся по расположению относительно кровеносных сосудов опухоли [1].

В этой связи представляет интерес оценка скорости перераспределения между клетками ФС с различными физико-химическими свойствами. Вариации параметров миграции между клетками могут оказывать сильное влияние на особенности процессов накопления в опухолевой ткани ФС с различной химической структурой.

Цель работы. Сравнить фотосенсибилизирующую активность и особенности процессов распределения ряда ФС, синтезированных на платформе хлорина e_6 (Хл e_6)

Материалы и методы. В работе исследовали ФС хлоринового ряда с различными боковыми заместителями (см. N1-N4 на рис. 1), синтезированные в Ивановском государственном химико-технологическом Университете (Иваново, Россия), а также Хл e_6 производства Frontier Scientific (США).

В работе были использованы клетки лейкемической линии миелоидного происхождения К562 (коллекция клеточных культур РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии). Суспензии клеток инкубировали при 37 ºС в среде RPMI-1640 (Sigma, США) с 5 % эмбриональной сывороткой телят (ЭСТ) (Sigma, США). Затем клетки отмывали трижды и переводили в среду, не содержащую ФС. Для анализа процессов перераспределения ФС окрашенные и неокрашенные клетки смешивались в соотношении 1:4 и через определенные интервалы времени отбирались пробы для получения гистограмм распределения клеток по величине интенсивности флуоресценции в области 640-670 нм.

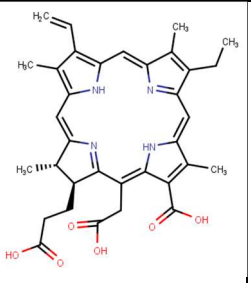
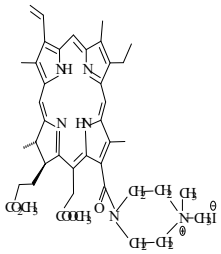
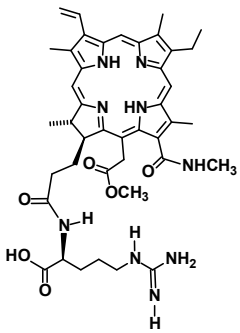
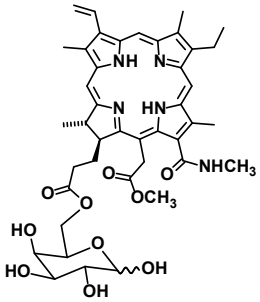
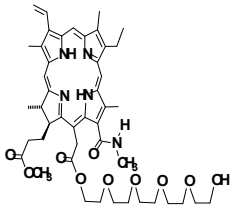
Хл e_6	N1	N2	N3	N4
				

Рисунок 1 – Структурные формулы исследуемых фотосенсибилизаторов

Изменения повреждений в клетках, индуцированные фотодинамическим воздействием, анализировали на проточном цитофлуориметре. Оценку числа поврежденных клеток проводили с использованием пропидиума иодида (PI). Образцы облучали диодным лазером (λ = 660 нм) с регулируемой мощностью облучения (ИЛМ-660-0,5; «ЛЭМТ», Беларусь). Исследование процессов накопления ФС в клетках проводили на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter, США), согласно стандартной методике на основании измерений интенсивности флуоресценции в полосе испускания хлоринов.

Результаты. Согласно полученным данным, химическая модификация Хл e_6 при синтезе N1-N4 не приводит к существенным изменениям спектральных и фотофизических характеристик ФС. В то же время появление новых латеральных заместителей сильно меняет полярные свойства молекул ФС, что приводит к изменению характеристик их взаимодействия с клетками. Подобно неполярным этерифицированным производным Хл e_6, N1-N4 характеризуются более высокими, по сравнению с Хл e_6, скоростями внутриклеточного накопления. Следствием увеличения скорости накопления является высокая эффективность сенсибилизации клеток к повреждающему действию света: в сравнении с Хл e_6 число погибших клеток увеличивается в ряду N1, N2, N3, N4 в 1.5, 3.2, 3.8 и 7.5 раз соответственно.

Согласно полученным ранее данным распределение ФС в биосистемах является динамичным процессом [2]. Молекулы ФС могут выходить из одних клеток и связываться с другими клетками в составе ткани, при этом скорость перераспределения молекул ФС между клетками является важным параметром, характеризующим распределение ФС в организме. Данные цитометрического анализа показывают, что исследованные в данной работе ФС существенно различаются по скорости перераспределения в клеточной суспензии. Если равномерное распределение молекул N2 в клетках достигается в течение 0,5-1

минуты, то в случае N4 для этого требуется 8-10 минут (рис. 2). Подобно Хл e_6, N1 и N3 характеризуются чрезвычайно низкой скоростью миграции между клетками в суспензии. На протяжении нескольких часов молекулы этих ФС остаются в пуле окрашенных клеток.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии корреляции между изменениями скорости накопления ФС в клетках и их способностью мигрировать между клетками. Одной из возможных причин этого может являться различный характер влияния типа боковых заместителей на кинетику процессов накопления и выведения ФС из клеток.

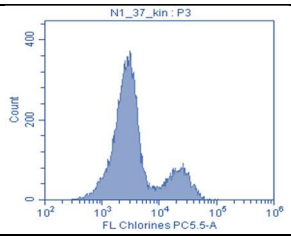
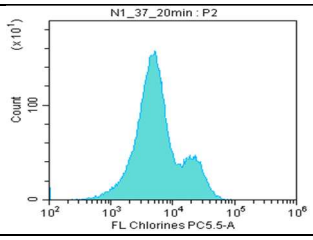
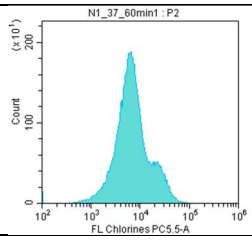
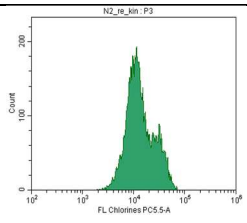
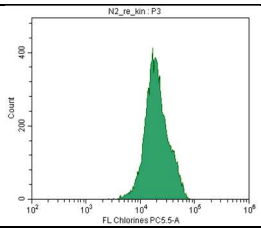
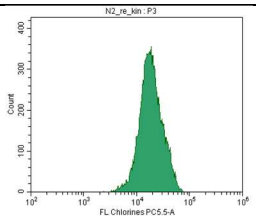
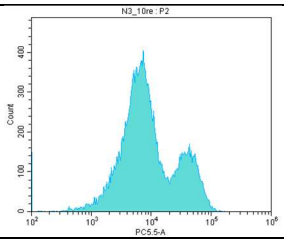
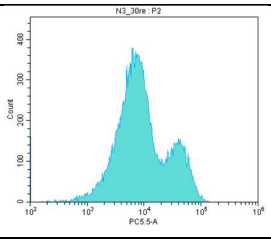
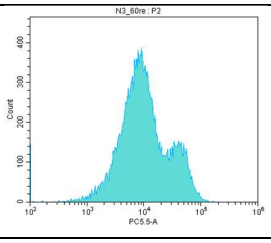
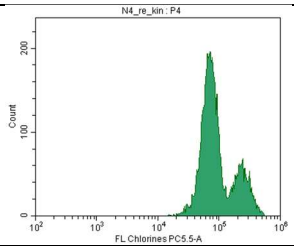
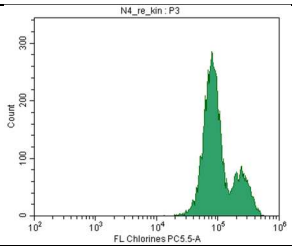
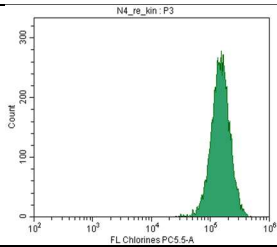
ФС	Время перераспределения		
	10 мин	30 мин	60 мин
N1`			
	10 сек	1 мин	10 мин
N2			
	10 мин	30 мин	60 мин
N3			
	10 сек	1 мин	10 мин
N4			

Рисунок 2 – Гистограммы распределения клеток К562 по интенсивности флуоресценции в полосе испускания хлоринов в смешанных суспензиях клеток

Список литературы

1. Factors affecting the selectivity of nanoparticle-based photoinduced damage in free and xenografted chorioallantoïc membrane model//J. Drug Target, / J. Garrier, [et al]// April 2014, Vol. 22, №. 3 , P. 220-231.

2. Current state of the nanoscale delivery systems for temoporfin-based photodynamic therapy: Advanced delivery strategies / I. Yakavets, [et al]// Journal of Controlled Release. – 2019. – Vol. 304. – P. 268-287.

ЛАКТОФЕРРИН СНИЖАЕТ КОНЦЕНТРАЦИЮ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ, МАРКЕРОВ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА И НЕТОЗА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ АКТИВАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ *EX VIVO*

Иванов Виктор Андреевич
младший научный сотрудник ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва
ivanov@rcpcm.org
Галкина Наталья Владимировна
к.м.н., заведующий Центром диабетической стопы ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва
nataliazv.gorod@mail.ru
Максимов Дмитрий Игоревич
заведующий Центром гнойной хирургии и регенераторных технологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва
dmaksimov81@mail.ru
Горбунов Николай Петрович
научный. сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург
nikolaygo@mail.ru
Костевич Валерия Александровна
к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург
hfa-2005@yandex.ru
Соколов Алексей Викторович
д.б.н., заведующий лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт Петербург
biochemsokolov@gmail.com
Островский Евгений Михайлович
к.м.н., главврач ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва
e-ost@mail.ru
Гусев Сергей Андреевич
д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва
ser_gus@mail.ru
Панасенко Олег Михайлович
д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. отделом биофизики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва
o-panas@mail.ru

В экспериментах ex vivo добавление лактоферрина в кровь здоровых доноров и больных сахарным диабетом 2 типа приводило к снижению концентрации фермента нейтрофилов миелопероксидазы и маркеров галогенирующего стресса в плазме, а также уровня нетоза при активации нейтрофилов форбол-12-миристат-13-ацетатом, что может быть использовано при лечении воспалительных заболеваний.

Ключевые слова*: лактоферрин, сахарный диабет, миелопероксидаза, галогенирующий стресс, нетоз*

LACTOFERRIN REDUCES MYELOPEROXIDASE AND HALOGENATIVE STRESS MARKER CONCENTRAIONS AND NETOSIS IN THE BLOOD OF HEALTHY DONORS AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS DURING INDUCED NEUTROPHIL ACTIVATION *EX VIVO*

Ivanov Viktor Andreevich
Junior Researcher Fellow, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow
ivanov@rcpcm.org
Galkina Natalia Vladimirovna
C.M.Sc., Head of the Center of Diabetic Foot, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow
nataliazv.gorod@mail.ru
Maximov Dmitriy Igorevich
Head of the Center for Purulent Surgery and Regenerative Technologies, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow
dmaksimov81@mail.ru
Gorbunov Nikolay Petrovich
Junior Researcher Fellow of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg
nikolaygo@mail.ru
Kostevich Valeria Aleksandrovna
C.BSc., Senior Researcher of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg
hfa-2005@yandex.ru
Sokolov Aleksey Viktorovich
Dr.B.Sc., Head of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg
biochemsokolov@gmail.com
Ostrovsky Evgeny Mikhailovich

PhD in Medicine, Chief Physician, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow
e-ost@mail.ru
Gusev Sergey Andreevich
Dr.M.Sc., Professor, Chief Researcher, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow
ser_gus@mail.ru
Panasenko Oleg Mikhailovich
Dr.B.Sc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow
o-panas@mail.ru

In ex vivo experiments, the addition of lactoferrin to the blood of healthy donors and type 2 diabetes mellitus patients resulted in a decrease in the plasma concentrations of the neutrophil enzyme myeloperoxidase and halogenative stress markers as well as in the level of NETosis during neutrophil activation by phorbol-12-myristate-13-acetate, which can be used in the treatment of inflammatory diseases.

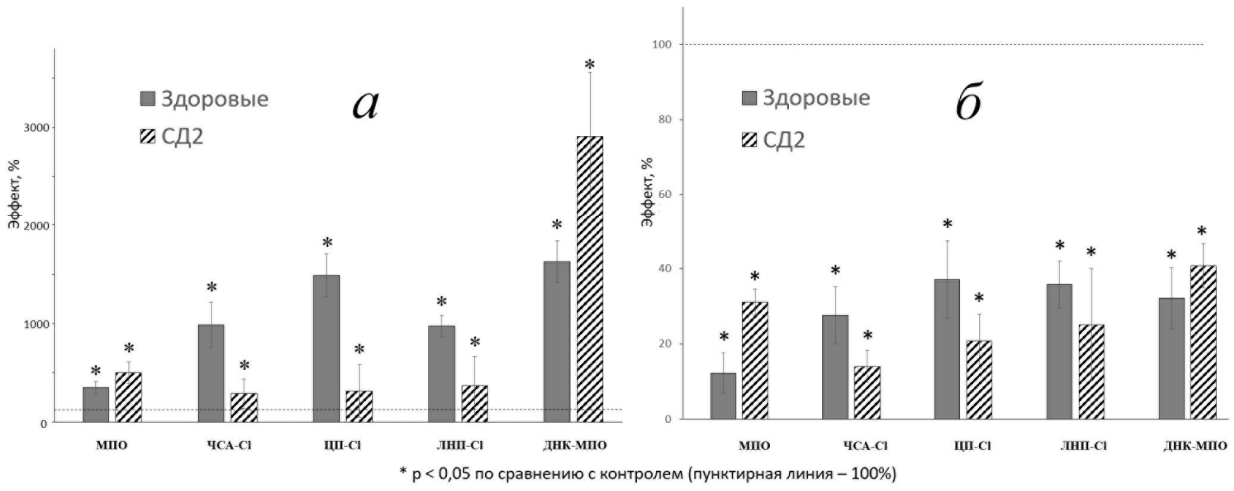
Key words: *lactoferrin, diabetes mellitus, myeloperoxidase, halogenative stress, NETosis*

Наиболее значимым из всех метаболических заболеваний является сахарный диабет второго типа (СД2). Отсутствие или неадекватная сахароснижающая терапия в сочетании с нарушением режима питания и другими факторами ведёт к развитию гипергликемического состояния, при котором уровень глюкозы в крови может достигать 10-12 мМ. СД2 и сопутствующая ему гипергликемия вызывают развитие целого ряда осложнений, снижающих качество жизни или способных привести к смерти, например, диабетической ретинопатии, полинейропатии или диабетической стопы. Клеточная составляющая иммунного ответа в наибольшей степени обусловлена нейтрофилами периферической крови, обеспечивающими врождённый иммунитет, реализующий множество защитных и сигнальных функций в организме. Нейтрофилы мигрируют в очаг воспаления, где активируются, высвобождая путем дегрануляции или нетоза содержимое цитоплазматических гранул, в результате чего, во внеклеточную среду попадают различные биологически активные молекулы, в частности миелопероксидаза (МПО). МПО катализирует образование реакционных активных форм галогенов (АФГ), выполняющих бактерицидную функцию, но их чрезмерная продукция приводит к повреждению молекул, клеток и тканей организма, что вызывает формирование галогенирующего стресса [1]. Последний является причиной развития сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и других заболеваний. В этой связи актуальным является поиск средств и подходов, позволяющих

регулировать уровень МПО в крови и препятствовать развитию галогенирующего стресса. На эту роль может претендовать белок острой фазы воспаления лактоферрин (ЛФ), широко распространённый во всех секреторных жидкостях организма, а также, локализованный в специфических гранулах нейтрофилов и проявляющий иммуномодулирующую, антимикробную, антиокислительную и другие биологически важные функции [2].

Цель работы – изучение влияния ЛФ на содержание в крови здоровых доноров и больных СД2 МПО, маркеров галогенирующего стресса и нетоза при индуцированной активации нейтрофилов в экспериментах *ex vivo*.

Материалы и методы. В исследовании участвовало 15 человек различного пола, в возрасте от 45 до 86 лет, среди которых было 8 здоровых доноров и 7 пациентов, страдающих СД2 со стойкой гипергликемией (уровень глюкозы в крови превышал 7 мМ, уровень гликированного гемоглобина 7-9%). Забор венозной крови производили в вакуумные пробирки с ЭДТА. ЛФ добавляли в кровь до концентрации 1 мг/мл и инкубировали 2 часа при 37°С, после чего нейтрофилы активировали добавлением форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА, 0,16 мкМ) в ДМСО, инкубировали еще 0,5 часа. В контрольные образцы вместо ФМА добавляли тот же объем ДМСО. Далее в плазме методом ИФА определяли содержание МПО, маркеров галогенирующего стресса: хлорированных альбумина (ЧСА-Cl), церулоплазмина (ЦП-Cl), липопротеинов низкой плотности (ЛНП-Cl), а также комплекса ДНК-МПО – маркера нетоза [3].



*p < 0,05 по сравнению с контролем.

Рисунок 1 – Содержание в крови здоровых доноров и больных СД2 МПО, маркеров галогенирующего стресса (ЧСА-Cl, ЦП-Cl, ЛНП-Cl) и нетоза (ДНК-МПО) при активации нейтрофилов ФМА в отсутствие (*а*) и в присутствии ЛФ (*б*) в % от контроля (без ФМА (*а*) или без ЛФ (*б*)). Пунктиром обозначены 100%.

Результаты ИФА приведены на рисунке 1. Видно, что добавление в кровь активатора нейтрофилов – ФМА приводило к значительному возрастанию уровня МПО, маркеров галогенирующего стресса (ЧСА-Cl, ЦП-Cl, ЛНП-Cl) и нетоза (ДНК-МПО), как у здоровых доноров, так и у больных СД2 (рис. 1*а*). Преинкубация крови с ЛФ (1 мг/мл) достоверно снижала все измеряемые параметры на 40-90% по сравнению с контролем (рис. 1*б*). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛФ способен снижать секрецию нейтрофилами МПО, препятствовать нетозу и галогенирующему стрессу, воздействуя на активированные нейтрофилы.

Наши результаты хорошо согласуются с данными работы [4], где было показано, что ЛФ способен транслоцироваться в мембрану, затрудняя выход из клетки нейтрофильных внеклеточных ловушек, в состав которых входит МПО. Это должно способствовать уменьшению концентрации фермента в плазме и, как следствие, снижению маркеров галогенирующего стресса. Падение уровня ЛНП- Cl в крови можно объяснить способностью ЛФ конкурировать с МПО за связывание с поверхностью ЛНП. Вытесняя функционирующую МПО из комплекса ЛНП-МПО, ЛФ препятствует модификации ЛНП под действием АФГ, образующихся при МПО-катализе [5].

Ранее в работе [6] показана возможность ЛФ праймировать и активировать нейтрофилы, способствуя их дегрануляции, что, казалось бы, противоречит нашим результатам. Однако надо иметь ввиду, что авторы работы [6] в отличие от нас проводили эксперименты на изолированных нейтрофилах. Известно, что ЛФ образует комплексы с белками плазмы, что может существенно изменить характер взаимодействия этого белка с поверхностью нейтрофилов, а также экранировать его доступность для рецепторов на клеточной мембране.

Полученные результаты расширяют возможность использования ЛФ в качестве основы для создания новых средств и подходов, направленных на регуляцию и коррекцию функции нейтрофилов и МПО с целью предотвращения галогенирующего стресса, что должно иметь положительный эффект при заживлении ран и течении хронических воспалительных заболеваний. Особенно перспективным выглядит данное направление ввиду того, что ЛФ является эндогенным белком организма человека, имеет низкую токсичность, активно применяется в медицинской практике для борьбы с госпитальными инфекциями и в качестве иммуномодулятора в составе комплексной терапии интоксикаций различного происхождения. Работа поддержана РНФ (20-15-00390).

Список литературы

1. O.M. Panasenko. The role of halogenative stress in atherogenic modification of low-density lipoproteins / O.M. Panasenko, T.I. Torkhovskaya, I.V. Gorudko, A.V. Sokolov // Biochemistry (Moscow). – 2020. – Vol. 85. Suppl. 1. – P. S34-S55.

2. М.С. Терехова, Железосвязывающая способность лактоферрина при воспалении / М.С. Терехова, И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, И.В. Семак, А.В. Соколов, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // Докл. БГУИР. – 2018. – №7(117). – С. 80-84.

3. А.В. Соколов, Связь между активной миелопероксидазой и хлорированным церулоплазмином в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.В. Соколов, В.А. Костевич, Н.П. Горбунов, Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, В.Б. Васильев, О.М. Панасенко // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20. – С. 699-710.

4. K. Okubo, Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation / K. Okubo, M. Kamiya, Y. Urano et al. // EBioMedicine. – 2016. – Vol. 10. – P. 204-215.

5. V.B. Vasilyev, Binding of lactoferrin to the surface of low-density lipoproteins modified by myeloperoxidase prevents intracellular cholesterol accumulation by human blood monocytes / V.B. Vasilyev, A.V. Sokolov, V.A. Kostevich, A.Y. Elizarova, N.P. Gorbunov, O.M. Panasenko // Biochem. Cell. Biol. – 2021. – Vol. 99. – P. 109-116.

6. D.V. Grigorieva, Effects of recombinant human lactoferrin on calcium signaling and functional responses of human neutrophils / D.V. Grigorieva, [and other] // Arch. Biochem. Biophys. – 2019. – Vol. 675: 108122.

ИЗМЕНЕНИЕ ХЕМОТАКСИСА В-ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ ПОД ВЛИЯНИЕМ АЗИТРОМИЦИНА

Кадушкин Алексей Геннадьевич
к.м.н., доцент, доцент кафедры биологической химии, учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
kadushkinah@bsmu.by
Таганович Анатолий Дмитриевич
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии, учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
taganovich@bsmu.by
Мовчан Людмила Викторовна
к.б.н., врач лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории, государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минский р-н, Беларусь
movchan-l@mail.ru
Зафранская Марина Михайловна
д.м.н., доцент, заведующий кафедрой иммунологии, «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь
zafranskaya@gmail.com
Шман Татьяна Викторовна
к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований, государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минский р-н, Беларусь
shman@oncology.by

Целью данной работы явилось оценить способность комбинации азитромицина и будесонида влиять на перемещение В-лимфоцитов и моноцитов крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) к хемокинам RANTES и IP-10. Влияние азитромицина (10 мгк/мл), будесонида (10 нМ) и их комбинации на миграцию В-лимфоцитов и моноцитов крови пациентов с ХОБЛ к хемокинам RANTES и IP-10 изучено с помощью метода проточной цитометрии. Азитромицин и будесонид самостоятельно подавляли миграцию к RANTES и IP-10 В-лимфоцитов, а также ускоряли перемещение к ним моноцитов. Сочетанное действие азитромицина и будесонида превосходило способность одного будесонида подавлять хемотаксис В-лимфоцитов к RANTES и IP-10, но не имело преимуществ по отношению к миграции моноцитов.

Ключевые слова: *азитромицин; ХОБЛ; хемотаксис; RANTES; IP-10*

EFFECT OF AZITHROMYCIN ON THE CHEMOTAXIS OF BLOOD B-LYMPHOCYTES AND MONOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Kadushkin Aliaksei Gennadievich
C.M.Sc., Associate Professor, Associate Professor of Biological Chemistry Department, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
kadushkinah@bsmu.by
Tahanovich Anatoli Dmitrievich
Dr.M.Sc., Professor, Head of Biological Chemistry Department, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
taganovich@bsmu.by
Movchan Lyudmila Viktorovna
C.B.Sc., Doctor of Laboratory Diagnostics of the Clinical Diagnostic Laboratory, Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany, Minsk region, Belarus
movchan-l@mail.ru
Zafranskaya Marina Mihailovna
C.M.Sc., Associate Professor, Head of Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus
zafranskaya@gmail.com
Shman Tatsiana Viktorovna
C.B.Sc., Leading Researcher of the Immunological Research Laboratory, Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany, Minsk region, Belarus
shman@oncology.by

The aim of this work was to evaluate the ability of the combination of azithromycin and budesonide to affect the migration of blood B-lymphocytes and monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) towards chemokines RANTES and IP-10. The effect of azithromycin (10 μg/mL), budesonide (10 nM), and their combination on the migration of blood B-lymphocytes and monocytes from COPD patients towards chemokines RANTES and IP-10 was studied using flow cytometry. Azithromycin and budesonide alone suppressed the migration of B-lymphocytes to RANTES and IP-10, and enhanced the chemotaxis of monocytes. The combined effect of azithromycin and budesonide was superior to the ability of budesonide alone to suppress B-lymphocyte chemotaxis towards RANTES and IP-10, but had no advantage in relation to monocyte migration.

Key words: *azithromycin; COPD; chemotaxis; RANTES; IP-10*

Глюкокортикоиды ограниченно влияют на содержание провоспалительных цитокинов, функцию легких, качество жизни и риск смерти пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) [1]. Исследования, нацеленные на поиск препаратов, усиливающих действие глюкокортикоидов, позволили выявить в качестве препарата с такими свойствами макролидный антибиотик азитромицин [2].

Азитромицин подавляет синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, замедляя миграцию иммунокомпетентных клеток в легкие пациентов с ХОБЛ [3]. Однако способность этого препарата потенцировать эффекты глюкокортикоидов, связанные с угнетением миграции В-лимфоцитов и моноцитов, до сих пор не известна.

Целью исследования явилось оценить способность комбинации азитромицина и будесонида влиять на перемещение В-лимфоцитов и моноцитов крови пациентов с ХОБЛ к хемокинам RANTES и IP-10.

В исследовании приняли участие 8 пациентов с ХОБЛ (6 мужчин и 2 женщины) со стабильным течением заболевания, II-III степенью тяжести (в соответствии с критериями GOLD 2019, Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких) и индексом курящего человека более 10 пачка/лет. Возраст обследованных лиц составил 61,5 (59,0–68,3) лет. Из исследования исключались пациенты с бронхиальной астмой, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, нарушениями свертывающей системы крови, а также пациенты, принимавшие системные глюкокортикоиды последние 6 недель до проведения исследования.

Венозную кровь у пациентов забирали утром натощак в объеме 15 мл в пробирку, содержащую гепарин натрия в качестве антикоагулянта. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из периферической крови путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077, используя раствор Lymphopure (Biolegend, США). Клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6/мл в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, США) с добавлением 1% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, Capricorn Scientific, Германия).

В чистые пробирки помещали 1 мл суспензии клеток (1×10^6 мононуклеарных клеток крови) и инкубировали с глюкокортикоидом будесонидом (10 нМ), азитромицином (10 мкг/мл) (Glentham Life Sciences Ltd, Великобритания), или их сочетанием в увлажненной 5% CO_2 при 37°С. Через 1 час 100 мкл суспензии клеток переносили в верхние камеры планшета с порами диаметром 5 мкм (Costar Corning, США). В нижние камеры планшета добавляли 600 мкл хемотаксического буфера, состоящего из культуральной среды RPMI 1640, обогащенной 1% ФТС и хемокинами RANTES (10 нМ, R&D systems, США) или IP-10 (10 нМ, Gibco, США). Планшеты инкубировали при 37°С, 5% CO_2. По окончании 2 часов клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирали,

отмывали при помощи фосфатного солевого буфера (ФСБ, Cell Wash, BD Biosciences, Польша) и ресуспендировали в ФСБ. Вносили моноклональные антитела CD14-PE, CD19-ECD, CD45-APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, Франция; Exbio, Чехия), после чего клетки инкубировали в темноте в течение 20 минут при температуре 4°С. Затем клетки отмывали при помощи 3 мл ФСБ, содержащего 0,2% бычий сывороточный альбумин (BD Biosciences, США), и фиксировали путем добавления 300 мкл 1% раствора параформальдегида. На проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США), настроенном на среднюю скорость потока клеток, в течение 100 секунд подсчитывали количество клеток.

Для анализа образцов использовали программное обеспечение Kaluza (Beckman Coulter). В-лимфоциты определяли как $CD45^+CD19^+$, моноциты – $CD14^+$ клетки.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы GraphPad Prism версия 7.00 (GraphPad Software, США). Оценку результатов исследования проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным попарным сравнением показателей с помощью критерия Тьюки. При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали как равное 5%.

Показаны графики, демонстрирующие влияние азитромицина (Аз, 10 мкг/мл), будесонида (Буд, 10 нМ) и их сочетания на миграцию В-лимфоцитов и моноцитов, индуцированную 10 нМ RANTES (А, В) и 10 нМ IP-10 (Б, Г). Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; n=8. *$p < 0,05$ по сравнению с контролем (клетками крови, находившимися без лекарственных средств); ♦$p < 0,05$ по сравнению с Буд 10 нМ; #$p < 0,05$ по сравнению с Аз 10 мкг/мл.

В настоящем исследовании будесонид подавлял миграцию В-лимфоцитов и ускорял перемещение моноцитов к хемокину RANTES (рис.). Схожим образом глюкокортикоиды влияли на хемотаксис В-лимфоцитов и моноцитов к IP-10. Добавление к клеточной суспензии азитромицина приводило к снижению миграции В-лимфоцитов и индукции перемещения моноцитов в направлении RANTES и IP-10. При этом азитромицин обладал более выраженной способностью супрессировать миграцию В-клеток, чем будесонид.

Комбинация азитромицина и будесонида также, как и любой из этих препаратов по отдельности, снижала миграцию В-клеток и активировала перемещение моноцитов. Вместе с тем сочетанное действие азитромицина и будесонида превосходило способность одного будесонида подавлять хемотаксис В-лимфоцитов к RANTES и IP-10, но не имело преимуществ по отношению к миграции моноцитов.

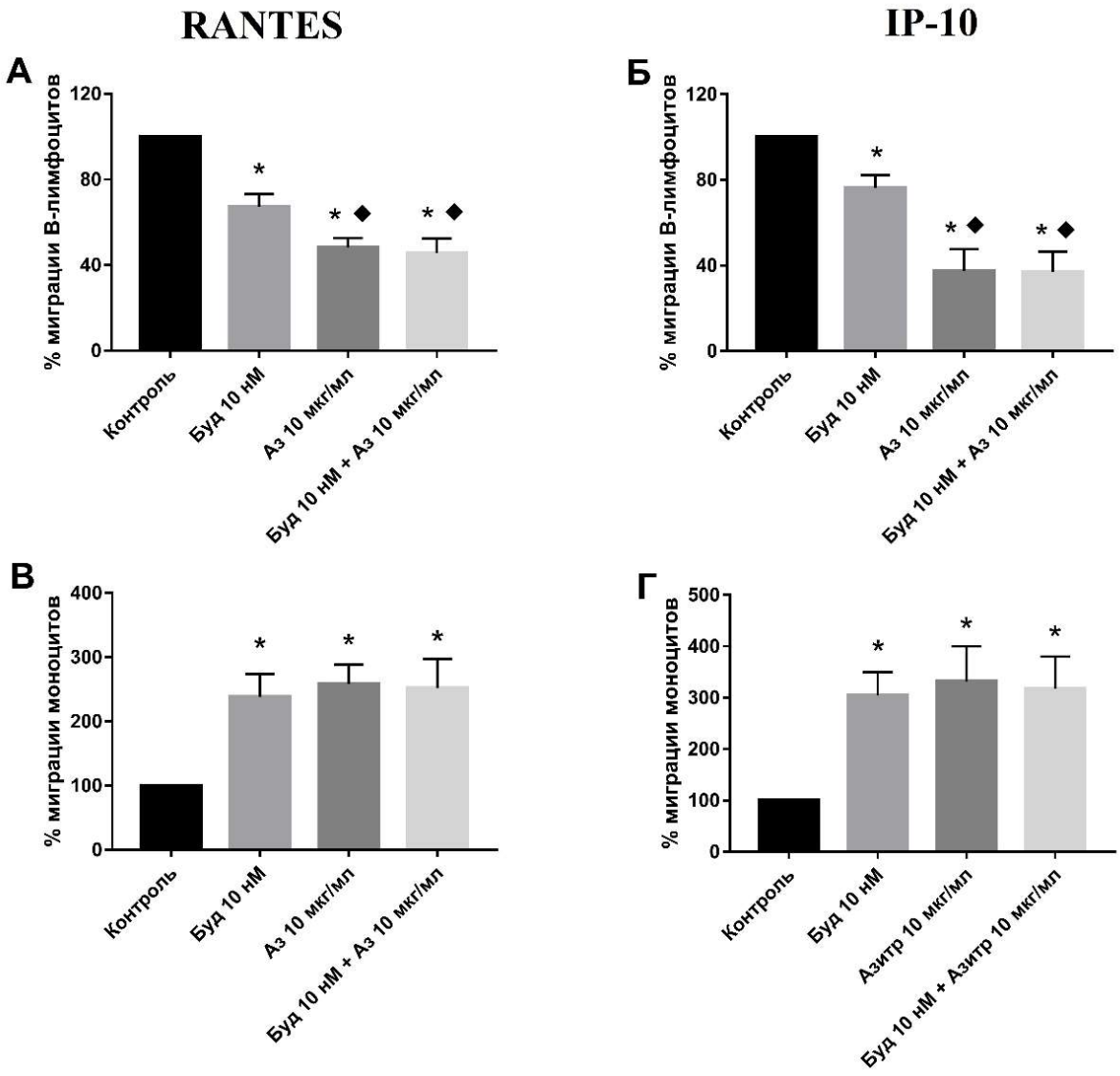


Рисунок 1 – Влияние азитромицина и будесонида на хемотаксис В-лимфоцитов и моноцитов периферической крови пациентов с ХОБЛ к RANTES и IP-10

Показано, что глюкокортикоиды могут индуцировать популяцию противовоспалительных моноцитов, которые мигрируют в места воспаления, синтезируют противовоспалительные цитокины и имеют повышенную фагоцитарную активность, что способствует подавлению воспаления [4]. Основываясь на этих данных, мы полагаем, что усиление хемотаксиса моноцитов к хемокинам RANTES и IP-10 под влиянием будесонида и азитромицина, продемонстрированное в настоящей работе, может быть обусловлено активирующим действием лекарственных средств на противовоспалительные моноциты, что в дальнейшем может супрессировать воспалительную реакцию. Данное предположение требует проверки в будущих

исследованиях путем определения фенотипа и свойств мигрировавших моноцитов.

Список литературы

1. K.S. Babu, Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a pro-con perspective / K.S. Babu, J.A. Kastelik, J.B. Morjaria // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2014. – Vol. 78. – P. 282–300.

2. Azithromycin modulates release of steroid-insensitive cytokines from peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease / Kadushkin A. [et al.] // Adv. Respir. Med. – 2022. – Vol. 90, № 1. – P. 17–27.

3. Immunomodulation by macrolides: therapeutic potential for critical care / T.D.Y. Reijnders [et al.] // Lancet Respir. Med. – 2020. – Vol. 8, № 6. – P. 619–630.

4. J.M. Ehrchen, More Than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages / J.M. Ehrchen, J. Roth, K. Barczyk-Kahlert // Front. Immunol. – 2019. – Vol. 10. – Art. 2028.

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕСТНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

Калиниченко Алексей Павлович
ассистент кафедры хирургии №2 института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, Симферополь
zleonov40@yandex.ru
Гривенко Сергей Геннадиевич
д.м.н., доцент,
профессор кафедры хирургии №2 института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, Симферополь
hryva@mail.ru
Умеров Эрвин Энверович
к.м.н., ассистент кафедры хирургии №2 института «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, Симферополь
umerov_ervin@mail.ru

Цель исследования – оценить влияние местной терапии на содержание циркулирующих иммунных комплексов у пациентов с синдромом диабетической стопы. Обследовано 70 больных в двух группах. В первых для местной терапии применялся сульфатиазол серебра, а в вторых применяли стандартную терапию. Циркулирующие иммунные комплексы определяли спектрофотометрически, при поступлении, на 7 и 14 сутки после начала лечения. Применение сульфатиазола серебра позволило уже 7 суткам достоверно снизить уровни циркулирующих иммунных комплексов по отношению к фоновому на 32% при смешанной форме и на 23% при ишемической форме, в сравнении с группой сравнения, где это снижение составило 22% при смешанной форме и 15% при ишемической форме.

Ключевые слова: *циркулирующие иммунные комплексы; синдром диабетической стопы; сульфатиазол серебра*

CHANGES IN THE CONTENT OF CIRCULATION IMMUNE COMPLEXES UNDER THE INFLUENCE OF LOCAL THERAPY IN DIABETIC FOOT SYNDROME

Kalinichenko Aleksej Pavlovich,
Assistant of the Department of Surgery No. 2 Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol
zleonov40@yandex.ru
Hryvenko Serhiy Hennadiyovych,

Dr.M.Sc., associate professor,
Professor of the Department of Surgery No. 2 Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol
hryva@mail.ru
Umerov Ervin Enverovich
C.M.Sc., Assistant of the Department of Surgery No. 2 Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol
umerov_ervin@mail.ru

The aim of the study was to evaluate the effect of local therapy on the content of circulating immune complexes in patients with diabetic foot syndrome. 70 patients were examined in two groups. In the first, silver sulfathiazole was used for local therapy, and in the second, standard therapy was used. Circulating immune complexes were determined spectrophotometrically on admission, on days 7 and 14 after the start of treatment. The use of silver sulfathiazole allowed already on the seventh day to significantly reduce the levels of circulating immune complexes in relation to the background level by 32% in the mixed form and by 23% in the ischemic form, in comparison with the comparison group, where this decrease was 22% in the mixed form and 15% in ischemic form.

Keywords: *circulating immune complexes; diabetic foot syndrome; silver sulfathiazole*

Определение содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) при многих аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваниях в настоящее время рассматриваются как важный прогностический признак течения заболевания [1, 2]. Доказана роль ЦИК в атерогенезе [3]. При сахарном диабете также диагностируются ЦИК [4], которые непосредственно индуцируют развитие пролиферативного васкулита [5]. Однако в доступной литературе отсутствуют данные о содержании ЦИК при синдроме диабетической стопы (СДС), что и определило цель данного исследования.

Цель: оценить влияние местной терапии на содержание ЦИК у пациентов с СДС.

Материал и методы исследования. Биохимические исследования проведены у 70 больных с СДС, находившихся на лечении в хирургическом отделении №2 Симферопольской клинической больницы скорой помощи №6 за период 2019–2021 гг., и составивших две клинических группы. У больных первой группы (n=38) имела место нейроишемическая форма (СФ) СДС, а у больных второй группы пациентов (n=32) – ишемическая форма (ИФ) СДС. При проведении курса лечения эти пациенты были разделена на две подгруппы: первая на IA (n=22) и IБ (n=16), вторая на IIA (n=18) и IIБ (n=14). В IA и IIA подгруппе пациентов для местной терапии применялся сульфатиазол серебра (СТС). Подгруппы, в которых применялась стандартная местная терапия,

составили IБ и IIБ. Контролем служила группа практически здоровых лиц (n=14). Концентрацию ЦИК определяли с помощью метода селективной преципитации в присутствии полиэтиленгликоля с последующим определением концентрации протеина в преципитате с помощью модифицированной методики [6], используя спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Россия), при поступлении, на 7 и 14 сутки после начала лечения. Для осуществления статистических расчетов использовались общепринятые принципы и рекомендации статистического анализа [7]. Анализ и обработка статистических данных проведенных клинических исследований проводились с использованием пакета прикладных программ Statistica 5.0, MS Excel XP.

Результаты и их обсуждение. У больных с трофическими язвами и гнойно-некротическими ранами при СДС отмечаются выраженные иммунологические нарушения, проявляющиеся в статистически достоверном увеличении ЦИК. Динамика изменения уровней ЦИК представлена в таблице.

Таблица 1– Мониторинг уровней ЦИК у больных с СДС на фоне местного лечения (M±m)

Группа больных	Подгруппа больных	n	Сроки наблюдения	Уровень ЦИК, ед.
СФ СДС	IA	22	Поступление	50,71±3,75
			7 сутки	34,71±2,60
			14 сутки	23,92±1,86
	IБ	16	Поступление	49,83±3,98
			7 сутки	38,74±3,17
			14 сутки	29,36±2,26
ИФ СДС	IIA	18	Поступление	58,85±5,03
			7 сутки	45,62±3,74
			14 сутки	29,87±2,37
	IIБ	14	Поступление	55,63±4,62
			7 сутки	47,34±3,38
			14 сутки	33,67±2,53
Контроль		14		14,71±3,08

Примечание. В динамике лечения внутри подгрупп различия достоверны на 7 и 14 сутки по сравнению с показателями при поступлении ($p<0,05$).

Начальный фон уровня ЦИК был повышен во всех группах больных по отношению к контролю. Наибольшие значения отмечались у больных при ИФ СДС, и превышали контрольные почти в 4 раза (58,85±5,03 против 14,71±3,08). У больных при СФ СДС уровни ЦИК превышали контрольные в 3,4 раза (50,71±3,75 против14,71±3,08). В процессе лечения отмечено снижение уровней ЦИК также во всех клинических группах больных. Однако у больных, которым

применяли стандартную местную терапию, процесс стабилизации концентрации ЦИК носил менее выраженный характер.

Динамика уменьшения уровней ЦИК прослеживалась уже, начиная с 7 суток местной терапии во всех группах больных. Так, во всех подгруппах больных, у которых для местной терапии применяли СТС отмечено снижение уровней ЦИК по отношению к начальному фоновому: на 32% при СФ СДС (50,71±3,75 против 34,71±2,60) и на 23% при ИФ СДС (58,85±5,03 против 45,62±3,74). В тоже время у больных, которым применяли стандартную местную терапию, это снижение носило менее выраженный характер: 22% при СФ СДС (49,83±3,98 против 38,74±3,17) и на 15% при ИФ СДС (55,63±4,62 против 47,34±3,38).

Аналогичные тенденции наблюдались и к 14 суткам у больных с СДС. Так, у больных, которым для местной терапии использовали СТС, к 14 суткам отмечено снижение уровней ЦИК по отношению к начальному фоновому: на 53% при СФ СДС (50,71±3,75 против 23,92±1,86), на 49% при ИФ СДС (58,85±5,03 против 29,87±2,37). У больных же, которым применяли стандартную местную терапию, это снижение носило менее выраженный характер, а именно 41% при СФ СДС (49,83±3,98 против 29,36±2,26), около 40% при ИФ СДС (55,63±4,62 против 33,67±2,53).

Полученные нами результаты коррелируют с изменениями уровней ЦИК у больных с трофическими язвами венозного генеза [8], что может свидетельствовать о похожем повреждающем механизме ЦИК и при СДС. По всей видимости это связано с реологическими нарушениями, приводящими к нарушениям микроциркуляции. Даже при незначительном повышении их уровня ЦИК накапливаются в тканях, повышается агрегация и адгезия тромбоцитов, что приводит к нарушению микроциркуляции крови и облитерации сосудов гемомикроциркуляторного русла, повреждению и некрозу тканей [1].

Во всех исследованных клинических группах к 14 суткам уровни ЦИК так и не достигли уровня контроля (нормы). Однако включение в местную терапию СТС способствовало более быстрому и успешному восстановлению иммунологической реактивности в ране, что вело к достоверному сокращению продолжительности раневого процесса.

Выводы. Применение СТС в комплексном лечении СДС статистически значимо ($p<0,05$) влияет на развитие аутоиммунных процессов, позволяющее к 7 суткам достоверно ($p<0,05$) снизить уровни ЦИК по отношению к начальному фоновому: на 32% при СФ СДС (50,71±3,75 против 34,71±2,60) и на 23% при ИФ СДС (58,85±5,03 против 45,62±3,74), в сравнении с группой сравнения, где это снижение носило менее выраженный характер: 22% при СФ СДС (49,83±3,98 против 38,74±3,17) и на 15% при ИФ СДС (55,63±4,62 против 47,34±3,38).

Список литературы

1. А. Г. Кузнецов, Уровень циркулирующих иммунных комплексов и фагоцитарной активности моноцитов при поллинозе с сенсибилизацией к пыльце амброзии, который протекает на фоне хронического бескаменного холецистита / А. Г. Кузнецов // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2015. – №1(13). – С. 95–102.

2. В.Э. Сагынбаева, Повышение содержания циркулирующих иммунных комплексов - C1q и C3d как критерий обострения внекишечных проявлений язвенного колита / В. Э. Сагынбаева, Л. Б. Лазебник // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – №7(107). – С. 18–24.

3. Атерогенез у человека – клинические аспекты циркулирующих иммунных комплексов / Я. Д. Бабинцева, А. М. Сергеева, В. П. Карагодин, А. Н. Орехов // Клиническая медицина. – 2016. – №94(5). – С. 325–332.

4. А. И. Рундо, Современные аспекты этиологии и патогенеза синдрома диабетической стопы / А. И. Рундо // Новости хирургии. – 2015. – Т.23, №1. – С. 97–104.

5. Ю. И. Строев, От диабетической нейроангиопатии – к диабетической стопе: клиническая патофизиология грозного синдрома / Ю. И. Строев, Л. П. Чурилов // Клиническая патофизиология. – 2016. – №2. – С. 74–94.

6. Ю. А. Гриневич, Основы клинической иммунологии опухолей / Ю. А. Гриневич, Л. Я. Каменец – К. : Здоровье, 1986. – С. 56–57.

7. T. A. Lang, Statistical Analyses and Methods in the Published Literature: The SAMPL Guidelines / T. A. Lang, D. G. Altman // Medical Writing. – 2016. – Vol. 25(3). – P. 31–36.

8. В. В. Изосимов, Возможные пути повышения эффективности комплексного лечения осложненных форм хронической венозной недостаточности нижних конечностей / В. В. Изосимов, Э. Э. Умеров, С. Г. Гривенко // Международный научно-исследовательский журнал. – 2018. – №1-2(67). – С. 49–54.

ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ И КЛИК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ NBD-АЗИДОАНИЛИНА И ГЕКСИНА

Карпушенкова Вероника Сергеевна
стажер м.н.с., БГУ, химический факультет, г.Минск
karpushenkova.v.s@gmail.com
Фалетров Ярослав Вячеславович
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник, НИИ ФХП БГУ, г.Минск
yaroslav82@tut.by
Шкуматов Владимир Макарович
д.б.н., профессор, заведующий лабораторией, НИИ ФХП БГУ, г. Минск
biopharm@bsu.by

Цель данной работы заключается в исследовании взаимодействия нитробензоксадиазольного производного п-азидоанилина (NBD-азидоанилина) с гексином-1. NBD-соединения способны флуоресцировать, вследствие чего они потенциально применимы в диагностике различных заболеваний и в качестве биологических молекулярных проб. Изучение фотохимии данных соединений может дать новые варианты многофункциональных молекулярных проб для биологичеких исследований. Для расчетно-теоретической части работы использовались следующие методы и приборы: источник излучения (450 нм), программа Gaussian 09W. Определено, что NBD-азидоанилин в смеси с гексином-1 при облучении синим светом дает продукт, флуоресцирующий желтым, а при катализе медью – соединение малинового цвета. Выяснение молекулярных основ данных процессов позволит разработать новые молекулярные пробы или средства для фотодинамической терапии.

Ключевые слова: *фотохимия; флуоресценция; NBD-метки; азиды; клик-химия.*

PHOTOINDUCED AND CLICK INTERACTIONS OF NBD-AZIDOANILINE AND HEXYNE

Karpushenkova Veronika
intern research assistant, BSU, Chemistry Department, Minsk
karpushenkova.v.s@gmail.com
Faletrov Yaroslav
C.Ch.Sc., associate professor, lead researcher, Research Institute for Physical Chemical Problems of the BSU, Minsk
yaroslav82@tut.by
Shkumatov Vladimir
C.B.Sc., professor, head of the laboratory, Research Institute for Physical Chemical Problems of the BSU, Minsk
biopharm@bsu.by

The aim of this work is to investigate interaction between nitrobenzoxadiazole derivative of p-azidoaniline (NBD-azidoaniline) and hexyne-1. NBD-compounds can fluoresce, therefore, they are applicable as molecular probes and, potentially, for disease diagnostics. Studying the photochemistry of these compounds may result in new intriguing options of multifunctional molecular probes obtained in mild conditions. The following methods and tools were used: light source (450 nm), Gaussian 09W software. Eventually, the mixture of NBD-azidoaniline and hexyne-1 yields the yellow fluorescent product, whereas copper-catalyzed reaction gave a purple compound. Elucidation of the processes will allow to develop new molecular probes and photodynamic therapy agents.

Key words: *photochemistry; fluorescence; NBD-markers; azides; click-chemistry.*

Флуоресценция NBD-соединений является важной характеристикой, позволяющей применять данные вещества для различных медицинских целей. Они хорошо проявляют себя в исследованиях как флуоресцентные пробы для биоимиджинга биотиолов, позволяющих отличить раковые клетки от нормальных [1, 2].

Также NBD-производные применяют в качестве пролекарств, флуоресцентных меток для белков, при анализе ферментов [3]. Исследуется взаимодействие NBD-соединений с белками плазмы крови на предмет их потенциального связывания с последними с целью транспорта внутри организма [4]. Последние исследования показывают, что NBD-соединения потенциально способны проходить биологические мембраны, а также связываются с белками, к примеру, с важным для метаболизма живых организмов цитохромом P450 [5].

Материалы и методы исследования.

Все реактивы были производства Sigma-Aldrich. Источником синего света (длина волны максимума излучения 450 нм) выступал фотодиодный прожектор. Квантово-химические расчеты проводили с использованием программы Gaussian 09W.

Результаты и обсуждение.

Исследование фотохимии NBD-азидоанилина в растворе 97% гексина-1 проводилось с использованием фотодиодного прожектора, испускающего синее излучение с длиной волны 450 нм. Исследовался раствор 160 мкМ концентрации NBD-азидоанилина в гексине-1, изначальный стоковый раствор с концентрацией 1 мг/1 мл NBD-азидоанилина был приготовлен растворением сухой навески чистого вещества в ацетонитриле. К 400 мкл гексина-1 в виале добавляли 20 мкл стокового раствора. В качестве контрольного образца был взят раствор в метаноле, приготовленный из того же стокового раствора по описанной схеме. Также в отдельной виале параллельно в место без доступа света был помещен аналогичный раствор в гексине-1. В ходе первых 5-7 минут в исследуемом

образце под действием излучения нарастала интенсивность желтой флуоресценции. Опыт проводился в течение 30 минут. Контрольный необлученный образец был оставлен на сутки, в результате флуоресценция в синем излучении для него не наблюдалась. Облученный контрольный образец в метаноле по истечении времени не приобрел флуоресцирующие свойства.

Отдельным контрольным опытом стало облучение аналогичных смесей, для которых вместо NBD-азидоанилина был взят NBD-этиниланилин. Ни один из трех образцов не проявил флуоресцентных свойств по окончании опыта. Также выяснено, что раствор 97% гексина-1 не флуоресцирует после облучения в видимом диапазоне.

Из возможных механизмов, помимо фотоиндуцируемых радикальных превращений с участием нитренового интермедиата [6], под действием излучения потенциально может происходить клик-взаимодействие, аналогичное катализируемому соединениями меди взаимодействию, указанному на рисунке 1.

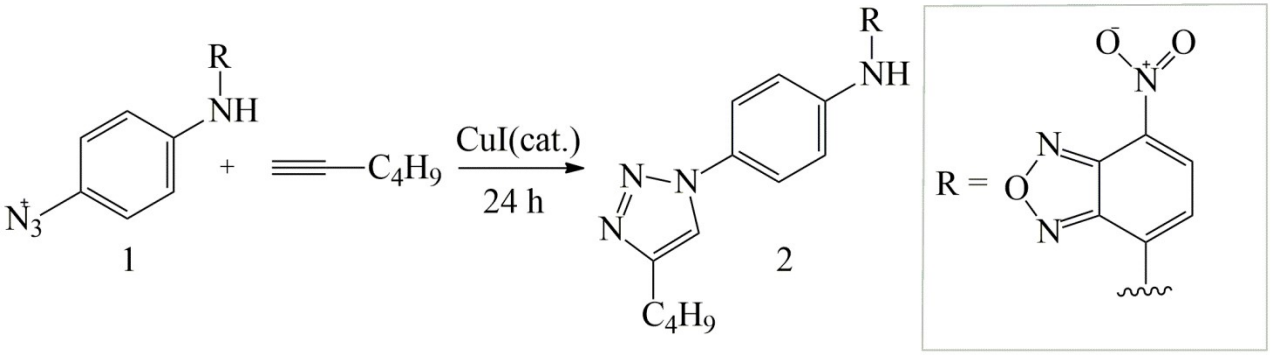


Рисунок 1 – Схема клик-взаимодействия производных азидоанилина (1) и гексина

Из DFT расчетов было выяснено, что на энергию Гиббса реакции наличие NBD-заместителя не влияет. DFT расчеты проводились с использованием b3lyp/6-31+g(d,p) теоретического уровня, полученное значение энергии Гиббса S0 состояния для NBD-азидоанилина составило -1070.090218 a.u, азидоанилина – -451.144638 a.u. Теоретические значения энергии Гибсса, рассчитанные с использованием hf/sto-3g теоретического уровня в вакууме для клик-реакций с NBD-производным и п-азидоанилином, (рисунок 1), составили -0,162339 и -0,163499 a.u. соответственно, т.о., NBD заместитель практически не влияет в данном случае на энергию Гиббса реакции. Клик-химия NBD-азидоанилина и п-азидоанилина интересна для разработок в области медицинской химии, где данный подход используется для получения соединений с триазольной функцией, часто выступающей фармакофором в фармацевтически активных соединениях. Помимо этого клик-реакции используются для поиска соединений-лидеров, в биоконъюгационных стратегиях в протеомике и для исследования ДНК [7]. Клик-реакции проходят при физиологических условиях, однако чаще

всего катализируются в присутствии солей или комплексов меди, что ограничивает их потенциальное применение для получения лекарственных веществ вследствие токсичности меди [8].

Заключение. Выявлено новое индуцируемое видимым светом превращение между алкином и азидом, а также проведена реакция клик-химии между ними, приводящая к образованию продукта пурпурного цвета. Выявленные превращения частично охарактеризованы квантово-химическими расчетами и фотометрически. Выяснение молекулярных основ данных процессов позволит разработать новые молекулярные пробы или средства для фотодинамической терапии.

Финансирование работы. Работа проведена при поддержке грантов ГПНИ № г.р. 20210560 (Я.В.Фалетров, В.М. Шкуматов), а также гранта Министерства Образования № 20220695.

Список литературы

1. A novel highly sensitive fluorescent probe for bioimaging biothiols and its applications in distinguishing cancer cells from normal cells / H. Zhu [et al.] // Analyst, 2019. – № 144 – P. 7010-7016.

2. A near-infrared Nile Red fluorescence probe for discrimination of biothiols by dual-channel response and its bioimaging applications in living cells and animals / J.-S. Lan [et al.] // Analyst, 2019. – P. 1-9.

3. NBD-based synthetic probes for sensing small molecules and proteins: design, sensing mechanisms and biological applications / C. Jiang [et al.] // Chem. Soc. Rev., 2021. – № 50. – P. 7436-7495.

4. Interaction of nitrobenzoxadiazole derivatives of piperazine and aniline with bovine serum albumine in silico and in vitro / Y.V. Faletrov [et al.] // Journal of the Belarusian State University. Chemistry . – 2021. – № 2. – P. 25-35.

5. New lipophilic conjugates of fluorescent NBD-piperazine: synthesis, in silico interactions with lipid bilayer and cytochromes P450 / Y. Faletrov [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus Chemical Series, 2022. – № 58(1). – P. 62-67.

6. Photochemistry of N-Phenyl Dibenzothiophene Sulfoximine. / A. Isor [et al.] // Photochemistry and Photobiology. – 2021. – doi:10.1111/php.13456.

7. H. C. Kolb, The growing impact of click chemistry on drug discovery / H. C. Kolb, K. B. Sharpless // DDT, 2003. – Vol. 8. – № 24. – p. 1128-1137.

8. Recent applications of click chemistry in drug discovery / X. Jiang [et al.] // Expert Opinion on Drug Discovery, 2019. – Vol. 14. – № 8. – p. 779-789.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ БЕЗРЕЦИДИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С III СТАДИЕЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО

Ковганко Николай Николаевич
к.х.н, доцент кафедры биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
mikalai44@tut.by
Таганович Анатолий Дмитриевич
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
ataganovich@gmail.com;
Прохорова Виолетта Игоревна
д.м.н., профессор, заведующий диагностическим отделом с группой лучевой диагностики ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», а.г. Лесной
vprohorova@mail.ru
Мурашко Дарья Игоревна
аспирант кафедры биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
dashamurashka@mail.ru
Колб Александр Владимирович
к.б.н., доцент кафедры биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
sanya.kolb@yandex.by
Готько Оксана Владимировна
Аспирант, научный сотрудник ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», а.г. Лесной
babuka05@mail.ru

Установлено, что концентрация моноцитов, эозинофильных лейкоцитов, относительное количество лимфоцитов с рецептором CXCR1 в крови и уровень Cyfra 21-1 в сыворотке крови до оперативного лечения имеют связь с длительностью безрецидивного периода у пациентов с АК III стадии после резекции опухоли. На основе указанных показателей разработано регрессионное уравнение, прогностическая эффективность которого в отношении развития рецидива в течении 1 года после проведенного лечения составила 87,5%.

Ключевые слова: *немелкоклеточный рак легкого; кровь; аденокарцинома; III стадия.*

PREDICTION OF RECURRENCE-FREE SURVIVAL FOR PATIENTS WITH STAGE III LUNG ADENOCARCINOMA

Kauhanka Nikolay Nikolaevich

C.Ch.Sc., associate professor of the department of biological chemistry Belarusian State Medical University, Minsk
mikalai44@tut.by
Tahanovich Anatoly Dmitrievich
Dr.M.Sc., professor, head of the department of biological chemistry Belarusian State Medical University, Minsk
ataganovich@gmail.com
Prokhorova Violetta Igorevna
Dr.M.Sc., professor, the head of diagnostics department with the group of radiodiagnostics, N.N. Alexandrov Republican Center of Oncology and Medical Radiology, Lesnoy
vprohorova@mail.ru
Murashka Darya Iharayna,
Aspirant of the department of biological chemistry Belorusian State Medical University, Minsk
dashamurashka@mail.ru
Kolb Alexander Vladimirovich
C.B.Sc, associate professor of the department of biological chemistry Belorusian State Medical University, Minsk
sanya.kolb@yandex.by,
Gotko Oksana Vladimirovna
Aspirant, junior research assistant, N.N. Alexandrov Republican Center of Oncology and Medical Radiology, Lesnoy
babuka05@mail.ru

It was established that the concentration of monocytes, eosinophilic leukocytes, the relative number of lymphocytes with the CXCR1 receptor in the blood and the level of Cyfra 21-1 in the blood serum before surgical treatment are associated with the duration of the relapse-free period in patients with stage III AK after tumor resection. Based on these indicators, a regression equation was developed, the prognostic effectiveness of which in relation to the development of relapse within 1 year after the treatment was 87.5%.

Key words: *non-small cell lung cancer; blood; adenocarcinoma; III stage.*

Актуальность. Рак легкого занимает одну из лидирующих позиций в структуре онкологических заболеваний. Ежегодная смертность от него составляет 1,3 млн [1]. Более 85% всех случаев рака легкого приходится на немелкоклеточный рак (НМРЛ), и наиболее частыми гистологическими подтипами его являются аденокарцинома (АК) и плоскоклеточный рак: 50% и 30% случаев НМРЛ соответственно [2].

Приблизительно у 20%–25% пациентов с АК диагностируют III стадию, которая характеризуется низкой выживаемостью [1]. Даже после полной

резекции и послеоперационной адъювантной химиотерапии у 20–40% пациентов сохраняется риск рецидива опухоли [2].

Основными препятствиями в их лечении являются развитие регионарных или отдаленных метастазов и резистентность к химиотерапии [1,2].

Поэтому имеется необходимость поиска прогностических факторов или биомаркеров, которые могли быть использованы для предсказания безрецидивной выживаемости пациентов и ответа на лечение.

В настоящем исследовании изучалась возможность использования дооперационного уровня ряда вышеперечисленных показателей, характеризующих клеточный состав и метаболизм в крови пациентов с III стадией аденокарциномы легкого, для прогнозирования их безрецидивной выживаемости.

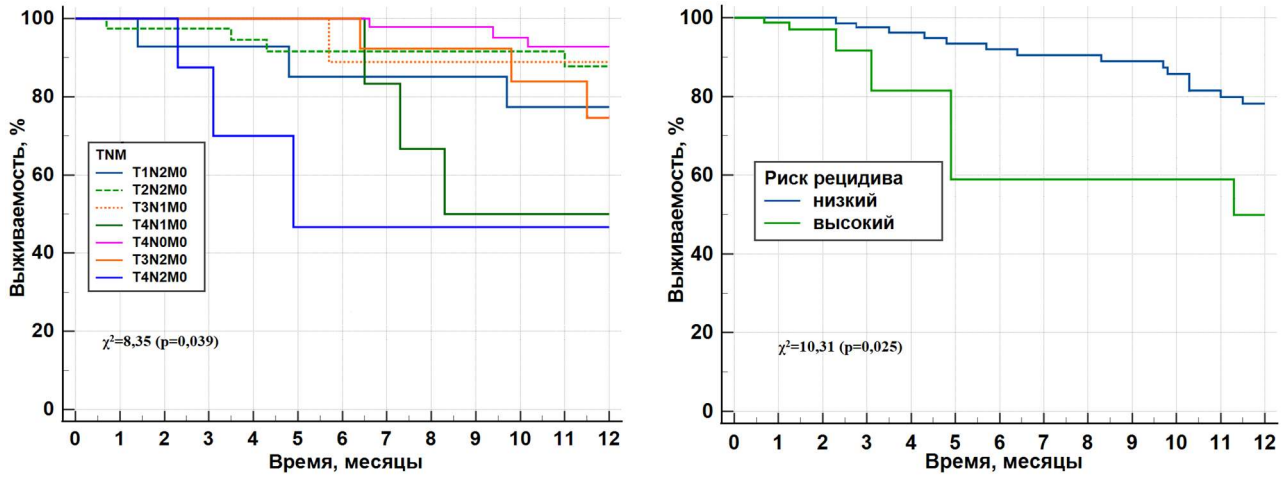
Материал и методы. В исследовании участвовал 451 пациент с впервые диагностированной аденокарциномой легкого III стадии при поступлении в стационар ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» в период с 01.01.2015 по 31.12.2021. Средний возраст пациентов составил 59±26 лет.

После проведенного им хирургического лечения (объем резекции соответствовал R0), анализировалась длительность безрецидивного периода по результатам наблюдения в течение одного года. У 40 пациентов в образцах сыворотки крови определяли концентрацию CYFRA 21-1, SCC, TPA на автоматическом анализаторе Cobas e411 (Rosche Diagnostics GmbH, Германия). Измерение концентрации CXCL5, CXCL8, TuM2 PK, HIF-1α и гиалуроновой кислоты проводилось с помощью ИФА-наборов FineTest (КНР) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия). Долю клеток крови, снабженных CXCR1 и CXCR2, CD44v6 и плотность этих рецепторов на их поверхности определяли, используя проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США). При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали как равное 5%.

Результаты и обсуждение. Стадия III АК неоднородна и разделяется на IIIA, IIIB и IIIC стадии [1]. Каждая из них включает несколько сочетаний дескрипторов, различающихся размером опухоли (T) и степенью распространенности регионарных метастазов (N), но характеризуется одинаковым отсутствием удаленных метастазов (M0). Поскольку пациенты с поражением лифлоузлов в контралатеральном легком (N3) не подвергаются хирургическому лечению (все они относятся к IIIC стадии и частично к IIIB), для оценки влияния на выживаемость использовались данные пациентов с N0-2. Соответственно построенному графику Каплана-Майера (рис. 1а), пациенты через год после проведенного лечения разделяются на две группы. Одна характеризуется сравнительно высокой выживаемостью и включает пациентов с T1N2M0, T3N1M0, T2N2M0, T4N0M0, T3N2M0. В другую группу (T4N1M0 и

T4N2M0) входят пациенты с более коротким безрецидивным периодом. На основании полученных данных были сформированы две группы: высокого и низкого риска развития рецидива опухоли (рис. 2б).

В группе высокого риска из 42 лабораторных показателей только концентрация моноцитов (М), эозинофильных лейкоцитов (Э), отношение Э/М, доля лимфоцитов с рецептором CXCR1 и уровень Cyfra 21-1 были существенно выше, чем в группе низкого риска. (табл. 1). Остальные показатели (уровень SCC, TPA, HIF-1α и др.) были неинформативными.



(а) (б)

Рисунок 1 – Безрецидивная выживаемость пациентов с III стадией АК в зависимости от: а) размера опухоли и наличия регионарных метастазов, б) группы риска.

Таблица 1 – Уровень показателей в группах риска, статистически достоверно отличающийся у пациентов с III стадией АК

Показатель	Низкий риск	Высокий риск	p
М, $x10^9$/л	0,61 [0,51 – 0,72]	0,92 [0,68 – 1,19]	**0,031**
Э, $x10^9$/л	0,12 [0,060 – 0,21]	0,34 [0,30 – 0,45]	**0,006**
Э/М	0,157 [0,088 – 0,287]	0,469 [0,288 – 0,682]	**0,021**
Доля лимфоцитов с CXCR1, %	1,60 [0,70 – 2,30]	3,50 [3,40 – 4,80]	**0,016**
CYFRA 21-1, нг/мл	2,98 [2,22 – 4,24]	5,35 [3,60 – 12,31]	**0,031**

Согласно результатам ROC-анализа самая высокая специфичность (82,4%) характерна для определения относительного количества лимфоцитов, снабженных CXCR1, в то время как диагностическая чувствительность значений этого показателя не превышает 66,7% (табл. 2). Значения других показателей имели соизмеримые цифры этих параметров в диапазоне 63,2%-76,2%. Как результат, эффективность их использования для прогнозирования

безрецидивной выживаемости самой низкой была у концентрации моноцитов – 65%, а самой высокой у лимфоцитов, снабженных CXCR1 – 75%.

Три показателя: Cyfra 21-1, CXCR1 лимфоциты и соотношение Э/М были вовлечены в регрессионный анализ для составления уравнения:

$$Y=\frac{\exp(-14{,}022+0{,}539*X1+1{,}294*X2+12{,}035*X3)}{1+\exp(-14{,}022+0{,}539*X1+1{,}294*X2+12{,}035*X3)},$$

где X1 – результат определения концентрации (нг/мл) антигена Cyfra 21-1 в сыворотке крови; X2 – относительное количество (%) рецептора CXCR1 в лимфоцитах; X3 – отношение эозинофильных лейкоцитов к моноцитам; Y - результат регрессионного уравнения; числа перед значениями X1-X3 – коэффициенты логистической регрессии; «– 14,022» – константа логистического уравнения.

Таблица 2 – Диагностическая значимость определения уровня параметров в крови пациентов с низким и высоким риском рецидива

Показатель	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
Доля лимфоцитов с CXCR1, %	>2,55	66,7	84,2	82,4	69,6	0,713	75,0
CYFRA 21-1, нг/мл	>4,16	71,4	73,7	74,8	69,9	0,703	72,5
М, $x10^9$/л	>0,77	66,7	63,2	66,7	63,2	0,631	65,0
Э, $x10^9$/л	>0,24	61,9	73,7	72,2	63,6	0,653	67,5
Э/М	>0,313	76,2	63,2	69,6	70,6	0,672	70,0
Y	**>0,597**	**85,7**	**94,7**	**90,0**	**85,0**	**0,842**	**87,5**

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

Эффективность определения вероятности низкого или высокого риска развития рецидива в случае использования результатов логистического уравнения значительно выросла – до 87,5% (чувствительность – 85,7%, специфичность – 94,7%). Как видно, все эти показатели оказались гораздо выше, чем при использовании каждого из них в отдельности (табл. 2).

Работоспособность предложенной регрессионной модели на основе полученного порогового значения Y=0,597 демонстрирует график Каплана-Майера выживаемости пациентов с III стадией АК до рецидива (рис. 2). Распределение выживаемости на относительно высокую и низкую соответствует результатам TNM-стратификации (рис. 1б). Выживаемость к концу первого года для пациентов с низким риском развития опухолевой прогрессии составляет 79% – для TNM-стратификации и 77% – при вовлечении отобранных параметров крови в регрессионное уравнение. Для пациентов с высоким риском опухолевой прогрессии к концу первого года после проведенного лечения составляет 49% и 48%, соответственно. Медианное значение длительности периода

безрецидивной выживаемости для группы высокого риска составляет 11,3 месяца для TNM-стратификации и 11,4 месяцев – при оценке выживаемости по лабораторным показателям. Обращает внимание еще одно обстоятельство. Отчетливая разница между графиками высокого и низкого рисков безрецидивной выживаемости пациентов, построенными на основе значений регрессионного уравнения имеет место уже на первом месяце после проведенного лечения и в дальнейшем она увеличивается. Различия же кривых высокой и низкой безрецидивной выживаемости, построенных на основе TNM, появляется только спустя два месяца после проведенного лечения.

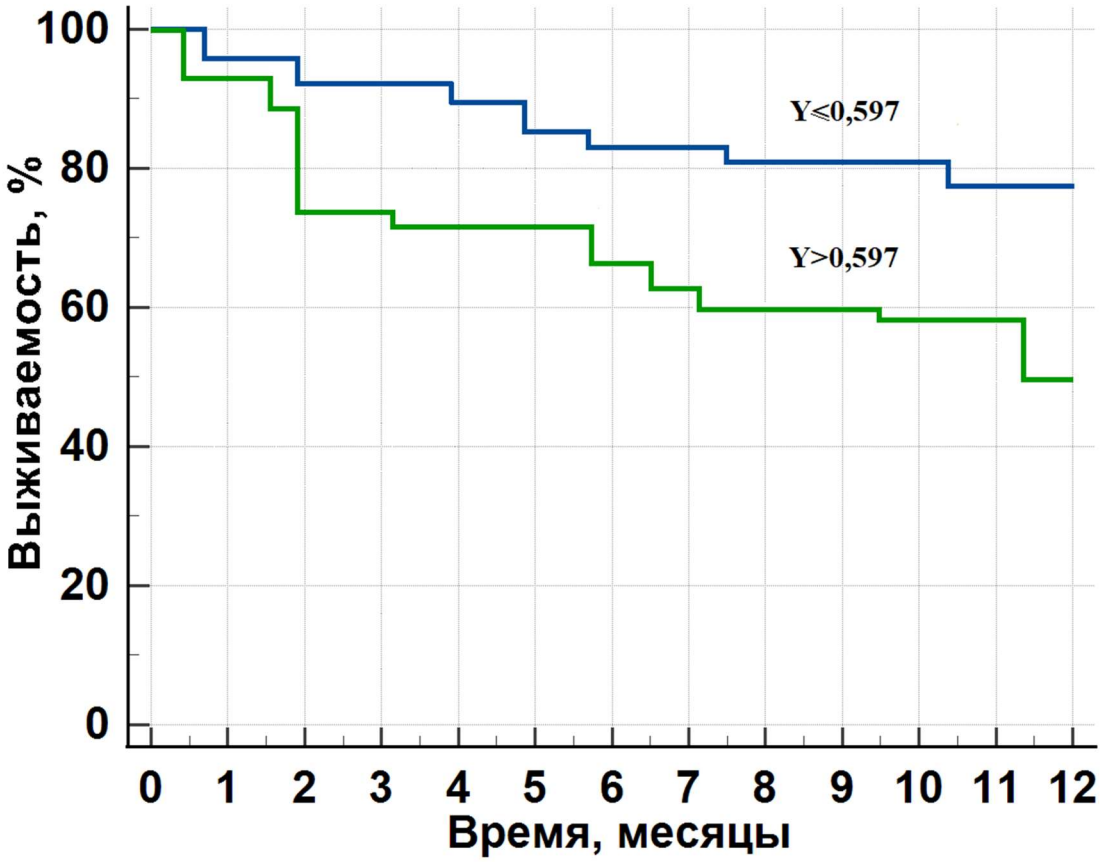


Рисунок 2 – Безрецидивная выживаемость пациентов с III стадией АК в зависимости от результата регрессионного уравнения Y

Заключение. Проведение графического анализа Каплана-Майера и последующий отбор критериев, позволивших разделить пациентов с III стадией АК на группы высокого и низкого риска рецидива заболевания, обосновывают связь концентрации моноцитов, эозинофильных лейкоцитов, доли лимфоцитов с рецептором CXCR1 в крови и уровня Cyfra 21-1 в сыворотке крови с длительностью безрецидивного периода у данных пациентов. Составленное регрессионное уравнение будет полезно для использования в предсказании

безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией АК после оперативного лечения в объеме R0.

Список литературы

1. J. Vansteenkiste, Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. / J. Vansteenkiste, P.E. Postmus, K.M. Kerr, et al. // *Ann. Oncol*. 2013. – Vol. 24, № 6. –. P. 89–98.

2. P. Perez-Moreno, Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities. / P. Perez-Moreno, E. Brambilla, R. Thomas, J.C. Soria // *Clin. Cancer. Res*. 2012. – Vol. 18, № 9. – P. 2443-2451.

АНТИВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ ВИРУСА SARS-COV-2)

Колбас Наталья Юрьевна
к.б.н., доцент, научный сотрудник, ГНУ «Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси», г. Брест
n.kolbas@gmail.com
Колбас Елизавета Александровна
студентка 3 курса, фармацевтический факультет, УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
n.kolbas@gmail.com

Методом молекулярного докинга оценена способность 21 фенольного соединения выступать в качестве лигандов активных сайтов трех протеинов, блокирующих проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетку (спайкового белка, трансмембранной сериновой протеазы-2 и ACE-2). Проанализированы химические связи, обеспечивающие взаимодействие между лигандами и радикалами аминокислотных остатков белковых сайтов. Наиболее эффективно полифенолы связывают сайты ACE-2 (энергия связывания от -9,2 до -4,3 ккал/моль) и спайкового белка (энергия связывания от -8,39 до -4,41 ккал/моль).

Ключевые слова. *Фенольные соединения; SARS-CoV-2, ACE-2, S-гликопротеин; TMPRSS2; молекулярный докинг; энергия связывания*

ANTIVIRAL EFFECT OF PHENOLIC COMPOUNDS (THE SARS-COV-2 VIRUS EXAMPLE)

Kolbas Natallia Jurievna
C.B.Sc., docent, researcher, Polesie Agrarian Ecological Institute of the NAS of Belarus, Brest
n.kolbas@gmail.com
Kolbas Elizaveta Alexandrovna
Student, Faculty of Pharmacy, Belarusian State Medical University, Minsk
n.kolbas@gmail.com

The ability of 21 phenolic compounds as ligands of active sites of three proteins of SARS-CoV-2 was determined by molecular docking. Chemical bond interactions between ligands and protein sites of ACE-2, TMPRSS2 and spike glycoprotein have been analyzed. Polyphenols most effectively bind the ACE-2 sites (binding energy from -9.2 to -4.3 kcal/mol) and the spike protein (binding energy from -8.39 to -4.41 kcal/mol).

Keywords. *Phenolic compounds; SARS-CoV-2, ACE-2, S-glycoprotein; TMPRSS2; molecular docking; binding energy*

Растительные фенольные соединения (ФС), которых в настоящее время выявлено более 8000, снижают вероятность воспалительных процессов, которые, в свою очередь являются причиной многих хронических заболеваний, таких как болезни сердца, гипертония и сахарный диабет. Установлено противовирусное действие ресвератрола, кемпферола, кверцетина и его производных по отношению к вирусу простого герпеса первого типа, непитрина, непетина, гиспидулина, рутина, кверцетина и его производных, а также эпигаллокатехингаллата и бифлавоноидов – к H1N1, рутина, кверцетина, изокверцетина, хлорогеновой кислоты и ее производных – к вирусу H5N1, ресвератрола – к MERS-, вирусу Зика, денге. Мощными ингибиторами репликации вируса гепатита С являются производные ресвератрола – олигостильбеноины (+)-ε-виниферин, вилсонол С, витизины А и В [1; 2].

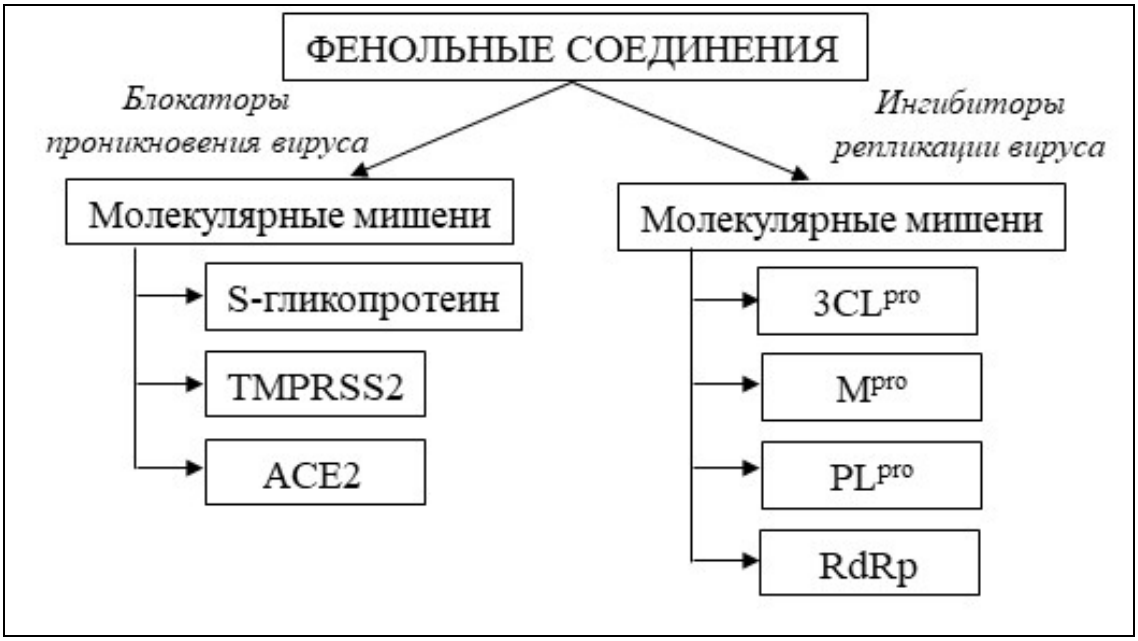


Рисунок 1 – Роль фенольных соединений в блокировке вируса SARS-CoV-2: S-гликопротеин – спайковый вирусный белок; TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза-2; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; вирусные протеазы: M^{pro} , $3CL^{pro}$ и PL^{pro}, RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза

В 2020-2022 гг. *in silico* активно изучается антивирусное действие ФС по отношению к SARS-CoV-2. На молекулярном уровне ФС перспективны в качестве ингибиторов вирусных протеаз благодаря высокому сродству к белкам и низкому уровню токсического действия. А также благодаря взаимодействию с вирусными мембранными белками и/или клеточными белками ФС обладают способностью блокировать ранние стадии инфекций (включая прикрепление, проникновение и репликацию генома путем ингибирования обратной транскриптазы *in vitro* и *in vivo*) [3]. Схема возможных молекулярных мишеней антивирусного действия ФС по отношению к вирусу SARS-CoV-2 представлена

на рисунке 1. Отметим, что именно ACE-2 (ангиотензинпревращающий фермент 2; КФ: 3.4.17.23) человека является рецептором и точкой входа в клетку коронавирусов [1].

Целью исследования был анализ способности отдельных ФС выступать в качестве лигандов протеинов, блокирующих проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетку.

Методы исследования. Ингибирующее действие 21 ФС по отношению к сайтам белков вирусной инфекции вызванной SARS-CoV-2 изучали методом молекулярного докинга с использованием программного обеспечения Autodock Vina согласно алгоритму [4]. 3-D структура белков была получена из банка данных (*Protein Data Bank*: 6VXX – ID для S-гликопротеина; 1R42 – ID для ACE-2; 2OQ5 - ID для TMPRSS2) с разрешением 2,0 Å. Структура ФС извлечена из базы PubChem.

Результаты и их обсуждение. При изучении роли 21 ФС (6 – антоцианов, 5 – флавонолов, 4 – флаванона, 3 – флаван-3-ола, 2 – флавона и 1 стильбен) в блокировке активных центров белков-мишеней проникновения вируса SARS-CoV-2 (S-гликопротеина, TMPRSS2 и ACE-2) установлено участие: во-первых гидроксогрупп полифенолов с образованием как классических водородных связей (наиболее часто с радикалами аспарагина, цистеина, глютаминовой кислоты, глютамина, глицина, гистидина, серина, лизина, триптофана и тирозина активных центров спайкового гликопротеина и TMPRSS2, аспарагина, глютамина, гистидина ACE-2 рецептора), так и неклассических водородных связей (C–H, π–донор с радикалами аспарагина, глицина, гистидина, серина, лизина, триптофана и тирозина); во-вторых, кислорода карбонильной группы трехуглеродного связующего фрагмента таких флавоноидов, как кверцетин (флавонол) и лютеолин (флавон). В-третьих, кислород трехуглеродного связующего фрагмента таких флавоноидов, как кверцетин (флавонол), нарингенин (флаванон), апигенин и лютеолин (флавон) образует классические водородные связи с радикалами аминокислотных остатков аргинина или гистидина активного центра ACE-2 рецептора, серина или глицина TMPRSS2.

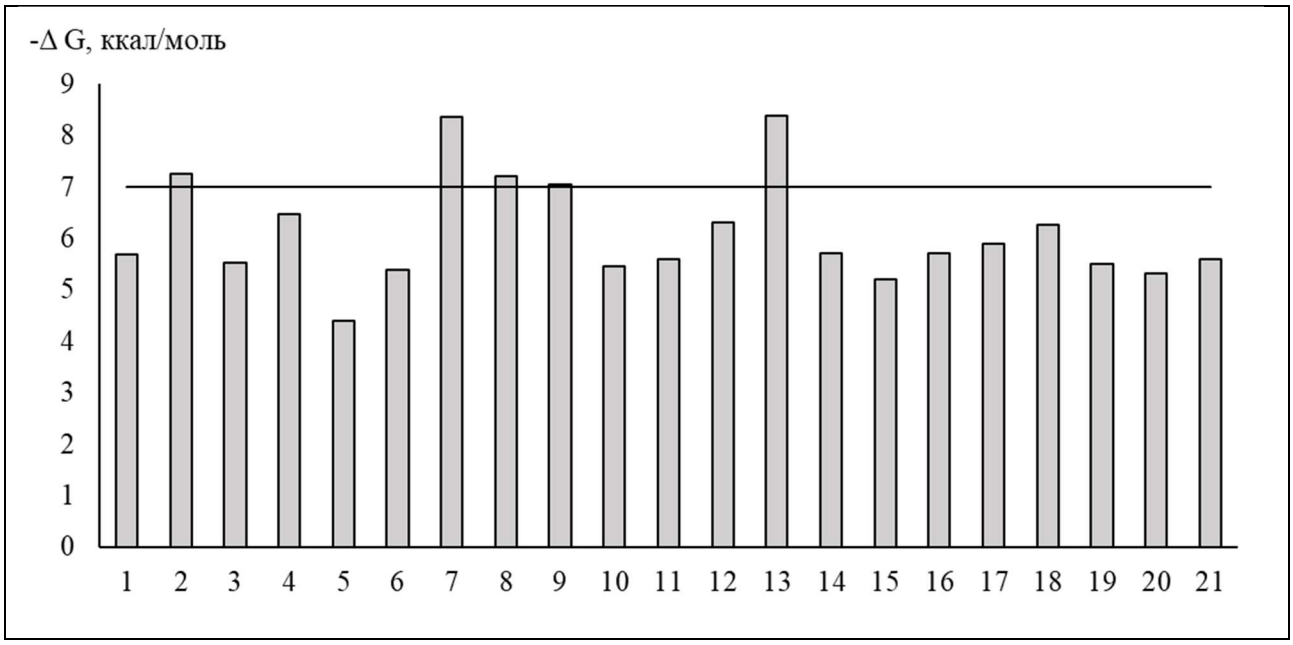
Стоит отметить, что >C=O (флавонолов, флавонов, дигидрофлавонов, изофлавонов, флаванонов) предпочтительны для электрофильной атаки, а группы –OH ФС подходят для нуклеофильной атаки [5].

Сопряженные π-системы колец *A* и *B* флавоноидов участвуют в стэккинг взаимодействии с радикалами аминокислотных остатков аргинина, лизина (π-катион), глутаминовой и аспарагиновой кислот (π-анион), триптофана и гистидина (π-π^+), пролина и фенилаланина (π-π), аланина, изолейцина, лейцина и валина (π-алкил), метионина (π-S), глицина, цистеина и тирозина (π-H) активных центров изученных белков-мишеней. Ресвератрол (стильбен) образует π-катион-связь с радикалом лизина, π-H-связь с тирозином активного центра спайкового белка и π-алкил-связь с валином и π-π-связь с пролином TMPRSS2. Ван-дер-

Ваальсовое взаимодействие занимает важное место в блокировке аминокислотных остатков такими лигандами как полифенолы и составляет в среднем от 18,7 до 77,8 % (чаще антоцианы) всех взаимодействий.

Часто радикалы аминокислотных остатков сайтов вирусных белков и ACE-2 образуют несколько различных связей с ФС. Например, тирозин активного центра S-гликопротеина образует водородную связь с OH-группой кольца *B* кверцитина и π-π-стэккинг с этим же кольцом. Гистидин активного центра рецепторного белка ACE-2 образует водородную связь и π-амидную связь с кольцами апигенина.

Сила связывания полифенолами активных центров вирусных белков вероятно мало зависит от количества связей с аминокислотными радикалами, а в большей степени обусловлена энергией связывания (при ΔG менее -7,0 ккал/моль связывание считается достаточно прочным для ингибирования белка [6].



1 – изорамнетин, 2 – кемпферол, 3 – мирицетин, 4 – кверцетин, 5 – рутин; флаваноны: 6 – эриодиктиол, 7 – гесперидин, 8 – нарингенин, 9 – нарингин; флавоны: 10 – апигенин, 11 – лютеолин; флаван-3-олы: 12 – (-)-эпикатехин галлат, 13 – (-)-эпигаллокатехин галлат, 14 – (+)-катехин; антоцианы: 15 – дельфинидин, 16 – мальвидин, 17 – пеларгонидин, 18 – пеонидин, 19 – петунидин, 20 – цианидин; 21 – ресвератрол (стильбен).

Рисунок 2 – Энергия связывания ФС в сайте спайкового белка вируса SARS-CoV-2: флавонолы

Общая энергия связывания ФС с аминокислотными остатками в сайте спайкового белка варьирует от -8,39 до -4,41 ккал/моль, при этом из 21 изученного полифенола только 5 обладают энергией связывания менее -7,0

ккал/моль (нарингин, нарингенин, кемпферол, гесперидин, (–)-эпигаллокатехин галлат; рисунок 2). ФС оказались менее эффективными лигандами протеазы TMPRSS2B. Энергия связывания в активном сайте этого белка составляет от -6,72 до -3,7 ккал/моль. Для сайта рецептора ACE-2 Δ*G* ФС варьирует от -9,2 до -4,3 ккал/моль.

Среди представителей отдельных классов полифенолов наиболее низкую эффективность показали антоцианы. Согласно Δ*G* для большинства ФС эффективность как лигандов снижается в ряду: ACE-2 > S-гликопротеин > TMPRSS2B. Например для нарингенина значения параметра были соответственно -8,5, -8,35 и -6,27 ккал/моль.

Выводы. Нарингин, нарингенин, кемпферол, гесперидин, (–)-эпигаллокатехин галлат являются эффективными лигандами сайтов спайкового белка SARS-CoV-2 и ангиотензинпревращающего фермента человека (ACE-2) и могут быть использованы в качестве средств, блокирующих проникновение вируса в клетку.

Список литературы

1. Potential Natural Products Against Respiratory Viruses: A Perspective to Develop Anti-COVID-19 Medicines / M. Omrani [et al.] // Front. Physiol. – 2021. – Vol. 11, article 586933. – P. 1–25.

2. J. C. Santos, The Impact of polyphenols-based diet on the inflammatory profile in COVID-19 elderly and obese patients / J. C. Santos, M. L. Ribeiro, A. Gambero // Front. Physiol. – 2021. – Vol. 11, Article ID 616228. – P. 1–12.

3. I. L. Paraiso, Potential use of polyphenols in the battle against COVID-19 / I. L. Paraiso, J. S. Revel, J. F. Stevens // Current opinion in food science. – 2020. – Vol. 32. – P. 149–155.

4. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen [et al.] // J. Comput Chem. – 2004. – Vol. 25, Is. 13. – P. 1605–1612.

5. Potential of Plant Bioactive Compounds as SARS-CoV-2 Main Protease (M^{pro}) and Spike (S) Glycoprotein Inhibitors: A Molecular Docking Study / T. E. Tallei [et al.] // Hindawi Sci. – 2020. – Vol. 2020, Article ID 6307457. – P. 1–18.

6. In silico pharmacokinetic and molecular docking studies of natural flavonoids and synthetic indole chalcones against essential proteins of SARS-CoV-2 / B. G. Vijayakumar [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2020. – Vol. 886, Article ID 173448. – P. 1–11.

МУТАЦИОННОЕ ДАВЛЕНИЕ В ГЕНАХ СЕМЕЙСТВА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

Колесник Дарья Леонидовна
Студентка 2-го курса лечебного факультета УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
dashakolesnik_03@mail.ru
Акуневич Анастасия Александровна
Ассистент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
akunevichna@gmail.com

Определён характер мутационного давления в генах пробелков семейства эпидермального фактора роста (EGF, TGF-α, BTC, HB-EGF, AREG, EREG, EPGN). Для каждого представителя семейства характерно мутационное AT-давление, несмотря на различный GC-состав кодирующих последовательностей и интронов: EGF, BTC, AREG, EREG и EPGN имеют низкую GC-насыщенность, тогда как TGF-α и HB-EGF — высокую. Достоверные отличия в направлениях герминативных замен были обнаружены только в структуре пробелков, а не их активных форм. Таким образом, мутационное AT-давление может влиять на активность исследуемых факторов роста, не изменяя структуру их активных форм напрямую, а посредством накопления мутаций в домене, обуславливающем интенсивность протеолитического процессинга.

Ключевые слова: *семейство эпидермального фактора роста; мутационное давление; герминативные мутации; соматические мутации.*

MUTATIONAL PRESSURE IN THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR FAMILY GENES

Kolesnik Darya Leonidovna
2nd year student of the Faculty of General Medicine, Belarusian State Medical University, Minsk
dashakolesnik_03@mail.ru
Akunevich Anastasia Aleksandrovna
Assistant Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
akunevichna@gmail.com

Mutational pressure in genes of epidermal growth factor family proproteins (EGF, TGF-α, BTC, HB-EGF, AREG, EREG, EPGN) has been determined. Each family member is characterized by mutational AT-pressure, despite different GC-composition of coding sequences and introns: EGF, BTC, AREG, EREG, and EPGN have low GC-content, while TGF-α and HB-EGF have high GC-content. Significant differences in directions of germline substitutions were found only in the proproteins' structure, and not in their active forms. Thus, mutational AT-pressure can affect

activity of studied growth factors without changing the structure of their active forms, but through the accumulation of mutations in domain that determines proteolysis intensity.

Key words: *epidermal growth factor family; mutational pressure; germline mutations; somatic mutations.*

Аберрантная активация рецептора эпидермального фактора роста EGFR (от англ. epidermal growth factor receptor) нативными лигандами способствует развитию различных злокачественных новообразований эпителиального генеза. Лигандами EGFR являются: эпидермальный фактор роста EGF (от англ. epidermal growth factor), трансформирующий фактор роста альфа TGF-α (от англ. transforming growth factor alpha), бетацеллюлин BTC (от англ. betacellulin), гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста HB-EGF (от англ. heparin-binding epidermal growth factor), амфирегулин AREG (от англ. amphiregulin), эпирегулин EREG (от англ. epiregulin), эпиген EPGN (от англ. epigen). Каждый из лигандов EGFR синтезируется в виде интегрального мембранного белка, который высвобождается с клеточной поверхности посредством регулируемого протеолиза. Они делятся на две группы по свой аффинности: лигандами с высокой аффинностью являются EGF, TGF-α, BTC и HB-EGF, тогда как AREG, EREG и EPGN обладают низкой аффинностью [1].

Многие из данных пробелков имеют низкий уровень экспрессии в большинстве нормальных тканей, однако их повышенный уровень при различных видах опухолей активирует сигнальные пути EGFR и способствует прогрессированию опухоли. Например, при плоскоклеточном раке головы и шеи количество в высокой степени экспрессируемых лигандов EGFR коррелирует с пятилетней выживаемостью пациентов: пятилетняя смертность увеличивается с 26% (опухолевые клетки не экспрессируют ни одного лиганда EGFR) до 45% (опухолевые клетки экспрессируют одновременно 3–4 лиганда EGFR), при этом многофакторный анализ определил AREG в качестве основного предиктора [2].

Цель работы — определить характер мутационного давления в генах человеческих пробелков семейства эпидермального фактора роста.

Материалы и методы. Для анализа использовались кодирующие последовательности CDS (от англ. coding DNA sequence) человеческих пробелков семейства эпидермального фактора роста из базы данных Ensembl: EGF (ENST00000265171), TGF-α (ENST00000295400), BTC (ENST00000395743), HB-EGF (ENST00000230990), AREG (ENST00000395748), EREG (ENST00000244869), EPGN (ENST00000413830). GC-насыщенность и частоты использования нуклеотидов были рассчитаны с помощью алгоритма VVK Protective buffer (chemres.bsmu.by). Для анализа герминативных мутаций в CDS пробелков использовались данные о вариабельности генов, размещённые в базе Ensembl. В таблице 1 приведены данные о количестве описанных герминативных

мутаций, а также мутаций в интронах анализируемых пробелков по состоянию на сентябрь 2022 года. Проведён статистический анализ частот возникновения нуклеотидных замен, наблюдаемых при герминативном мутагенезе в CDS изучаемых пробелков. Доля каждого из типов нуклеотидных замен рассчитывалась как отношение между количеством сайтов с мутациями, фактически наблюдаемыми в клетках (согласно базе Ensembl), и общим количеством сайтов CDS пробелков, в которых конкретный тип мутации может произойти. Доли различного типа мутаций сравнивались между собой с помощью t-теста для относительных величин.

Таблица 1 — Количество описанных герминативных мутаций, а также мутаций в интронах изучаемых пробелков по состоянию на сентябрь 2022 года

Ген пробелка	Количество мутаций			
	герминативных			в интронах
	синонимичных	несинонимичных	нонсенс	
EGF	352	828	35	19 564
TGF-α	59	128	5	23 352
BTC	48	158	1	11 743
HB-EGF	70	129	3	2 548
AREG	63	163	5	1 721
EREG	69	149	6	4 825
EPGN	45	106	5	1 221

Результаты и их обсуждение. Показатели GC-насыщенности CDS и интронов изучаемых пробелков приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Показатели GC-насыщенности CDS и интронов пробелков семейства эпидермального фактора роста

Ген пробелка	CDS				Интроны
	GC	3GC	GC4f	GC2f3p	GC
EGF	0,465	0,422	0,380	0,410	0,124
TGF-α	0,600	0,714	0,682	0,742	0,329
BTC	0,490	0,497	0,543	0,449	0,342
HB-EGF	0,549	0,632	0,643	0,595	0,537
AREG	0,436	0,379	0,429	0,336	0,361
EREG	0,459	0,476	0,479	0,440	0,342
EPGN	0,413	0,361	0,227	0,470	0,336

Низкие значения GC- и 3GC-насыщенности (менее 50%) характерны для CDS пробелков EGF, BTC, AREG, EREG и EPGN, а также для интронов генов данных пробелков, что может быть следствием длительного мутационного AT-давления, действовавшего в этих генах у приматов. Поскольку в CDS пробелков EGF и EPGN GC2f3p-насыщенность превышает GC4f-насыщенность, ведущим

механизмом AT-давления в данных последовательностях следует считать трансверсии GC на AT. Напротив, в CDS пробелков BTC, AREG и EREG GC4f-насыщенность превышает GC2f3p-насыщенность, следовательно, транзиции GC на AT являются ведущим механизмом AT-давления в данных генах [3].

Таблица 3 — Частоты герминативных нуклеотидных замен в CDS пробелков семейства эпидермального фактора роста, для которых были получены достоверные отличия (P<0,05)

Пробелок	Нуклеотидная замена	Частота	Нуклеотидная замена	Частота
EGF	C>T (син.)	0,2652	T>C (син.)	0,1942
	C>G (син.)	0,1188	G>C (син.)	0,0297
	C>T (несин.)	0,2677	T>C (несин.)	0,1636
	G>A (несин.)	0,2577	A>G (несин.)	0,2043
	C>A (несин.)	0,0836	A>C (несин.)	0,0454
	G>T (несин.)	0,0786	T>G (несин.)	0,0315
	T>A (несин.)	0,0501	A>T (несин.)	0,0274
TGF-α	C>T (несин.)	0,4412	T>C (несин.)	0,0769
	G>A (несин.)	0,2717	A>G (несин.)	0,1045
	A>T (несин.)	0,1290	T>A (несин.)	0,0230
	C>T (несин.)	0,4412	C>T (син.)	0,1857
BTC	G>A (син.)	0,6571	A>G (син.)	0,1250
	C>T (несин.)	0,5862	T>C (несин.)	0,2949
	C>A (несин.)	0,1558	A>C (несин.)	0,0420
	C>G (несин.)	0,1538	G>C (несин.)	0,0407
	C>T (несин.)	0,5862	C>T (син.)	0,0678
	C>G (несин.)	0,1538	C>G (син.)	0,0400
	T>C (несин.)	0,2949	T>C (син.)	0,1176
HB-EGF	G>A (несин.)	0,2137	A>G (несин.)	0,0696
	C>A (несин.)	0,0748	A>C (несин.)	0,0160
	A>G (син.)	0,2564	A>G (несин.)	0,0696
AREG	C>T (син.)	0,3725	T>C (син.)	0,0649
	C>T (несин.)	0,2558	T>C (несин.)	0,1064
EREG	C>T (несин.)	0,3077	T>C (несин.)	0,1176
	G>A (несин.)	0,3626	A>G (несин.)	0,2268
	C>A (несин.)	0,1507	A>C (несин.)	0,0370
	A>G (син.)	0,4359	A>G (несин.)	0,2268
EPGN	C>A (несин.)	0,1642	A>C (несин.)	0,0385

Для CDS пробелков TGF-α и HB-EGF, а также для интронов генов данных пробелков, напротив, характерны более высокие значения GC- и 3GC-насыщенности (более 50%), что может быть следствием длительного мутационного GC-давления. В CDS пробелка TGF-α GC2f3p-насыщенность превышает GC4f-насыщенность, следовательно, транзиции AT на GC являются ведущим механизмом GC-давления в данной последовательности. В CDS

пробелка HB-EGF ведущим механизмом GC-давления являются трансверсии GC на AT, поскольку GC4f-насыщенность превышает GC2f3p-насыщенность [3].

Сходство в показателях GC-насыщенности EGF, BTC, AREG, EREG и EPGN может также объясняться тем, что данные гены образуют кластер, расположенный в четвёртой хромосоме, тогда как TGF-α и HB-EGF расположены во второй и пятой хромосомах, соответственно.

В таблице 3 приведены частоты герминативных нуклеотидных замен различного типа, для которых были получены достоверные отличия ($P<0,05$) или в направлении возникновения, или в их характере.

Как видно из таблицы 3, в CDS всех изучаемых пробелков семейства эпидермального фактора роста замены в направлении GC на AT происходят достоверно чаще, чем замены в обратном направлении. Это характерно и для CDS пробелков TGF-α и HB-EGF, в которых ранее предполагалось наличие GC-давления исходя из значений их GC- и 3GC-насыщенности. Следовательно, несмотря на отличие в значениях GC-состава и расположении последовательностей в разных частях генома, все изучаемые пробелки семейства эпидермального фактора роста находятся под влиянием мутационного AT-давления. Однако при анализе последовательностей активных форм данных пробелков достоверных отличий в направлении нуклеотидных замен не было обнаружено, поскольку их количество было недостаточным.

Ряд несинонимичных замен происходит достоверно чаще синонимичных в пробелках TGF-α и BTC. Подобный характер возникновения нуклеотидных замен может свидетельствовать о направленном положительном отборе, способствующем выживанию особей с мутантной формой пробелка [3].

Большая часть аминокислотной последовательности пробелков исследуемых факторов роста отрезается в ходе регулируемого протеолиза, а физиологическую функцию выполняют их активные формы с EGF-подобным доменом, придающим данным лигандам характерную пространственную конформацию. Важную функцию в этом процессе выполняет пронизывающий мембрану домен, так как он может определять локализацию пробелков семейства факторов роста и их протеолитический процессинг и таким образом регулировать их активность [4]. Таким образом, мутационное AT-давление и направленный положительный отбор могут влиять на активность исследуемых факторов роста не изменяя структуру их активных форм напрямую, а посредством накопления мутаций в домене, обуславливающем интенсивность протеолитического процессинга.

Выводы. Для кодирующих последовательностей пробелков EGF, BTC, AREG, EREG и EPGN, а также их интронов характерна низкая GC-насыщенность (менее 50%), тогда как для кодирующих последовательностей пробелков TGF-α и HB-EGF она повышена (более 50%). Однако анализ герминативных мутаций показал, что несмотря на отличие в значениях GC-состава, все изучаемые

пробелки семейства эпидермального фактора роста находятся под влиянием мутационного АТ-давления, которое может влиять на активность факторов роста посредством накопления мутаций в домене, пронизывающем мембрану и обуславливающем интенсивность их протеолитического процессинга.

Список литературы

1. Roskoski, R. Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer / R. Jr. Roskoski // Pharmacological Research. – 2014. – Vol. 78. – P. 34–74.

2. Epidermal growth factor (EGF) receptor-ligand based molecular staging predicts prognosis in head and neck squamous cell carcinoma partly due to deregulated EGF-induced amphiregulin expression / J. Gao [et al.] // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2016. – Vol. 35. – P. 1–12.

3. Хрусталёв, В. В. Биохимические механизмы мутационного давления в методологии вычислительной биологии / В. В. Хрусталёв; под ред. Е. В. Барковского. – Минск: БГМУ, 2010. – 213 с.

4. Dong, J. Trafficking and Proteolytic Release of Epidermal Growth Factor Receptor Ligands Are Modulated by Their Membrane-anchoring Domains / J. Dong, H. S. Wiley // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275(1). – P. 557–564.

ЭНТАЛЬПИИ СГОРАНИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ 4′-ЦИКЛОГЕКСИЛАЦЕТОФЕНОНА В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

Контява Ольга Викторовна
к.х.н., доцент кафедры общей химии, Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск
voi-olga@mail.ru
Блохин Андрей Викторович
д.х.н., профессор, заведующий кафедрой физической химии, Белорусский государственный университет, г. Минск
blokhin@bsu.by
Черепенников Михаил Борисович
к.х.н., проректор по экономике и материально-техническому развитию, Белорусский государственный университет, г. Минск
charapennikau@bsu.by

Методом бомбовой калориметрии сгорания определена энергия сгорания 4′-циклогексилацетофенона. На основании полученных данных рассчитаны стандартные энтальпии сгорания и образования 4′-циклогексилацетофенона в кристаллическом состоянии.

Ключевые слова. *4′-циклогексилацетофенона; стандартная энтальпия образования; стандартная энтальпия сгорания.*

COMBUSTION ENTHALPY AND FORMATION ENTHALPY OF 4′-CYCLOHEXYLACETOPHENONE IN THE CRYSTAL STATE

Kantsiava Volha Viktorovna
C.Ch.Sc., associate professor, Belarusian State Medical University, Minsk
voi-olga@mail.ru
Blokhin Andrey Viktorovich
Dr.Ch.Sc., head of the department of physical chemistry, Belarusian State University, Minsk
blokhin@bsu.by
Charapennikau Mikhail Borisovich
C.Ch.Sc., vice-rector for economics and material-technical development, Belarusian State University, Minsk
charapennikau@bsu.by

The combustion energy of 4′-cyclohexylacetophenone was determined in a bomb combustion calorimeter. Based on the obtained data, the standard enthalpy of combustion and the standard enthalpy of formation of 4′-cyclohexylacetophenone in the crystalline state were calculated.

Keywords: *4′-cyclohexylacetophenone; the standard enthalpies of combustion; the standard enthalpies formation.*

Введение

Кислородсодержащие соединения (простые и сложные эфиры, альдегиды, кетоны, спирты) являются важными и многотоннажными продуктами органического синтеза. На их основе производят оксигенаты, пластифицирующие композиции, полимеры, различные лекарственные препараты и другие продукты. Усложнение структур соединений происходит с развитием технологий, задействованных в производстве, что требует создания для них надежной физико-химической и термодинамической базы данных.

Производные циклогексанонов играют значительную роль в современной промышленности, науке и технике. При таком широком спектре полезных свойств производные полизамещенных фенолов практически не изучены. На сегодняшний день отсутствуют опубликованные источники, содержащие информацию о физико-химических свойствах изучаемого вещества.

Материалы и методы исследования

Образец 4′-циклогексилацетофенона синтезирован ацелированием циклогексилбензола уксусным ангидридом в среде нитробензола с использованием в качестве катализатора хлорида алюминия (Рисунок 1). Очистка полученного продукта выполнена многократной перекристаллизацией из этилового спирта. Подготовленный образец имел чистоту более 99,8 % масс. по данным ГЖХ.

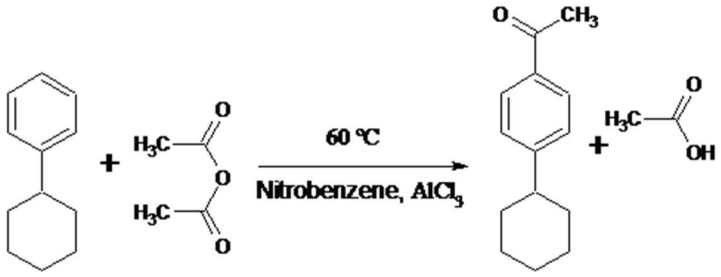


Рисунок 1 – Схема синтеза 4′-циклогексилацетофенона

Перед измерениями образец 4′-циклогексилацетофенона выдерживали над P_2O_5 при T = 290 K в течение> 72 часов.

Энергия сгорания 4′-циклогексилацетофенона в кристаллическом состоянии определена в серии из 4 опытов в калориметре сгорания с изотермической воздушной оболочкой и стационарной самоуплотняющейся бомбой [1]. Объем калориметрической бомбы составлял 326 см^3, объем калориметрического сосуда – 2 л. Температуры оболочки и воды в калориметрическом сосуде измерялись платиновыми термометрами сопротивления (R_0 = 500 Ом). Точность поддержания температур составляла ± 0,02 К. Разрешающая способность при измерении подъема температуры воды в калориметрическом сосуде была не хуже 10^{-4} К [2].

Навеска порошка 4′-циклогексилацетофенона сжигалась в герметично запаянном пакете из полимерного материала, помещенном на платиновую

запальную проволоку диаметром (d = 0,05 мм). Формула полиэтиленового пакета принята $(CH_2)_n$. Энергия сгорания полиэтилена определена в 8 опытах по сжиганию и составила – (46337,6 ± 9,6) Дж·К $^{-1}$. При сжигании образцов в пакете для поджига на платиновую проволоку подвешивалась хлопковая нить. Энергия сгорания хлопковой нити составила – (16945,2 ± 8,4) Дж·К $^{-1}$. Операции по подготовке образца к сжиганию проводились на воздухе. Перед началом опыта в калориметрическую бомбу добавлялся 1 см^3 дистиллированной воды для насыщения системы водяным паром. Сжигание образца проводилось в атмосфере кислорода (~ 3,04 МПа). Точное давление кислорода определялось по разности масс пустой и заполненной калориметрической бомбы. Для введения поправки на теплоту окисления азота, являющегося примесным газом в кислороде, конденсат, образовавшийся в бомбе, количественно переносился в химический стакан и оттитровывался 0,1 н раствором гидроксида натрия [3].

После окончательной сборки калориметра вся система выдерживалась в течение 40 минут для выхода на рабочий режим. Все последующие операции по проведению опыта выполнялись в автоматическом режиме. Начальный и конечный периоды составляли в первых двух опытах 120 отсчетов, главный – 230 отсчетов (интервал между отсчетами 5 с), в опытах начальный и конечный периоды – 20 отсчетов, главный период – 25 отсчетов (интервал между отсчетами 30 с). Данные единичного опыта и все параметры настройки прибора сохранялись в энергонезависимой памяти калориметра.

Исправленный подъем температуры рассчитывался по методу Реньо-Пфаундлера [4]. Поправки Уошберна определялись по методике, описанной в [5].

На основании самой последней оценки атомных масс [6] молярная масса 4'-циклогексилацетофенона находится в диапазоне (202,2746 – 202,3082) г·моль$^{-1}$. За молярную массу 4'-циклогексилацетофенона принято среднее значение, равное 202,2914 г·моль$^{-1}$.

Энтальпия образования вычислена на основании стандартных молярных энтальпий образования газообразного оксида углерода (IV) $\Delta_f H^o_m$ (298,15 К, г) = = – (393,51 ± 0,13) кДж·моль$^{-1}$ и жидкой воды $\Delta_f H^o_m$ (298,15 К, ж) = – (285,830 ± ± 0,040) кДж·моль$^{-1}$ [7].

Энергетический эквивалент калориметра составил $\varepsilon_{калор}$ = (14609,1 ± 4,8) Дж·К$^{-1}$ по результатам 11 опытов сгорания бензойной кислоты класса К-2 (с чистотой 99,993 %). Погрешность определений энтальпий сгорания оценена в ± 0,05 %. В продуктах сгорания контролировалось содержание сажи, количество которой определялось как масса сухого остатка в тигле после сжигания.

Результаты и их обсуждение

Результаты 4 опытов по определению стандартной энергии сгорания кристаллического 4'-циклогексилацетофенона при 298,15 К представлены в таблице 1.

Таблица 1– Результаты определения стандартной молярной энергии сгорания 4'-циклогексилацетофенона при T = 298,15 К

Параметры	1	2	3	4
m_{comp}, г	0,25669	0,23821	0,26470	0,25306
m_{fuse}, г	0,00437	0,00484	0,00481	0,00498
m_{film}, г	0,06034	0,06627	0,05761	0,06468
m_{soot}, г	0	0	0	0
$p(O_2)$, МПа	3,10	3,10	3,10	3,10
T_i, К	298,11810	298,54698	298,06409	298,41843
T_f, К	299,06647	299,42386	299,00874	299,33839
ΔT_{corr}, К	0,86340	0,83340	0,87361	0,86806
ε_i, Дж·К$^{-1}$	14,00	13,99	14,00	14,00
ε_f, Дж·К$^{-1}$	14,88	14,84	14,89	14,89
$\Delta_{ign}U$, Дж	0,10	0,89	0,68	0,59
$\varepsilon_{calor}\cdot(-\Delta T_{corr})$, Дж	–12613,47	–12175,14	–12762,61	–12681,5
$\varepsilon_{cont}\cdot(-\Delta T_{corr})$, Дж	–12,82	–12,7	–12,93	–13,16
$\Delta_{IBP}U$, Дж	–12626,19	–12198,35	–12797,31	–12700,76
$m_{soot}\cdot\Delta_c U_{soot}$, Дж	0	0,00034	0,00067	0,00020
$\Delta U(HNO_3)$, Дж	1,79	3,58	2,39	3,58
$\Delta_{st.state}U$, Дж	5,20	4,94	5,32	5,20
$\Delta_c u^o$, Дж·г$^{-1}$	–37980,3	–37938,1	–37925,6	–37975,8
$\Delta_c U_m^o$, кДж·моль$^{-1}$	–7683,09	–7674,55	–7672,02	–7682,18

m_{comp}, m_{fuse}, m_{film} – массы навески исследуемого вещества, хлопковой нити и полиэтиленового пакета, адаптированные к условиям вакуума (плотность вещества ρ = 0,8205 г·см$^{-3}$, хлопковая нить ρ = 1,56 г·см$^{-3}$, полиэтилен ρ = 0,90 г· см$^{-3}$ (согласно заявлению производителя); m_{soot} – масса сажи, образовавшейся в опыте; $p(O_2)$ — давление кислорода в бомбе; T_i и T_f – начальная и конечная температуры в период реакции; ΔT_{corr} — скорректированное повышение температуры; ε_i и ε_f – энергетический эквивалент содержимого бомбы в начальном и конечном состояниях соответственно; $\Delta_{ign}U$ – электрическая энергия поджига образца; ε_{calor} – энергетический эквивалент калориметра (ε_{calor} = (14609,1 ± 4,8) Дж·К$^{-1}$; $\varepsilon_{cont}\cdot(\Delta T_{corr}) = \varepsilon_i\cdot(T_i - 298.15) + \varepsilon_f\,(298.15 - T_i - \Delta T_{corr})$; $\Delta_c U_{саж}$ – средняя энергия сгорания сажи (– 33 кДж · г-^{1}); $\Delta_{IBP}U$ – изменение внутренней энергии для изотермического процесса; $\Delta U(_{HNO3})$ – энергия, необходимая для разложения образовавшегося раствора HNO_3; $\Delta_{st.state}U$ — энергетическая поправка к стандартному состоянию (сумма поправок Уошборна)

Среднее значение стандартной молярной энергии сгорания вещества оказалось равным

$$\Delta_c U^\circ_m(298.15\ \text{K}) = -(7677{,}96 \pm 5{,}51)\ \text{кДж·моль}^{-1},$$

а его стандартная молярная энтальпия сгорания составила

$$\Delta_c H^\circ_m(298.15\ \text{K}) = -(7687{,}87 \pm 5{,}51)\ \text{кДж·моль}^{-1}.$$

На основании этой величины в соответствии с реакцией горения

$$C_{14}H_{18}O_{(тв)} + 18O_{2(г)} = 14CO_{2(г)} + 9H_2O_{(ж)}$$

вычислена стандартная молярная энтальпия образования кристаллического 4'-циклогексилацетофенона:

$$\Delta_f H^\circ_m(298{,}15\ \text{K}) = -(393{,}74 \pm 5{,}53)\ \text{кДж·моль}^{-1}.$$

Список литературы

1. Thermodynamic properties of 1-aminoadamantane / A.B. Bazyleva [et al.] // J. Chem. Thermod. – 2008. – Vol. 40. – P. 509–522.

2. Войткевич, О. В. Термодинамические свойства основных компонентов биомассы растительных культур: дис. канд. хим. наук : 02.00.04 / О. В. Войткевич. – Минск, 2014. – 153 с.

3. Блохин, А.В. Термодинамические свойства L-ментола в кристаллическом и газообразном состояниях / А.В. Блохин, Я.Н. Юркштович // Тонкие химические технологии. – 2020. Т.15, № 1. – С. 28 – 36.

4. J. Coops, Calibration of calorimeters for reactions in a bomb at constant volume: in Experimental thermochemistry. Measurement of heats of reaction / J. Coops, R.S. Jessup, K. Van Nes; ed. F.D. Rossini. – New York: Interscien., 1954. – P. 27–58.

5. G. Hubbard, Standard states and corrections for combustions in a bomb at constant volume: in Experimental thermochemistry. Measurement of heats of reaction / G. Hubbard, W.N. Scott, D.W. Waddington; ed. F.D. Rossini. – New York: Interscien., 1956. – P. 75–128.

6. M.E. Wieser, Atomic weights of the elements 2007 (IUPAC Technical Report) // M.E. Wieser, M. Berglund // Pure and Applied Chemistry. – 2009. – Vol. 81, № 11. – P. 2131–2156.

7. M.W. Chase, NIST-JANAF Thermochemical Tables / M.W. Chase. – 4th ed. – Gaithersburg, Maryland: National Institute of Standards and Technology, 1998. – 1961 p.

ТЕПЛОЕМКОСТЬ И ПАРАМЕТРЫ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ 4′-ЦИКЛОГЕКСИЛАЦЕТОФЕНОНА В КОНДЕНСИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ

Контява Ольга Викторовна
к.х.н., доцент кафедры общей химии, Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск
voi-olga@mail.ru
Блохин Андрей Викторович
д.х.н., профессор, заведующий кафедрой физической химии, Белорусский государственный университет, г. Минск
blokhin@bsu.by
Черепенников Михаил Борисович
к.х.н., проректор по экономике и материально-техническому развитию, Белорусский государственный университет, г. Минск
charapennikau@bsu.by

Методом низкотемпературной адиабатической калориметрии определены молярные теплоемкости 4′-циклогексилацетофенона в интервале (80–370) К. На кривой температурной зависимости теплоемкости обнаружены две аномальные области, обусловленные твердофазным переходом λ-типа (кр II → кр I) в интервале (163 – 179 К) и плавлением соединения (кр I → ж) в интервале (313 – 341) К. Найдены термодинамические параметры фазовых переходов и рассчитаны стандартные термодинамические функции (энтропия, приведенные энтальпии и энергии Гиббса) вещества в диапазоне от 80 К до 370 К.

Ключевые слова. *4′-циклогексилацетофенона; термодинамические свойства; теплоемкость; фазовые переходы; энтропия.*

HEAT CAPACITY AND PHASE TRANSITION PARAMETERS FOR 4′-CYCLOHEXYLACETOPHENONE IN THE CONDENCED STATE

Kantsiava Volha Viktorovna
C.Ch.Sc., associate professor, Belarusian State Medical University, Minsk
voi-olga@mail.ru
Blokhin Andrey Viktorovich
Dr.Ch.Sc., head of the department of physical chemistry, Belarusian State University, Minsk
blokhin@bsu.by
Charapennikau Mikhail Borisovich
C.Ch.Sc., vice-rector for economics and material-technical development, Belarusian State University, Minsk
charapennikau@bsu.by

The molar heat capacity of 4′-cyclohexylacetophenone in the temperature range (80–370) K was obtained by low-temperature adiabatic calorimetry. Two anomalous regions due to the solid–phase transition of the λ type (cr II → cr I) in the range of (163 – 179 K) and fusion of the compound (cr I → liq) in the interval (313 – 341) K were found on the temperature dependence curve of the heat capacity. The thermodynamic parameters of phase transitions and the standard thermodynamic functions (entropies, reduced enthalpies and Gibbs energies) of the compound in the range from 80 K to 370 K were calculated.

Keywords. *4′-cyclohexylacetophenone; thermodynamic properties; heat capacity; phase transitions; entropy.*

Введение

4'-циклогексилацетофенон – это соединение с плоской структурной основой и углеводородными заместителями в пара-положении ароматического кольца. Структурные особенности рассматриваемого вещества позволяют использовать его в качестве эффективных моделей для изучения влияния молекулярной структуры на термодинамические свойства соединений.

Материалы и методы исследования

Образец 4'-циклогексилацетофенон синтезирован ацелированием циклогексилбензола уксусным ангидридом в среде нитробензола с использованием в качестве катализатора хлорида алюминия. Очистка полученного продукта выполнена многократной перекристаллизацией из этилового спирта. Подготовленный образец имел чистоту более 99,8 % масс. по данным ГЖХ.

Перед измерениями образцы выдерживали над P_2O_5 при T = 290 K в течение> 72 часов.

Измерение теплоемкостей кристаллического 4'-циклогексилацетофенона в интервале температур (80 – 370) К выполнено в автоматизированном вакуумном адиабатическом калориметре ТАУ-10 (ЗАО «Термис», г. Москва, Россия), описанном ранее [1] в ходе 7 независимых серий. Температура измерялась железо-родиевым термометром сопротивления (R = 50 Ом), размещенным на внутренней поверхности адиабатического экрана. Адиабатические условия в калориметре поддерживались с помощью дифференциальной термопары (медь + 0,1% железо)/хромель и двух нагревателей: основного и дополнительного для устранения градиентов температур по длине адиабатической оболочки. Управление нагревателями и определение видимой энергии, измерение температуры и расчет теплоемкостей в калориметрическом опыте осуществлялись с помощью автоматического блока управления АК–6.25.

Образец вещества помещался на воздухе в контейнер объемом ~1,0 см^3 на 4/5 его объема. После загрузки образца проводилась дегазация контейнера с образцом в вакууме в течение 30 минут. Для обеспечения быстрого установления

теплового равновесия при проведении калориметрических измерений после дегазации контейнер заполнялся гелием при давлении 10 кПа, после чего он герметично закрывался бронзовой крышкой. В качестве уплотнителя использовалось индиевое кольцо. Взвешивание контейнера с образцом проводилось на весах Mettler-Toledo AG245 с максимальной погрешностью $\pm 5\times10^{-5}$ г. Герметичность контейнера контролировалась путем нескольких циклов выдерживания контейнера на воздухе и в вакууме до постоянной массы. В температурном интервале (80 – 370) К в качестве хладагента использовался жидкий азот.

Погрешность измерения теплоемкости в адиабатическом калориметре не превышает ± 0,4 % в интервале (80 – 370) К [1].

Результаты и их обсуждение

Температурная зависимость теплоемкости 4'-циклогексилацетофенона в конденсированном состоянии в диапазоне (80 – 370 К) при давлении насыщенного пара представлена на Рисунке 1 (на примере одной серии). На кривой температурной зависимости теплоемкости обнаружены две аномальные области, обусловленные твердофазным переходом λ-типа (кр II → кр I) в интервале (163 – 179 К) и плавлением вещества (кр I → ж) в интервале (313 – 341) К. На основании самой последней оценки атомных масс [2] молярная масса 4'-циклогексилацетофенона находится в диапазоне (202,2746 – 202,3082) г моль$^{-1}$. За молярную массу 4'-циклогексилацетофенона принято среднее значение, равное 202,2914 г моль$^{-1}$. Температура тройной точки вещества $T_{пл}$ = (341,01 ± 0,02) К и чистота образца x = (99,58 ± 0,02) % мол. определены методом фракционного плавления (Рисунок 2).

Энтальпия плавления 4′-циклогексилацетофенона найдена как среднее значение по результатам четырех серий по измерению теплоемкости. Расчет молярной энтальпии плавления проводили по уравнению (1):

$$\Delta_{пл}H^{\circ}_{m} = Q - Q_1 - Q_2 = Q - \int_{T_{нач}}^{T_{пл}} C_{p,m}(\text{кр I})\,dT - \int_{T_{пл}}^{T_{кон}} C_{p,m}(\text{ж})\,dT\,, \qquad (1)$$

где Q — энергия, необходимая для нагревания 1 моля вещества от $T_{нач}$ до $T_{кон}$; Q_1 – энергия, необходимая для нагревания 1 моля кристаллического вещества (кр I) от начальной температуры $T_{нач}$ до температуры плавления $T_{пл}$; Q_2 – энергия, необходимая для нагревания 1 моля жидкого вещества от температуры плавления $T_{пл}$ до конечной температуры $T_{кон}$; $C_{p,m}$(кр I) и $C_{p,m}$(ж) — регулярные составляющие молярных теплоемкостей кристаллической (кр I) и жидкой (ж) фаз соответственно.

Регулярные составляющие молярных теплоемкостей кр I и жидкости описаны уравнениями:

$$C_{p,m}(\text{кр I}) / \text{Дж}\cdot\text{К}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1} = 174{,}9 - 0{,}1829(T / \text{К}) + 1{,}779\cdot10^{-3}\,(T / \text{К})^2, \qquad (2)$$

$$C_{p,m}(\text{ж}) / \text{Дж}\cdot\text{К}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1} = -60{,}90 + 1{,}779(T / \text{К}) - 1{,}543\cdot10^{-3}(T / \text{К})^2. \qquad (3)$$

Полученными методом наименьших квадратов из экспериментальных значений теплоемкости в интервалах (236 – 313) К и (342 –369) К соответственно.

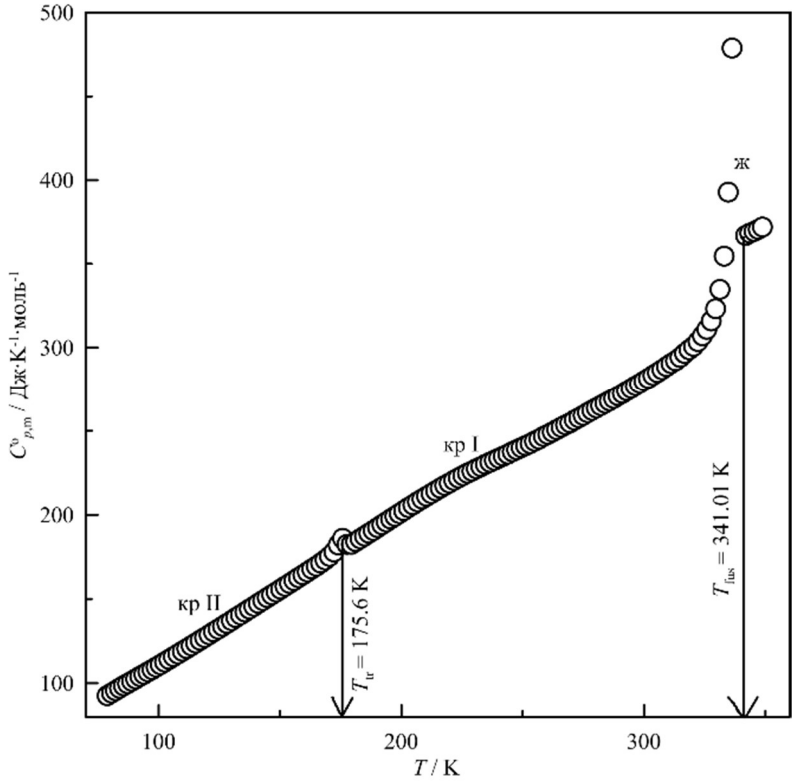


Рисунок 1 – Температурная зависимость молярной теплоемкости 4'-циклогексилацетофенона (серия 4)

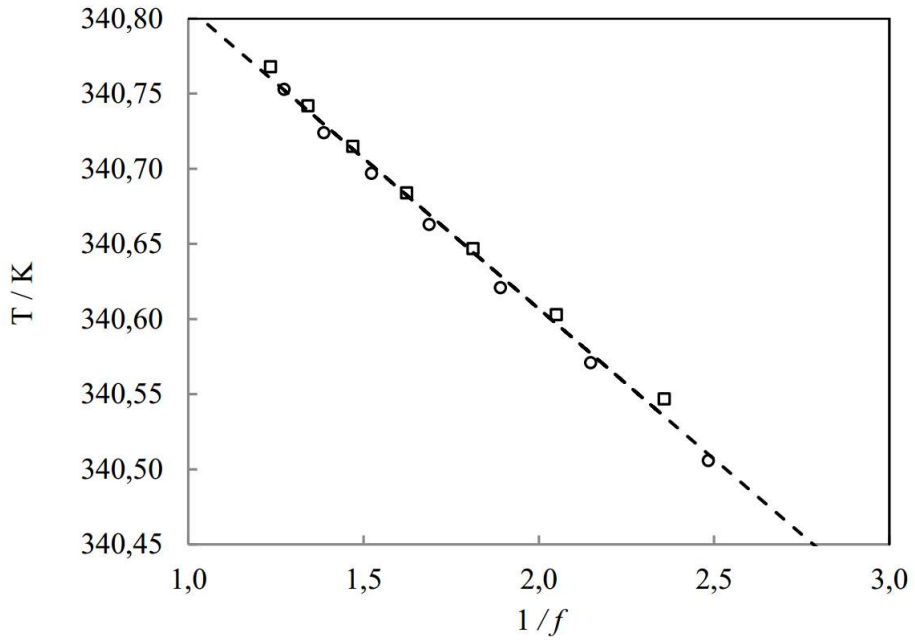


Рисунок 2 – Результаты фракционного плавления 4'-циклогексилацетофенона: ○, серия 3; □, серия 4.

Энтальпия и энтропия плавления 4′-циклогексилацетофенона равны:

$\Delta_{пл}H = (20759 \pm 18)$ Дж·моль$^{-1}$,

$\Delta_{пл}S = (60{,}88 \pm 0{,}06)$ Дж·моль$^{-1}$·К$^{-1}$.

Температура твердофазного перехода $T_{ф.п.}$(кр II – кр I) = (175,6 ± 0,5) К определена в специальной серии измерений теплоемкости с температурным шагом ~ 0,5 К как соответствующая максимуму на кривой теплоемкости в области фазового превращения. Найденное значение хорошо согласуется с температурами, соответствующими максимальной теплоемкости вещества в диапазоне (163 – 179) К в трех других сериях измерений: 176,2 К в серии 2, 175,8 К в серии 4 и 174,7 К в серии 6.

Таблица 1 – Термодинамические функции 4′-циклогексилацетофенон в конденсированном состоянии

$\frac{T}{\text{К}}$	$\frac{C^{\circ}_{p,m}}{\text{Дж}\cdot\text{К}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1}}$	$\frac{\Delta^{T}_{80}H^{\circ}_{m}/T}{\text{Дж}\cdot\text{К}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1}}$	$\frac{\Delta^{T}_{80}S^{\circ}_{m}}{\text{Дж}\cdot\text{К}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1}}$	$\frac{-(G^{\circ}_{m}(T)-H^{\circ}_{m}(80))/T}{\text{Дж}\cdot\text{К}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1}}$
кристалл II				
80	93,65 ± 0,39	0	0	0
100	110,4 ± 0,5	20,41 ± 0,09	22,70 ± 0,10	2,293 ± 0,128
150	155,6 ± 0,7	57,86 ± 0,24	75,92 ± 0,32	18,05 ± 0,40
175,6	179,1± 0,8	73,83 ± 0,31	102,2 ± 0,4	28,41 ± 0,53
кристалл I				
175,6	179,1± 0,8	74,00 ± 0,37	102,4 ± 0,4	28,41 ± 0,57
200	201,5 ± 0,8	88,18 ± 0,42	127,1 ± 0,5	38,95 ± 0,68
250	240,3 ± 1,0	115,0 ± 0,5	176,6 ± 0,7	61,57 ± 0,91
298,15	278,6 ± 1,2	138,2 ± 0,6	222,1 ± 0,9	83,83 ± 1,12
300	280,2 ± 1,2	139,1 ± 0,6	223,8 ± 0,9	84,69 ± 1,12
341,01	319,5 ± 1,3	158,4 ± 0,7	262,1 ± 1,1	103,7 ± 1,3
жидкость				
341,01	366,3 ± 1,5	219,2 ± 0,9	322,8 ± 1,4	103,6 ± 1,7
350	372,8 ± 1,6	223,0 ± 1,0	332,4 ± 1,4	109,4 ± 1,7
360	379,6 ± 1,6	227,3 ± 1,0	343,0 ± 1,4	115,7 ± 1,7
370	386,1 ± 1,6	231,5 ± 1,0	353,5 ± 1,5	122,0 ± 1,8

Расчет молярной энтальпии твердофазного перехода кр II – кр I выполнен по уравнению (4):

$$\Delta_{ф.п.}H^{o}_{m} = Q - Q_{3} = Q - \int_{T_{нач}}^{T_{кон}} C_{p,m}(\text{кр})dT \quad , \qquad (4)$$

где Q — теплота, необходимая для нагревания 1 моля вещества от $T_{нач}$ до $T_{кон}$; Q_3 – энергия, необходимая для нагревания 1 моля кристаллического вещества от начальной $T_{нач}$ до конечной температуры $T_{кон}$; $C_{p,m}$(кр) – регулярные составляющие молярной теплоемкости кристаллических фаз.

Принято, что регулярные составляющие теплоемкостей кристаллов (кр II и кр I) в области фазового перехода описываются единым уравнением

$$C_{p,\mathrm{m}}(\text{кр}) / \text{Дж}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1} = 104{,}9 - 1{,}368(T / \text{K}) + 2{,}228\cdot10^{-2}(T / \text{K})^2 - 9{,}539\cdot10^{-5}(T / \text{K})^3 + 1{,}514\cdot10^{-7}(T / \text{K})^4. \quad (5)$$

Полученным методом наименьших квадратов из экспериментальных значений теплоемкости в интервалах (150 – 163) К и (179 – 195) К.

Энтальпия и энтропия твердофазного перехода вещества равны:

$$\Delta_{\text{ф.п.}}H = (29{,}8 \pm 0{,}2)\ \text{Дж}\cdot\text{моль}^{-1},$$

$$\Delta_{\text{ф.п.}}S = (0{,}17 \pm 0{,}01)\ \text{Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}.$$

Для получения сглаженных значений теплоемкости вещества весь исследованный температурный диапазон разбивался на отдельные интервалы с областями перекрывания, составлявшими 15 – 20 % от величины наибольшего температурного интервала. Экспериментальные значения теплоемкости в каждом из температурных интервалов аппроксимировались полиномиальными зависимостями (6) вида:

$$C_{\mathrm{s,m}} = a_0 + a_1T + a_2T^2 + \ldots + a_nT^n, \quad (6)$$

Среднеквадратические отклонения экспериментальных значений теплоемкости от сглаживающих кривых не превышали 0,1 %.

Сглаженные значения теплоемкости и рассчитанные значения стандартных термодинамических функций 4′-циклогексилацетофенона в кристаллическом и жидком состояниях приведены в Таблице 1.

Список литературы

1. A.V. Blokhin, Thermodynamic properties of $[C_6mim][NTf_2]$ in the condensed state / A.V. Blokhin, G.J. Kabo, Y.U. Paulechka // J. Chem. Eng. Data. – 2006. – V. 51. – P.1377–1388.

2. G.J. Kabo, Investigation of thermodynamic properties of organic substances / G.J. Kabo, A.V. Blokhin, A.G. Kabo // Chemical problems of creation of new materials and technologies. 2003. – V. 1. – P. 176–193.

MITOCHONDRIAL RESPIRATORY FUNCTION IN THE HEPATIC TISSUE OF ETHANOL-EXPOSED MICE: ROLE OF MELATONIN

Kurhaluk Natalia Nikolaevna
Dr.B.Sc, Prof.
Department of Biology, Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk, Słupsk
natalia.kurhaluk@apsl.edu.pl
Tkachenko Halina Mihailovna
Dr.B.Sc., Prof.
Department of Biology, Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk, Słupsk
halyna.tkachenko@apsl.edu.pl

The aim of this study was the assessment of the mitochondrial oxygen consumption parameters in the hepatic tissue of mice with alcohol-induced toxicity and to study the modulating effects of melatonin in the prevention of this toxicity. The ethanol-induced toxicity resulted in a significant increase in mitochondrial function at the FAD-generating substrate oxidation. These findings are consistent with a progressive uncoupling and decrease in efficiency of phosphorylation. This study confirmed the protective effects of melatonin on mitochondrial function under ethanol-induced toxicity in mice. Melatonin treatment decreased the ability of mitochondria to oxidize FAD-generated substrates and mitochondrial coupling in ethanol-induced toxicity. Melatonin has a significant effect on the oxidation of NAD-generated substrates. It improves mitochondrial coupling, as observed by improved efficiency of phosphorylation.

Keywords: *melatonin; acute ethanol-induced stress; efficiency of phosphorylation; mitochondria; FAD-generating substrate; NAD-generated substrates*

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ В ПЕЧЕНОЧНОЙ ТКАНИ МЫШЕЙ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭТАНОЛА: РОЛЬ МЕЛАТОНИНА

Кургалюк Наталья Николаевна
д.б.н., проф. кафедры биологии, Институт биологии и наук о Земле, Поморская академия в Слупске, Слупск
natalia.kurhaluk@apsl.edu.pl
Ткаченко Галина Михайловна
д.б.н., проф. кафедры биологии, Институт биологии и наук о Земле, Поморская академия в Слупске, Слупск
halyna.tkachenko@apsl.edu.pl

Целью данного исследования была оценка параметров митохондриального дыхания в ткани печени мышей с алкогольной интоксикацией и изучение

модулирующего действия мелатонина в профилактике этой токсичности. Токсичность, вызванная этанолом, приводила к значительному увеличению функционирования митохондрий при окислении ФАД-зависимых субстратов. Эти данные согласуются с прогрессирующим разобщением дыхания и снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Это исследование также подтвердило защитное действие мелатонина на процессы функционирования митохондрий при индуцированной этанолом токсичности у мышей. Введение мышам мелатонина снижало способность митохондрий окислять ФАД-зависимые субстраты, и сопряженность дыхания при токсичности, вызванной этанолом. Мелатонин оказывает значительное влияние на окисление НАД-зависимых субстратов. Он улучшает сопряженность между дыханием и фосфорилированием, о чем свидетельствует повышение эффективности этого процесса.

Ключевые слова: *мелатонин; острый стресс, вызванный этанолом; эффективность фосфорилирования; митохондрии; ФАД-зависимые и НАД-зависимые субстраты*

Introduction. Melatonin is remarkably functionally diverse with actions as a free radical scavenger and antioxidant, circadian rhythm regulator, anti-inflammatory and immunoregulating molecule, and an oncostatic agent [10]. Melatonin, a potent antioxidant, has long been known to significantly reduce the oxidative stress burden of aging cells or cells exposed to toxins. It was found to be in higher concentrations in mitochondria than in other organelles or subcellular locations to protect against overproduction of free radicals and age-related organismal decline [6, 16].

Oxidative stress causes mitochondrial dysfunction in impaired cellular respiration, decreased function of complexes I, II, and IV, and a reduction in oxidative phosphorylation in ethanol-treated myotubes and muscle from ethanol-fed mice [9]. Melatonin also participates in the physiologic regulation of mitochondrial homeostasis stimulating electron transport and ATP production in the inner mitochondrial membrane [7, 15]. Melatonin improves mitochondrial function, reduces oxidative stress, and increases the activity of the respiratory chain [1] and acts directly by scavenging ROS and also indirectly by inducing gene expression of antioxidant enzymes including glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, and catalase [5, 14]. This study was performed to assess the mitochondrial oxygen consumption parameters in the hepatic tissue of mice with alcohol-induced toxicity and study the modulating effects of melatonin in the prevention of this toxicity.

Materials and methods. The animals used in this experiment were 2 to 3-month-old male white mice (*Mus musculus*). The animals were housed in cages (6 individuals in each) in rooms with artificial lighting (8.00-20.00 – light, 20.00-8.00 – darkness) at conventional conditions (25 ± 2 °C temperature; 45-60% relative humidity). Mice were allowed *ad libitum* access to water and food. The animals

previously acclimatized to the light/dark cycle for 7 days: darkness = 12: 12 (12 hours light 750 Lx / 12 hours darkness; lighting from 6.00 to 18.00) in the spring-summer period. After a period of acclimatization, mice were indiscriminately divided into three groups each group contained six mice. All the procedures and protocols were approved by the national and international guidelines and rules. To eliminate circadian rhythm changes, all examinations started in the early span of the animals' rest period (at 10.00 am and ended at midnight). After a 1-week adaptation period, mice were randomly divided into three groups: 1) untreated control (6 animals), 2) Acute ethanol-induced stress (AES, 6 animals), 3) Melatonin treatment + Acute ethanol-induced stress (6 animals).

Regardless of whether the animal is active during the day, at night, or does not have a clear plan of activity, the maximum level of melatonin is always observed during the dark phase of a natural or artificially created cycle of alternating day and night [2]. Melatonin (Sigma-Aldrich Sp. z.o.o., Poznan, Poland) was introduced daily by intraperitoneal injections in a dose of 10 mg per kg body weight (b.w.) for 10 days in the early span of the animals' rest period (at 10.00 am and ended at midnight). It was dissolved in a minimum volume of ethanol and diluted in 0.9% NaCl to yield a dose of 10 mg per kg b.w., as described in previous studies by Bonnefont-Rousselot and Collin (2010) [3] and Shin and co-workers (2015) [17]. Melatonin was intraperitoneally injected 30 min before ethanol.

Acute alcohol-induced stress was induced by intraperitoneal injection of ethanol in a dose of 0.75 g per kg b.w. per day. It was diluted from a 95% (v/v) solution to a concentration of 20% (v/v) with physiological saline (0.9%) and administered as intraperitoneal injections at a dose of 0.75 g per kg b.w. in an injection volume of 4.73 mL per kg b.w. for 10 days of the experiment, as described by Powers and Chester (2014). At the end of the trial (10 days), the mice were promptly decapitated. Samples were collected 24 h after the last drug administration and injection of ethanol (between 10.00 am and 12.00 am).

The liver was removed immediately from mice after decapitation. One liver sample was used for each mitochondrial preparation. Mitochondria were isolated by differential centrifugation according to Kondrashova and Doliba (1989) method [8]. Mitochondrial respiratory function was measured in the multichannel chamber using a Clark-type electrode by the polarographic method of Chance and Williams (1955) [4]. Homogenates were added to the respiration chamber containing a total volume of 1.0 mL of incubation media. The medium contained 120 mM KCl, 2 mM K_2CO_3, 2 mM KH_2PO_4, 10 mM HEPES. Potassium hydroxide (1.0 N) was used to adjust the pH of the medium to 7.20 at 26ºC. Succinate (0.35 mM final concentration) and α-ketoglutarate (1 mM final concentration) were used as oxidative substrates. ADP (phosphate acceptor) was administered at a concentration of 0.2 mM. Measured mitochondrial oxygen consumption parameters were: State 2 (oxygen consumption before the addition of ADP), State 3 (oxygen consumption stimulated by ADP), State

4 (oxygen consumption after cessation of ADP phosphorylation), respiratory control ratio (RCR) described by Chance (ratio of state 3 to state 4), ADP/O ratio (ratio between nanomoles of ADP phosphorylated and nanomoles of oxygen consumed during state 3), and rate of phosphorylation (Vph). The respiratory control ratio and ADP/O ratio were calculated by the method of Chance and Williams (1955) [4]. Oxygen consumption was determined in the presence (state 3) or the absence (state 4) of phosphate acceptor and recorded as nanogram oxygen atoms per minute per milligram of protein. The respiratory control ratio by Chance was calculated as the ratio of state 3 to state 4 respiration rates. The ADP-to-oxygen ratio (ADP/O) was calculated as the ratio of nmoles of added ADP per nanogram atoms of oxygen utilized during state 3 [4].

Results are expressed as mean ± S.D. All variables were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov and Lilliefors tests ($p > 0.05$) and homogeneity of variance was checked using Levene's test [19]. The significance of differences in the level of enzymes and substrates between control and examined groups was examined by one-way ANOVA. Bonferroni's post-test was applied as well. All statistical calculations were performed on separate data from each individual with STATISTICA 13.3 software (StatSoft Inc., Poland).

Results. The mitochondrial oxygen consumption of the hepatic homogenates during acute ethanol stress (AES), as well as combined treatment of melatonin and AES in mice, were carried out using the oxidation of FADH- (succinic acid, SC) and NADH-generating (α-ketoglutarate, KGL) substrates. Results of the current study revealed that AES model increased RCR and Vph by 22% and 71% ($p < 0.05$), respectively, for SC oxidation, while RCR and ADP/O ratio were decreased by 42% and 40% ($p < 0.05$), respectively, for KGL oxidation compared to control group. V3 and ADP/O ratio were non-significantly increased by 50.4% and 13.8% ($p > 0.05$) for SC oxidation. Vph was non-significantly decreased by 28.8% ($p > 0.05$) for KGL oxidation compared to control group. Melatonin treatment of AES-exposed mice non-considerably decreased the V_3, RCR, ADP/O, and Vph by 5.7%, 5.2%, 8.6%, and 13.8% ($p > 0.05$) for SC oxidation compared to the AES group. These results were confirmed by an increase of these parameters after adding KGL, i.e. by 3.2% ($p > 0.05$) for V_3, by 18.7% ($p < 0.05$) for RCR, by 47.5% ($p < 0.05$) for ADP/O ratio, and by 52.2% ($p > 0.05$) for Vph after adding KGL.

Our results are in agreement with the study of Martín and co-workers (2000) regarding increases in the activities of mitochondrial respiratory complexes I and IV in a time-dependent manner after melatonin administration to rats [12]. The activities of complexes II and III of the brain and liver were not affected [11]. The mitochondrial damage induced by ruthenium red in rats was diminished by melatonin administration. Prevention was correlated with an increase in activity of complexes I and IV [11]. Moreover, melatonin in concentrations of 1 nM and 10–100 nM significantly increased the activity of complexes I and IV in rat liver and brain mitochondria, respectively [11-

13]. The BN-PAGE histochemical procedure also revealed an increase in complex I activity after melatonin treatment [13]. The effect on complex I was also studied using a BN-PAGE histochemical procedure to measure changes in its activity induced by melatonin; this study documented an increase in complex I activity after melatonin treatment [13]. Regarding complex IV, melatonin only improves the activity of this complex when the enzyme is in its active form [13]. The high redox potential of melatonin (0.94 V) [18] suggests it may interact with complexes of the electron transport chain and may donate and accept electrons, thereby increasing electron flow, an effect not possessed by other antioxidants [13]. Moreover, melatonin also increases the production of ATP in control mitochondria and counteracts cyanide-induced inhibition of ATP synthesis [13].

Conclusions. The ethanol-induced toxicity resulted in a significant increase in mitochondrial function at the FAD-generating substrate (succinate) oxidation. State 3, RCR, and Vph were increased. These findings are consistent with a progressive uncoupling and decrease in efficiency of phosphorylation at the FAD-generated oxidation. Melatonin treatment had significant effects on the mitochondrial oxidation of the NADH-generated substrate (α-ketoglutarate). Mitochondrial function is not changed by Melatonin treatment in terms of succinate oxidation, while RCR and Vph tend to increase when adding rotenone as an inhibitor of the mitochondrial complex I. This study confirmed the protective effects of melatonin on mitochondrial function under AES-induced toxicity in mice. Our findings demonstrate that melatonin treatment improved RCR and Vph ratio for ethanol-induced toxicity using either NADH- or FAD-generated substrates. Melatonin treatment decreased the ability of mitochondria to oxidize FAD-generated substrates and mitochondrial coupling in ethanol-induced toxicity. Melatonin has a significant effect on the oxidation of NAD-generated substrates. It improves mitochondrial coupling, as observed by improved RCR, ADP/O, and Vph.

Acknowledgments. This research has been supported by The Visegrad Fund (Bratislava, Slovak Republic), and it is cordially appreciated by the authors.

References

1. D. Acuña-Castroviejo, G. Escames, L.C. López, A.B. Hitos, J. León – 2005. Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis. Endocrine, 27(2): 159-168.

2. J. Arendt, S. Deacon, J. English, S. Hampton, L. Morgan, – 1995. Melatonin and adjustment to phase shift. J. Sleep Res., 4(S2): 74-79.

3. D. Bonnefont-Rousselot, F. Collin, – 2010. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. Toxicology, 278(1): 55-67.

4. B. Chance, G.R. Williams, – 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. J. Biol. Chem., 217(1): 409-427.

5. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. J. Pineal Res., /J.J. García [et al]// – 2014 56(3): 225-237.

6. J. Govender, B. Loos, E. Marais, A.M. Engelbrecht, – 2014. Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review of the protective role of melatonin. J. Pineal Res., 57(4): 367-380.

7. K.E. Ireland, A. Maloyan, L. Myatt, – 2018. Melatonin Improves Mitochondrial Respiration in Syncytiotrophoblasts From Placentas of Obese Women. Reprod. Sci., 25(1): 120-130.

8. M.N. Kondrashova, N.M. Doliba – 1989. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine. FEBS Lett., 243(2): 153-155.

9. Oxidative stress mediates ethanol-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction and dysregulated protein synthesis and autophagy. Free Radic. Biol. Med., /A Kumar [et al]// – 2019. 145: 284-299.

10. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. J. Pineal. Res., /L.C. Manchester [et al]// – 2015. 59(4): 403-419.

11. M. Martín, M. Macías, G. Escames, J. León, D. Acuña-Castroviejo, – 2000a. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. FASEB J., 14(12): 1677-1679.

12. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red *in vivo*. J. Pineal Res., /Martín M., [et al]// – 2000b. 28(4): 242-248.

13 Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. Int. J. Biochem. Cell Biol., / Martín M [et al]// – 2002. 34(4): 348-357.

14. R.J. Reiter, D.X. Tan – 2003. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. Cardiovasc. Res., 58(1): 10-19.

15. R.J. Reiter, D.X. Tan, L.C. Manchester, M.R. El-Sawi, – 2002. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. Ann. N. Y. Acad. Sci., 959: 238-250.

16. Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. Molecules, /R.J. Reiter, [et al]// – 2018. Mitochondria: 23(2): 509.

17. Melatonin attenuates neutrophil inflammation and mucus secretion in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary diseases via the suppression of Erk-Sp1 signaling. J. Pineal Res., / I.S. Shin, [et al]// – 2015. 58(1): 50-60.

18. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. Free Radic. Biol. Med., /D.X. Tan, [et al]// – 2000. 29(11): 1177-1185.

19. J.H. Zar. 1999. Biostatistical Analysis. 4th ed., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN THE LIVER OF MICE WITH SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME

Kurhaluk Natalia Nikolaevna
Dr.B.SC., Prof.
Department of Biology, Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk, Słupsk
natalia.kurhaluk@apsl.edu.pl
Halina Tkachenko
Dr.B.SC., Prof.
Department of Biology, Institute of Biology and Earth Sciences, Pomeranian University in Słupsk, Słupsk
halyna.tkachenko@apsl.edu.pl

The purpose of this study was the evaluation the biomarkers of lipid peroxidation and antioxidant defenses in a model of Lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress in mice. Lipid peroxidation was measured as 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, while antioxidant defenses were assessed as the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the hepatic tissue of white Balb/c mice. LPS-induced oxidative stress aggravated alterations in the activities of antioxidant defenses. LPS induced statistically significant increases in the concentration of aldehydic and ketonic derivatives of oxidatively modified proteins (OMP). Lipid peroxidation was activated, but the TBARS level was non-significantly increased. It is clear that while LPS induces oxidative stress, the combination of both oxidations of lipids and proteins is more highly toxic to the organism. As a consequence, protein damage and lipid peroxidation in the hepatic tissue is highly expanded.

Keywords: *Lipopolysaccharide (LPS); 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); oxidatively modified proteins (OMP); superoxide dismutase (SOD); catalase (CAT)*

БИОМАРКЕРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ С СИСТЕМНЫМ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ СИНДРОМОМ

Кургалюк Наталья Николаевна
д.б.н., проф. кафедры биологии, Институт биологии и наук о Земле, Поморская академия в Слупске, Слупск
natalia.kurhaluk@apsl.edu.pl
Ткаченко Галина Михайловна
д.б.н., проф. кафедры биологии, Институт биологии и наук о Земле, Поморская академия в Слупске, Слупск
halyna.tkachenko@apsl.edu.pl

Целью данного исследования была оценка уровня биомаркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты на модели индуцированного

липополисахаридами (ЛПС) окислительного стресса у мышей. Перекисное окисление липидов измеряли по уровню продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (TBARS), окисление белков по альдегидным и кетоновым производным, а антиоксидантную защиту оценивали по активности супероксиддисмутазы (SOD) и каталазы (CAT) в ткани печени белых мышей Balb/c. Окислительный стресс, вызванный ЛПС, усугублял изменения активности антиоксидантной защиты. ЛПС индуцировал увеличение концентрации альдегидных и кетоновых производных окислительно модифицированных белков (ОМБ). Перекисное окисление липидов активировалось, но уровень TBARS повышался незначительно. Понятно, что в то время как ЛПС индуцирует окислительный стресс, сочетание как окисления липидов, так и белков более высокотоксично для организма. Как следствие, активируется повреждение белков и окисление липидов в печеночной ткани.

Ключевые слова: *липополисахарид (ЛПС); ТБК-активные продукты; окислительно модифицированные белки (ОМР); супероксиддисмутаза (СОД); каталаза (КАТ)*

Introduction. Lipopolysaccharide (LPS) is a constituent of the outer membrane of Gram-negative bacteria and is an important risk factor for sepsis [8]. LPS is a bacterial component that affects anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokine production, particularly tumor necrosis factor-α (TNF-α), one of the most pivotal mediators involved in the pathogenesis of LPS and Gram-negative bacterial infections [21]. LPS was found to stimulate the secretion of TNF-α in a dose-dependent manner [13]. It has been documented that many pro-inflammatory markers, including IL-1β, IL-6, and TNF-α, are stimulated by this molecule triggering several immune cascades [15]. Inflammatory pathways mediated by oxidative stress are also known to be stimulated by LPS [4]. On the other hand, LPS is a primary component of the intestinal microflora [29]. Gut-derived LPS has been verified to play a crucial role in the development of various liver injury diseases, including alcoholic liver disease [24], viral hepatitis [12], liver cirrhosis [25], and liver cancer [27].

In the current study, lipid peroxidation and antioxidant defenses were evaluated in a model of LPS-induced oxidative stress in mice. Lipid peroxidation was measured as 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, oxidatively modified proteins (OMP) were measured as aldehydic and ketonic derivatives, while antioxidant defenses were assessed as the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the hepatic tissue of white Balb/c mice.

Materials and methods. Healthy male white Balb/c mice (*Mus musculus*), weighing about 20–30 grams and aged about 2–3 months, were used in the experiments. The data were collected from 12 adult animals divided into two groups, i.e. untreated control (6 animals) and LPS-induced systemic inflammatory response syndrome (6 animals). The experiments were performed by the Guidelines of the

European Union Council and the current laws and were approved by the Ethical Commission (2612/2016). Lipopolysaccharide [*Escherichia coli* LPS 026:B6; Sigma-Aldrich Sp. z.o.o, Poznan, Poland; lyophilized powder chromatographically purified by gel filtration (protein content < 1%) was used for modeling systemic inflammatory response syndrome in mice. Shortly before use, LPS was dissolved in sterile normal saline (0.9% NaCl). Injections of LPS were administered once, intraperitoneally, at a dose of 150 μg per mouse, as described by Blanqué and co-workers (1999) [3] and Yang and co-workers (2013) [26]. Negative control mice were injected with 0.9% NaCl. Samples were collected 24 h after the last drug administration. The liver was removed immediately from mice after decapitation. The medium contained 120 mM KCl, 2 mM K_2CO_3, 2 mM KH_2PO_4, 10 mM HEPES.

TBARS were measured using the method described by Kamyshnikov (2004) [14]. TBARS level was expressed in nmol of malonic dialdehyde (MDA) per mg of protein. The carbonyl derivatives of oxidatively modified proteins (OMP) rate was estimated using the reaction of the resultant carbonyl derivatives of amino acids with 2.4-dinitrophenyl hydrazine (DNFH), as described by Levine and co-workers (1990) [18] and modified by Dubinina and co-workers (1995) [9]. Levels of carbonyl groups were determined spectrophotometrically at 370 nm (aldehydic derivatives, AD) and 430 nm (ketonic derivatives, KD), and expressed in nmol per mg protein. Superoxide dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) activity in the supernatant was measured according to Kostiuk et al. (1990) [17]. SOD activity was assessed by its ability to dismutate superoxide produced during quercetin auto-oxidation in an alkaline medium (pH 10.0). The activity was expressed in units of SOD per mg of protein. Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) activity was determined by measuring the decrease of H_2O_2 in the reaction mixture with the method developed by Koroliuk et al. (1988) [16]. One unit of CAT activity was defined as the amount of enzyme required for decomposition of 1 μmol H_2O_2 per min per mg of protein.

Results were expressed as mean ± S.D. All variables were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov and Lilliefors tests ($p > 0.05$) and homogeneity of variance was checked by using Levene's test. The significance of differences in parameters between untreated control and treated groups was examined using a one-way analysis of variance (ANOVA). We also used Bonferonni's post-test [28]. Statistical analysis was carried out in one way, i.e. the LPS-induced systemic inflammatory response syndrome was compared with those of the untreated control group. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical calculations were performed on separate data from each group with STATISTICA 13.3 software (StatSoft Inc., Poland).

Results. TBARS are end products of the terminal stages of lipid peroxidation [11]. The TBARS level was non-significantly increased in the LPS-exposed mice compared to the untreated control group (17.09 ± 1.69 nmol·mg^{-1} protein *vs.* 12.33 ± 1.29 nmol mg^{-1} protein, increase by 38.6%, $p > 0.05$). Intensification of free radical

oxidation causes changes in proteins and their structure. Such changes are presented as carbonyl derivatives consisting of aldehydic and ketonic derivatives of OMP [2]. The concentration of aldehydic derivatives of OMP was higher in the LPS-exposed group compared to the untreated control mice (12.61 ± 0.79 nmol·mg^{-1} protein *vs.* 6.61 ± 0.54 nmol·mg^{-1} protein, an increase by 90.8%, p = 0.000). LPS-induced systemic inflammatory response syndrome statistically significant increased the concentration of ketonic derivatives of OMP, i.e. (13.71 ± 0.77 nmol·mg^{-1} protein *vs.* 8.76 ± 0.69 nmol·mg^{-1} protein, increase by 56.5%, p = 0.000) compared to the untreated controls. Oxidative stress has also been known to contribute to the pathophysiology of LPS-induced systemic inflammatory response syndrome [22]. In this study, mice treated with LPS displayed increased levels of lipid peroxidation markers, TBARS, compared to saline-treated control mice. On the other hand, the levels of oxidatively modified proteins were increased (by 90.8% and 56.5%, p = 0.000) compared to saline-treated control mice.

The overproduction of free radicals can cause oxidative-stress damage to a range of biomolecules, and thus potentially contribute to several pathologies, from neurodegenerative disorders to cardiovascular diseases and metabolic disorders [23]. As major antioxidant enzymes, superoxide dismutases (SODs), including copper-zinc superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD), manganese superoxide dismutase, and extracellular superoxide dismutase, play a crucial role in scavenging superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and diminishing oxidative stress [20]. The SOD activity was higher in the LPS-exposed group compared to the untreated control mice (598.23 ± 360.84 U·mg^{-1} protein *vs* 360.84 ± 16.19 U·mg^{-1} protein, by 65.8%, p = 0.000). Catalases are ubiquitous enzymes that prevent cell oxidative damage by degrading hydrogen peroxide to water and oxygen with high efficiency [1]. In our study, LPS-induced systemic inflammatory response syndrome statistically significant decreased the CAT activity compared to the untreated controls, i.e. (6.98 ± 0.53 μmol·min^{-1}·mg^{-1} protein *vs* 10.43 ± 0.40 μmol·min^{-1}·mg^{-1} protein, by 33.1%, p = 0.000). Some data suggest that LPS helps to induce oxidative stress in different clinical settings, such as atherosclerosis [5] and neurodegenerative disease [19]. Several studies investigated the LPS' role in liver modifications [10]. Carpino and co-workers (2020) revealed an increased LPS localization into liver cells from biopsy-proven human and experimental non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which was significantly associated with liver inflammation through the TLR4 pathway involved in LPS-induced activation of macrophages and platelets [7]. Also, Carpino and co-workers (2017) observed an association between systemic oxidative stress (systemic oxidative stress markers, such as serum F2-isoprostanes and NADPH oxidase activity) and some severity indices of fibrosis in liver biopsies of NAFLD patients [6].

Conclusions. Our findings demonstrated that the LPS-induced oxidative stress aggravated alterations in the activities of antioxidant defenses. LPS induced statistically significant increases in the concentration of aldehydic and ketonic

derivatives of OMP. Lipid peroxidation was activated, but the TBARS level was non-significantly increased.

Acknowledgments. This research has been supported by The Visegrad Fund (Bratislava, Slovak Republic), and it is cordially appreciated by the authors.

References

1. M. Alfonso-Prieto, X. Biarnés, P. Vidossich, C. Rovira, – 2009. The molecular mechanism of the catalase reaction. J. Am. Chem. Soc., 131(33): 11751-11761.

2. Biologie des fonctions renales et de l' insuffisance renale. Stress carbonylé et modifications oxydatives des protéines au cours de l'insuffisance rénale chronique [Carbonyl stress and oxidatively modified proteins in chronic renal failure]. Ann. Biol. Clin. (Paris), /A.S.Bargnoux, [et al]// Groupe de travail de la SFBC: – 2009. 67(2): 153-158. French.

3. R. Blanqué, C. Meakin, S. Millet, C.R. Gardner, – 1999. Dual mechanisms of action of interferon-gamma in potentiating responses to LPS in mice: IL1, TNFalpha and IL6 production in serum and hypothermia. Gen. Pharmacol., 32(4): 453-461.

4. In vitro and in vivo protective effects of fermented preparations of dietary herbs against lipopolysaccharide insult. Food Chem., / S. Bose, [et al]// – 2012. 134(2): 758-765.

5. Localization of lipopolysaccharide from Escherichia Coli into human atherosclerotic plaque. Sci. Rep., / R. Carnevale, [et al]// – 2018. 8(1): 3598.

6. Hepatic Stem/Progenitor Cell Activation Differs between Primary Sclerosing and Primary Biliary Cholangitis. Am. J. Pathol., / G. Carpino , [et al]// – 2018. 188(3): 627-639.

7. Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD. / G. Carpino, [et al]// – 2020. Increased Liver Hepatology, 72(2): 470-485.

8. A Journey from Structure to Function of Bacterial Lipopolysaccharides. / F. Di Lorenzo, [et al]// – 2021, Chem. Rev., doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01321.

9. E.E. Dubinina, S.O. Burmistrov, D.A. Khodov, I.G. Porotov – 1995. Okislitel'naia modifikatsiia belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniia [Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it]. Vopr. Med. Khim., 41(1): 24-26.

10. New Insights into the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Gut-Derived Lipopolysaccharides and Oxidative Stress. Nutrients / D. Ferro, [et al]// – 2020., 12(9): 2762.

11. Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice. /M. Gyurászová, [et al]// – 2018. Physiol. Res., 67(6): 921-934.

12. Synthetic anti-lipopolysaccharide peptides and hepatitis C virus infection. Expert. Opin. Investig. Drugs, / F. Habersetzer, [et al]// – 2013. 22(7): 853-862.

13. Evaluation of the use of anti-TNF-alpha in an LPS-induced murine model. J. Reprod. Immunol. / C. Holmgren, [et al]// – 2008. 78(2): 134-139.

14. V. Kamyshnikov, – 2004. A reference book on the clinic and biochemical researches and laboratory diagnostics. MEDpress-inform, Moscow (in Russian).

15. A. Kawata, Y. Murakami, S. Suzuki, S. Fujisawa, – 2018. Anti-inflammatory Activity of β-Carotene, Lycopene and Tri-n-butylborane, a Scavenger of Reactive Oxygen Species. In Vivo, 32(2): 255-264.

16. M.A. Koroliuk, L.I. Ivanova, I.G. Maĭorova, V.E. Tokarev, – 1988. Metod opredeleniia aktivnosti katalazy [A method of determining catalase activity]. Lab. Delo, (1): 16-19.

17. V.A. Kostiuk, A.I. Potapovich, Zh.V. Kovaleva, – 1990. Prostoĭ i chuvstvitel'nyĭ metod opredeleniia aktivnosti superoksid-dismutazy, osnovannyĭ na reaktsii okisleniia kvertsetina [A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation]. Vopr. Med. Khim., 36(2): 88-91.

18. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol., / R.L. Levine, [et al]// – 1990. 186: 464-478.

19. Oxidative Stress and Gut-Derived Lipopolysaccharides in Neurodegenerative Disease: Role of NOX2. / L. Loffredo, [et al]// Neurodegenerative Disease study group, – 2020. Oxid. Med. Cell Longev., 2020: 8630275.

20. L. Miao, D.K. St Clair, – 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. Free Radic. Biol. Med., 47(4): 344-356.

21. Tumor necrosis factor alpha has a crucial role in increased reactive oxygen species production in platelets of mice injected with lipopolysaccharide. / A.C.A. Naime, [et al]// – 2019. Platelets, 30(8): 1047-1052.

22. Oxidative Stress and Acute Kidney Injury in Critical Illness: Pathophysiologic Mechanisms-Biomarkers-Interventions, and Future Perspectives. / P. Pavlakou, [et al]// – 2017. Oxid. Med. Cell Longev., 2017: 6193694.

23. Strategies to expand the therapeutic potential of superoxide dismutase by exploiting delivery approaches. / A.C. Rosa [et al]// – 2021. Int. J. Biol. Macromol., 168: 846-865.

24 Inulin alleviates inflammation of alcoholic liver disease via SCFAs-inducing suppression of M1 and facilitation of M2 macrophages in mice. / Z. Wang, [et al]// – 2020. Int. Immunopharmacol., 78: 106062.

25. R. Wiest, M. Lawson, M. Geuking, – 2014. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. J. Hepatol., 60(1): 197-209.

26. LPS converts Gr-1(+) CD115(+) myeloid-derived suppressor cells from M2 to M1 via P38 MAPK. / Y. Yang, [et al]// – 2013. Exp. Cell Res., 319(12): 1774-1783.

27. Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents. / L.X. Yu, [et al]// – 2010. Hepatology, 52(4): 1322-1333.

28. J.H. Zar – 1999. Biostatistical Analysis. 4th ed., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

29. Y. Zhao, N.M. Sharfman, V.R. Jaber, W.J. Lukiw, – 2019. Down-Regulation of Essential Synaptic Components by GI-Tract Microbiome-Derived Lipopolysaccharide (LPS) in LPS-Treated Human Neuronal-Glial (HNG) Cells in Primary Culture: Relevance to Alzheimer's Disease (AD). Front. Cell Neurosci., 13: 314.

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АКТИВИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ С ЛЕЙКОЦИТАМИ

Кухаренко Людмила Валентиновна
к.ф.-м.н., доцент, Белорусский государственный медицинский университет, Минск
KukharenkoLV@bsmu.by
Гольцев Михаил Всеволодович
к.ф.-м.н., доцент, заведующий кафедрой медицинской и биологической физики, Белорусский государственный медицинский университет, Минск
mgoltsev@mail.ru
Белая Ольга Николаевна
к.ф.-м.н., доцент, Белорусский государственный медицинский университет, Минск
olnikbel@yandex.ru

В данной работе изменение морфологии поверхности тромбоцитов и их взаимодействие с лейкоцитами после добавления H_2O_2 в обогащенную тромбоцитами плазму исследовалось с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) Nanoscope (R) IIIa. Визуализированы тромбоцитарные агрегаты и их взаимодействие с лейкоцитами с помощью АСМ. АСМ-исследования могут прояснить некоторые аспекты сложных процессов тромбообразования, включая идентификацию поверхностных лигандов и рецепторов, участвующих в тромбообразовании.

Ключевые слова: *атомно-силовая микроскопия; тромбоциты; лейкоциты*

ATOMIC FORCE MICROSCOPY STUDY OF ACTIVATED PLATELETS INTERACTION WITH LEUCOCYTES

Kukharenko Lydmila Valentinovna
C.P-M.Sc., Associate Professor, Associate Professor of the Educational Institution Belarussian State Medical University
KukharenkoLV@bsmu.by
Goltsev Mihail Vsevolodovich
C.P-M.Sc., Associate Professor, Head of Medical and Biological Physics Department of the Educational Institution Belarussian State Medical University
mgoltsev@mail.ru
Belaya Olga Nikolaevna
C.P-M.Sc., Associate Professor, Associate Professor of the Educational Institution Belarussian State Medical University
olnikbel@yandex.ru

In the study, the platelet surface morphology change and platelet interaction with leukocytes after H_2O_2 addition to platelet-rich plasma was investigated by atomic force microscope (AFM) Nanoscope (R) IIIa. Platelet aggregates and their interaction with leukocytes were visualized by AFM. AFM investigations can clarify some aspects of complex processes of thrombus formation, including the identification of surface ligands and receptors involved in thrombus formation.

Keywords: *atomic force microscopy, platelets, leukocytes*

Несмотря на успехи в изучении механизмов активации тромбоцитов, многие вопросы, касающиеся структурной модификации поверхности активированных тромбоцитов, а также их взаимодействие с лейкоцитами остаются не известными. Поэтому использование и разработка новых экспериментальных подходов к исследованию морфофункционального состояния тромбоцитов при их адгезии, агрегации, а так же процессов их взаимодействия с лейкоцитами не утрачивает своей актуальности. В настоящее время методы атомно-силовой микроскопии (АСМ) находят широкое применение в изучении поверхностной морфологии клеток [1]. Неразрушающий характер исследований, высокое, сравнимое с электронно-микроскопическим, пространственное разрешение, при этом без необходимости проведения специальных процедур фиксации и контрастирования образцов и возможность проведения исследований в жидких средах делают особенно перспективным применение АСМ для исследования морфологии поверхности тромбоцитов. Метод АСМ также позволяет получать детальные изображения отдельных фрагментов сканируемой поверхности, а, следовательно, дает возможность проследить за изменениями функционального состояния клеток.

Для проведения АСМ-исследований тромбоцитов была разработана методика их фиксации для изучения морфологии интактных и активированных кровяных пластинок. Слюда использовалась в качестве подложки для АСМ исследований тромбоцитов. Забор крови из локтевой вены проводился максимально быстро, благодаря чему исследуемые морфологические признаки тромбоцитов соответствовали их функциональному состоянию в кровотоке. Далее 2 мл крови фиксировали в 4 мл 0,125% глутаральдегида. Фиксированную кровь сразу же центрифугировали 15 мин при 1000 об/мин для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). Супернатант разводили раствором 0,125% глутаральдегида в два раза. По одному кусочку свежесколотой слюды помещали на дно микроробирок, в которые добавляли 400 мкл клеточной суспензии. Через 20 мин образцы промывали фосфатныым буфером (0,2 М Na_2HPO_4/NaH_2PO_4) 5 раз, а затем дегидратировали клетки последовательно помещая подложки с тромбоцитами на 5 мин в водные растворы этанола концентрации 30, 50, 70, 96% и высушивали на воздухе.

В сосудистом русле при отсутствии патологических активирующих факторов подавляющее большинство тромбоцитов интактны, имеют характерную дискоидную форму и практически гладкую поверхность. Анализ полученных АСМ-изображений интактных тромбоцитов показал, что тромбоциты, циркулирующие в кровотоке при отсутствии активирующих факторов, были интактны и имели дисковидную или овальную формы. Диаметр интактных тромбоцитов в среднем составлял 2,5 – 3 мкм, а высота –150 – 300 нм.

При воздействии факторов активации происходит изменение формы тромбоцитов, отражающее процессы их внутренней ультраструктурной и биохимической перестройки. При этом развивается типичная последовательность изменений: от формы интактного тромбоцита – дискоцита к активированным клеткам – дискоэхиноциту, то есть дискоциту, у которого на поверхности появляются отростки, далее к сфероциту, имеющего форму шара, и сфероэхиноциту, у которого не только форма становится сферичной, но и возрастает число отростков. В данной работе активация тромбоцитов осуществлялась добавлением H_2O_2 (10^{-5} М) в обогащенную тромбоцитами плазму.

Известно, что взаимодействие тромбоцитов с клетками крови осуществляется посредством адгезивных молекул Р-селектина, которые экспонируются активированными тромбоцитами. Добавление H_2O_2 в обогащенную тромбоцитами плазму инициировало экспрессию молекул Р-селектина на мембране тромбоцитов путем перемещения их из внутриклеточного депо в α-гранулах. Образование агрегатов, состоящих из тромбоцитов и лейкоцитов, осуществлялось через взаимодействие молекул Р-селектина на мембране тромбоцитов со специфическим Р-селектин-гликопротеиновым лигандом-1 (PSGL-1), находящимся на поверхности лейкоцитов (нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов). Активация тромбоцитов так же сопровождается высвобождением фибриногена и адгезивных молекул ICAM-2, которые являются лигандом для β_2- интегринов CD11b/CD18, CD11a/CD18. Более того, лейкоциты могут напрямую взаимодействовать с фактором Виллебранда через PSGL-1, тем самым усиливая адгезию к тромбоцитам.

На рис.1 показано АСМ–изображение активированных (10^{-5} М H_2O_2) тромбоцитов, взаимодействующих с лейкоцитом.

Визуализировано изменение морфологии поверхности, как тромбоцитов, так и лейкоцита. Активированные тромбоциты из дисковидной формы превращаются в сферические с многочисленными короткими выпячиваниями мембраны и агрегируют. Визуализировано образование длинных узких филоподий тромбоцитов. Ширина филоподий составляет от 30 нм до 290 нм. Высота активированных тромбоцитов изменялась от 480 нм до 760 нм. Данные АСМ-изображения так же показывают процесс образования микровилей у лейкоцита.

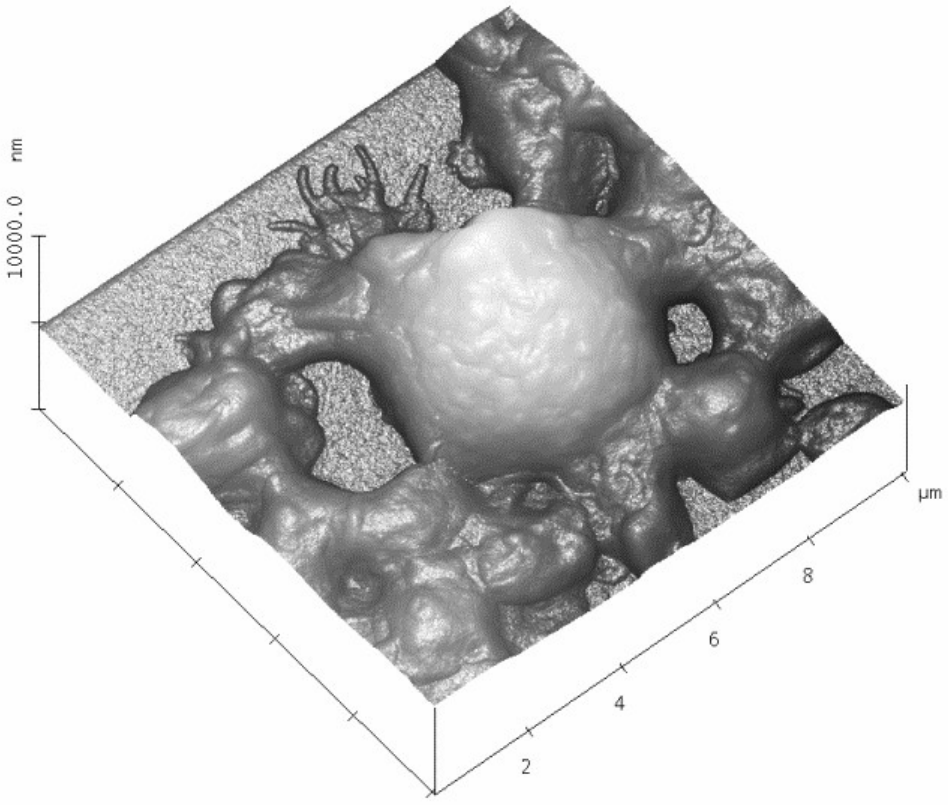


Рисунок 1 – АСМ-изображение активированных тромбоцитов

АСМ-исследования могут прояснить некоторые аспекты сложных процессов тромбообразования, включая идентификацию поверхностных лигандов и рецепторов, участвующих в тромбообразовании. Более того, на основе АСМ можно не только разработать клиническую методику оценки морфофункциональной активности тромбоцитов, основанную на морфометрии большого числа одновременно визуализируемых клеток, но и исследовать взаимодействие кровяных пластинок с клетками крови в процессе образования тромба.

Список литературы

1. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology /Y.F., Dufrene, [et al.]// Nature Nanotechnology. 2017. Vol. 12. P.295-307.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРОМБИНА С ПОЛИСАХАРИДАМИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

Лаппо Даниил Дмитриевич
Студент 4 курса химического факультета БГУ, Минск
lappo.daniil2015@yandex.ru
Просмыцкая Юлия Сергеевна
Студентка химического факультета БГУ, Минск
prosmjulia47@gmail.com
Савицкая Татьяна Александровна
д.х.н., доцент, заместитель декана по научной работе химического факультета БГУ, Минск
SavitskayaTA@bsu.by

Цель исследования заключалась в визуализации процесса связывания тромбина, играющего главную роль в процессе спайкообразования, с полимерными компонентами, входящими в состав новых барьерных пленок на основе полисахаридов с помощью виртуального скрининга. Исследование включало моделирование взаимодействия тромбина с различными олигомерами карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), альгината натрия (АН) и крахмала методом молекулярного докинга. В результате были получены относительные энергии связывания для компонентов комплекса белок – лиганд, значения которых были сопоставлены с результатами экспериментов in vivo.

Ключевые слова: *молекулярный докинг; тромбин; полисахариды; барьерные пленки*

MODELING THE INTERACTION OF THROMBIN WITH POLYSACCHARIDES BY MOLECULAR DOCKING

Lappo Daniil Dmitrievich
Faculty of Chemistry, Belarusian State University, Minsk
lappo.daniil2015@yandex.ru
Prosmytskaya Julia Sergeevna
Faculty of Chemistry, Belarusian State University, Minsk
prosmjulia47@gmail.com
Savitskaya Tatyana Alexandrovna
Dr.Ch.Sc., Associate Professor, Deputy Dean for Research of the Faculty of Chemistry, Belarusian State University, Minsk
SavitskayaTA@bsu.by

The aim of the study was to visualize the process of thrombin binding, which plays a major role in the process of adhesion formation, with polymer components that are part of new barrier films based on polysaccharides using virtual screening. The study included modeling the interaction of thrombin with various oligomers of carboxymethyl cellulose (CMC), sodium alginate (SA), and starch by molecular

docking. As a result, the relative binding energies for the components of the protein-ligand complex were obtained, the values of which were compared with the results of in vivo experiments.

Key words: *molecular docking; thrombin; polysaccharides; barrier films*

Введение

При любом хирургическом вмешательстве происходит нарушение целостности тканей организма. В процессах их восстановления активное участие принимает тромбин. Тромбин – это сериновая протеаза, относящаяся к ферментам типа гидролаз. Его главная функция – инициирование образования фибрина. Однако при больших концентрациях тромбина одновременно с заживлением происходит процесс спайкообразования [1]. В данном процессе тромбин вызывает образование фибрина из фибриногена внутри кровеносных сосудов, после чего отложения фибрина на травмированной области создают матрицу для образования спаек.

Несмотря на многочисленные попытки решить проблему спаек, до настоящего времени ни один подход к решению проблемы не позволил получить полностью удовлетворяющий всем требованиям конечный результат [2]. Кроме того, подавляющее большинство проведенных в мире исследований эффективности действия барьерных материалов для предупреждения спаек не соответствуют требованиям доказательной медицины, а также выполнены на основе субъективных оценок без статистических расчетов и содержат ошибки интерпретации, поэтому уровень их доказательности следует признать крайне низким.

На данный момент в качестве наиболее эффективного средства, позволяющего снизить вероятность спаек в большинстве клинических случаев, рассматриваются средства местного применения, создающие механический барьер между соприкасающимися поверхностями тканей. Они могут быть выполнены в виде гелей или пленок на основе полисахаридов, подвергающихся деградации в тканях организма [3].

На данный момент остается неизученным взаимодействие различных полисахаридов с тромбином, поэтому исследования в этой области могут дать необходимую информацию, которая позволит оценить эффективность действия полисахаридов, как компонентов барьерных материалов, на связывание тромбина и, соответственно, снижение вероятности образования фибрина и последующее развитие спаечного процесса.

Одним из методов первичной оценки и визуализации и является молекулярный докинг, который позволяет предсказать наиболее энергетически выгодную конформацию и ориентацию молекулы-лиганда по отношению к белку, т.е. оценить степень их комплементарности при образовании комплекса лиганд-белок [4].

Данный метод позволяет визуализировать различные взаимодействия между молекулами и белками и прогнозировать возможность взаимодействия различных биологически активных субстанций с эндогенными белками и другими компонентами биологических жидкостей организма.

Материалы и методы

Применением метода молекулярного докинга был произведен прогноз и оценка биологической активности различных олигомеров трех разной длины для трех веществ, входящих в состав барьерных пленок, показавших результаты в экспериментах *in vivo* [5]. Структуры мономеров данных соединений приведены на рисунке 1.

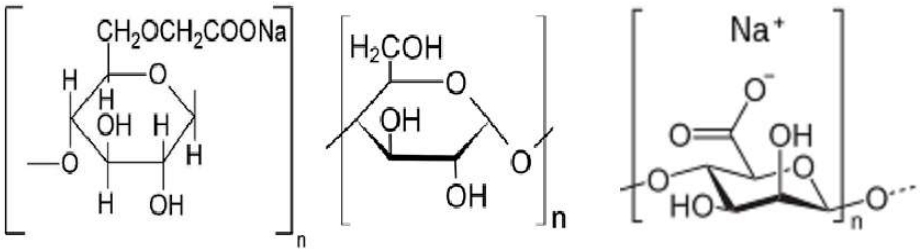


Рисунок 1 – Мономеры лигандов: КЦМ-Na, крахмал, АН

В качестве мишени для молекулярного докинга была выбрана модель молекулы человеческого тромбина, полученная методом рентгеноструктурного анализа (рис. 2) [6].

Рисунок 2 –Макромолекула человеческого тромбина

Для определения сайта связывания был проведен предварительный слепой докинг. К молекуле рецептора в соответствии с валентностями были добавлены атомы водорода только для полярных атомов. Частичные заряды на атомах были вычислены методом Гастейгера.

Трехмерная модель молекулы лиганда, оптимизация геометрии и вычисление частичных зарядов атомов осуществлялись с использованием функционала

пакета программ Marvin. С использованием программы Autodock Vina (The Scripts Research Institute, США) был осуществлен гибкий молекулярный докинг.

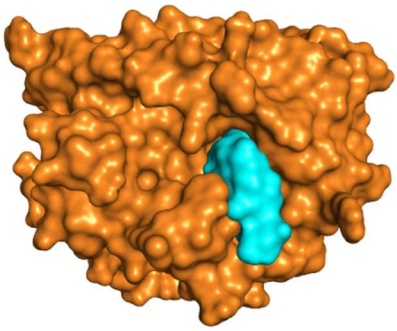


Рисунок 3 – Комплекс тромбин-АН

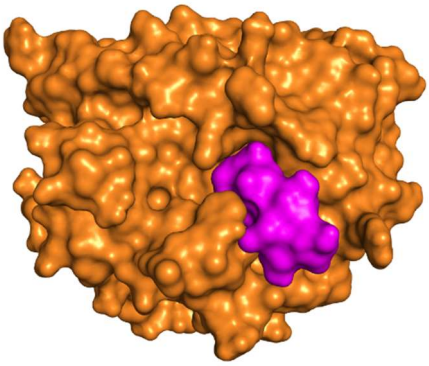


Рисунок 4 – Комплекс тромбин-КМЦ

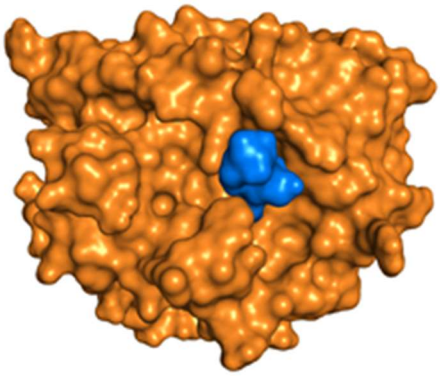


Рисунок 5 – Комплекс тромбин-АН

Результаты

После проведения слепого докинга был определен сайт связывания, подходящий для каждой из молекул лиганда, после чего в результате проведенного докинга было получено 300 конформаций для каждого комплекса белок-лиганд, а также относительные энергии связывания лиганда с рецептором.

Визуальное отображение самых устойчивых полученных комплексов для каждого типа лигандов показано на рисунках 3-5.

Полученные данные об относительных энергиях связывания для каждого из олигомеров (таблица 1). была проанализирована и сопоставлена с результатами противоспаечных испытаний барьерных пленок in vivo (рис. 6), проведенных ранее.

Таблица 1 – Энергии связывания лиганд-рецептор, ккал/моль

Кол-во звеньев \ в-во	АН	Крахмал	КМЦ
Мономер	5,7	6,2	6,3
Димер	7,0	6,0	6,0
Тример	7,5	6,6	**7,5**
Тетрамер	**7,9**	**7,2**	5,8
Пентамер	7,6	6,8	6,4

В результатах наблюдается увеличение энергии связывания с увеличением размера цепи олигомеров, что связано с увеличением количества функциональных групп на одну единицу полимера, однако после достижения размеров тетрамера (для КМЦ - тримера) начинается ощутимый спад энергии, что связано с слишком большим размером, который не позволяет молекуле полноценно поместиться в нужный сайт тромбина. Несмотря на то, что крахмал показывает результат, сравнимый с результатами КМЦ, его использование как компонента барьерных пленок не представляется рациональным, в связи с его способностью провоцировать образования перетонита в области своего нахождения.

Из всех рассмотренных макромолекул у АН энергии связывания лиганд-рецептор преобладают, что может говорить о его более сильных антикоагулянтных свойствах в сравнении с другими веществами, что коррелирует с результатами эксперимента *in vivo*, в котором, с увеличением количества АН в составе уменьшается степень спайкообразования.

Рисунок 6 – Зависимость степени спайкообразования в зависимости от применяемого барьерного материала

Список литературы

1. The Effect of Tranexamic Acid in Fibrin Sealant on Adhesion Formation in the Rat / D. Wiseman [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater. – 2004. – Vol. 68, № 2 – P. 222-230.

2. Battling adhesions: from understanding to prevention / H. Capella-Monsonís [et al.] // BMC Biomed. Eng. – 2019. – Vol. 1, № 1 – P. 1-12.

3. Seprafilm adhesion barrier: (1) a review of preclinical, animal, and human investigational studies / M.P. Diamond [et al.] // Gynecol. Surg. 2012 93. – 2012. – Vol. 9, № 3 – P. 237-245.

4. Identification of potential inhibitors of coronavirus SARS-CoV-2 using the methods of virtual screening and molecular modeling / A.M. Andrianov [et al.] // Dokl. Natl. Acad. Sci. Belarus. – 2020. – Vol. 64, № 3 – P. 308-316.

5. Konikova Anastasya, Prosmytskay Yuliya, Lappo, Daniil, Savitskaya Tatsiana, Hynshpan Dzmitry / Biodegradable Polysaccharides Composite Barrier Films for Surgical Adhesion Prevention / The Fourth Chinese-Belarusian Youth Forum 2021. Intelligence, Environment and Health: The Youth's Responsibility, Missions and Duties in the Global-Pandemic Era [Electronic resource] Forum's materials. Hanzhow, 6–7 November 2021. Zhejiang Shuren University: Hanzhow: ZSU, 2021. – P.19–20.

6. Rational design and characterization of D-Phe-Pro-D-Arg-derived direct thrombin inhibitors / A.C. Figueiredo [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ТОНИЗИРУЮЩИХ НАПИТКОВ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА ИСХОДЯ ИЗ СОДЕРЖАНИЯ В НИХ АЛКАЛОИДОВ ПУРИНОВОГО РЯДА

Лапчук Анастасия Алексеевна
студентка, Белорусский Государственный Медицинский Университет, Минск
naseklapchuk08@mail.ru
Бондарец Ольга Александровна
Ассистент кафедры общей химии, Белорусский государственный медицинский университет, Минск
bondarecolga2@gmail.com

Чай и кофе – самые распространенные тонизирующие напитки, которые активизируют работу центральной нервной системы. В последнее время чрезмерное употребление кофе и чая связывается учеными с повышенным риском развития кардиоваскулярных заболеваний. Поэтому целью данной работы было определить содержание кофеина в таких тонизирующих напитках, как кофе и чай, а также произвести их сравнительную характеристику и определить степень влияния на организм человека. В ходе работы были использованы методы фильтрации, экстракции и отгонки. Как показал эксперимент, массовая доля кофеина в зеленом чае находилась на уровне 2,58-2,80%, как и было заявлено производителем. Для черного чая и кофе величина данного параметра была равна 2,30-2,35%, в то время как процент содержания кофеина в черном чае соответствует заявленному, производитель кофе указывает на упаковке процент содержания кофеина менее 1,5%, что отличается от экспериментально полученных данных примерно на 0,8%.

Ключевые слова. *алкалоиды пуринового ряда, тонизирующее действие, кофеин.*

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TONIC DRINKS ON THE HUMAN BODY BASED ON THE CONTENT OF PURINE ALKALOIDS IN THEM

Lapchuk Anastasia Alekseevna
student, Belarusian State Medical University, Minsk
naseklapchuk08@mail.ru
Bondaretc Olga Aleksandrovna
Assistant Professor, Belarusian State Medical University, Minsk
bondarecolga2@gmail.com

Tea and coffee are the most common tonic drinks that activate the central nervous system. Recently, excessive consumption of coffee and tea has been associated by scientists with an increased risk of developing cardiovascular diseases. Therefore, the purpose of this work was to determine the caffeine content in such tonic drinks as coffee and tea, as well as to make their comparative characteristics and determine the

degree of influence on the human body. In the course of the work, filtration, extraction and distillation methods were used. As the experiment showed, the mass fraction of caffeine in green tea was at the level of 2.58-2.80%, as stated by the manufacturer. For black tea and coffee, the value of this parameter was equal to 2.30-2.35%, while the percentage of caffeine content in black tea corresponds to the stated, the coffee manufacturer indicates on the packaging the percentage of caffeine content less than 1.5%, which differs from the experimentally obtained data by about 0.8%.

Key words*: purine alkaloids, tonic effect, caffeine.*

Чай и кофе являются одними из самых распространенных типов тонизирующих напитков – продуктов питания, призванных активизировать работу центральной нервной системы (ЦНС). Однако, ни для кого не секрет, что в последнее время чрезмерное употребление кофе и чая связывается учеными с повышенным риском развития кардиоваскулярных заболеваний.

В данной работе мы хотели найти причину такого неоднозначного отношения к тонизирующим напиткам типа чая и кофе.

Целью данной работы было определить содержание кофеина в таких тонизирующих напитках, как кофе и чай, а также произвести их сравнительную характеристику и определить степень влияния на организм человека.

Для достижения цели мы поставили следующие задачи:

1. Поиск и анализ литературных данных о химическом составе чайного и кофейного сырья.

2. Анализ литературных данных по основным биологически активным веществам, определяющих тонизирующее действие чая и кофе; определение их влияния на организм человека.

3. Экспериментальное определение количества биологически активных веществ, определяющих тонизирующее действие чая и кофе, методом твердофазной экстракции в разных типах чая и кофе.

Эксперимент был проведён на базе химического факультета БГУ. Материалами послужили образцы чая и кофе, аналитические весы, ступка, вода, гидроксид бария, марлевый фильтр, химический стакан, плитка, хлороформ, делительная воронка, кальковая бумага, безводный сульфат натрия, ротационный испаритель.

Для определения количества кофеина в чае и кофе был выбран метод, аналогичный ранее использовавшейся в промышленности методике для извлечения кофеина из растительного сырья. В качестве объектов для анализа было выбрано три вида чая – чай зеленый байховый с ароматизаторами Tess Flirt, чай зеленый байховый китайский Gun Powder, чай черный байховый кенийский Greenfield Kenyan Sunrise, а также кофе Intenso Bold Rost (арабика).

Образцы чая и кофе массой 10-12 граммов были взвешены на аналитических весах (Рисунок 1), результаты занесены в таблицу 1.

Таблица 1 – Массы исходных навесок образцов

№ п/п	Образец		Масса навески, г
1	чай	Tess Flirt	11,6063
2		Gun Powder	10,4693
3		Greenfield Kenyan Sunrise	12,0995
4	кофе	Intenso Bold Roast	11,3946

1 2 3 4

Рисунок 1 – Взвешивание образцов для анализа.

Образцы чая и кофе заваривали в 1 литре воды в течение часа поддерживая активное кипение воды (Рисунок 2). В горячий раствор добавляли около 15-20 г гидроксида бария. Добавление гидроксидов щелочноземельных металлов необходимо для удаления примесей дубильных веществ, в частности танина. После добавления гидроксида бария наблюдали выпадение коричневого хлопьеобразного осадка. Раствор фильтровали на марлевом фильтре (Рисунок 3).

Рисунок 2 – Заваривание

Рисунок 3 – Фильтрование полученного в результате заваривания

Рисунок 4 – Экстракция в хлороформ

Для экстракции (рисунок 4) был взят хлороформ в объемном отношении 1:1 с водной фазой. Результаты взвешиваний (рисунок 5) отражены в таблице 2.

1 **2** **3** **4**

Рисунок 5 – Результаты взвешивания полученного кофеина образцов 1–4

Таблица 2 – Результаты эксперимента

№ п/п	Образец		Масса навески, г	Масса полученного кофеина, г	Массовая доля кофеина в образце, %
1	чай	Tess Flirt	11,6063	0,2994	2,580
2		Gun Powder	10,4693	0,2880	2,751
3		Greenfield Kenyan Sunrise	12,0995	0,2848	2,353
4	кофе	Intenso Bold Roast	11,3946	0,2620	2,300

Образцы зеленого чая Gun Powder и Tess Flirt характеризуются наибольшей массовой долей кофеина в сырье. Хотя чай Tess Flirt и является чаем с ароматизаторами, вероятно, массовая доля ароматизатора в чайном листе слишком мала, а процесс ароматизации является достаточно щадящим, так как массовая доля кофеина в ароматизированном зеленом чае Tess Flirt практически не отличается от таковой для неароматизированного зеленого чая Gun Powder. В тоже время, черный чай Greenfield Kenyan Sunrise и кофе Intenso Bold Roast содержат сравнимое количество кофеина, что также находится в полном соответствии со справочными данными.

Таким образом можно заключить, что, ввиду большего содержания кофеина, зеленый чай должен обладать большей тонизирующей способностью. Следует также отметить, что зеленый чай в процессе производства меньше подвержен ферментации и сохраняет больше полезных веществ полифенольной природы [6]. Однако необходимо учесть, что кофеин не является единственным биологически активным компонентом чая и кофе. Таким образом, для полного описания тонизирующего, антиоксидантного и иных вариантов воздействия чая и кофе на организм человека необходимо провести идентификацию и количественный анализ других биологически активных соединений в составе данных напитков.

На основании полученных данных были сделаны следующие выводы: в результате анализа было показано, что тонизирующее действие данных напитков обусловлено высоким содержанием таких пуриновых алкалоидов, как кофеин, теофиллин и теобромин [1]; в результате работы было выявлено влияние на организм человека биологически активных веществ, содержащихся в исследуемых тонизирующих напитках; было определено содержание кофеина в образцах чая и кофе путем экстракции кофеина из соответствующего сырья. Как показал эксперимент, массовая доля кофеина в зеленом чае находилась на уровне 2,58-2,80%, как и было заявлено производителем. Для черного чая и кофе величина данного параметра была равна 2,30-2,35%, в то время как процент содержания кофеина в черном чае соответствует заявленному, производитель кофе указывает на упаковке процент содержания кофеина менее 1,5%, что

отличается от экспериментально полученных данных примерно на 0,8%. На основании полученных результатов был сделан вывод о большем тонизирующем действии зеленого чая по сравнению с черным чаем и кофе.

Список литературы

1. Биологически активные вещества растений: выделение, разделение, анализ / Г.Д. Бердимуратова – Алматы: Атамұра, 2006. – 438 с.

2. В.П. Захаров, Лекарственные вещества из растений и способы их производства / В.П. Захаров, Н.И. Либизов, Х.А. Асланов. – Ташкент: Фан, 1980. – 232 с.

3. Г.В. Столяров, Лекарственные психозы и психотомиметические средства / Г.В. Столяров: под ред. профессора В.М. Банщикова. – М.: Медицина, 1964. – 456 с.

4. Биологически активные вещества пищевых продуктов. Справочник / В.В. Петрушевский – К.: Урожай, 1992. – 192 с.

5. Д.А. Муравьева, Тропические и субтропические лекарственные растения / Д.А. Муравьева, А.Ф. Гаммерман – М.: Медицина, 1974. – 232 с.

6. М.Д. Машковский, Лекарственные средства / М.Д. Машковский – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.

СИНТЕЗ МОНОКРИСТАЛЛОВ БОРАТОВ ВАНАДИЯ И ХРОМА

Латушко Сергей Игоревич
младший научны сотрудник, ГО "НПЦ НАН Беларуси по материаловедению", Минск
latushkasi@gmail.com
Латушко Татьяна Викторовна
к.м.н., доцент, доцент, Белорусский государственный медицинский университет, Минск
smer444@mail.ru

Для монокристаллов бората ванадия и хрома установлены концентрационные диапазоны химического состава растворов-расплавов, пригодных для управляемого выращивания монокристаллов. Определена оптимальная концентрация кристаллообразующих компонент, скорости роста вдоль двух кристаллографических направлений и содержание примесного свинца в монокристаллах V_3BO_6 и Cr_3BO_6.

Ключевые слова: *монокристаллы бората ванадия, монокристаллы бората хрома, рост монокристаллов, условия роста.*

SYNTHESIS OF VANADIUM AND CHROMIUM BORATE SINGLE CRYSTALS

Latushka Siarhei Igorevich
junior researcher, Scientific-Practical Materials Research Centre of NAS of Belarus, Minsk
latushkasi@gmail.com
Latushka Tatsiana Viktorovna
C.M.Sc., associate professor, associate professor, associate professor, Belarusian State Medical University, Minsk
smer444@mail.ru

For vanadium and chromium borate single crystals, the concentration ranges of the chemical composition of melt solutions suitable for controlled growth of single crystals have been established. The optimal concentration of crystal-forming components, the growth rates along two crystallographic directions, and the content of impurity lead in V_3BO_6 and Cr_3BO_6 single crystals are determined.

Keywords: *vanadium borate single crystals, chromium borate single crystals, single crystal growth, growth conditions.*

Введение

В наше время исследования по монокристаллам V_3BO_6 и Cr_3BO_6, ограничены всего двумя имеющимися в мировых базах данных публикациями [1, 2], в которых установлена кристаллическая структура и обсуждаются возможности использования указанных соединений в качестве электродов

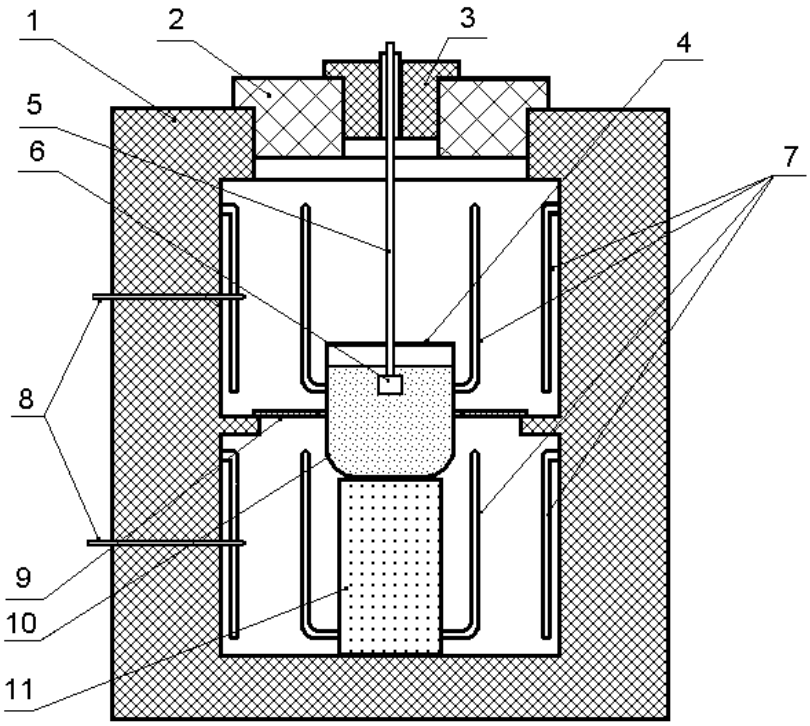
литий-ионных аккумуляторов. В отличие от бората железа [3, 4], который является скошенным антиферромагнетиком, в боратах ванадия и хрома магнетизм ожидается другого свойства. Бораты ванадия и хрома предоставляют редкую возможность сопоставления поведения изинговской и гейзенберговской магнитных подсистем в изоструктурных соединениях. В ионах трехвалентного ванадия и хрома eg орбитали пусты. Магнитоактивными являются две t2g орбитали в V^{3+} и три t2g орбитали в Cr^{3+}. В связанных по ребру октаэдров VO_6 или CrO_6 эти орбитали направлены друг на друга, что должно обеспечить умеренное антиферромагнитное взаимодействие. При учете только этих взаимодействий, магнитная подсистема боратов ванадия и хрома разбивается на слабосвязанные треугольники переходных металлов. Эта ситуация характерна для молекулярных магнетиков, где интерес могут представлять схемы распределения магнитных уровней и процессы релаксации намагниченности [5].

Эксперимент

Для получения монокристаллов V_3BO_6 и Cr_3BO_6 использовалась системы растворов расплавов V_3BO_6 и Cr_3BO_6 в системе растворов расплавов V_2O_3 (Cr_3O_4) – PbO – PbF_2 – B_2O_3 (данная система не проявляет агрессии к платиновой оснастке, а растворы-расплавы имеют низкую упругость пара при температурных условиях кристаллизации). Управляемое выращивание монокристаллов проводили последовательным наплавлением в тигель из платины исходных компонент с тщательным весовым контролем в вертикальной шахтной печи с параллельно соединенными хромит-лантановыми резистивными нагревателями (Рисунок 1).

Результаты

Образцы были получены в режиме гомогенизации раствора (V_2O_3 (Cr_3O_4) – PbO – PbF_2 – B_2O_3) при температуре насыщения 820 ℃ и спонтанной кристаллизации 710 ℃ зарождали отдельные затравочные кристаллики при температуре на 1 – 2 °C ниже последней. Затравочные кристаллы крепили на кристаллоносце из платины в экранах также из платины. Предварительно прогретый над расплавом кристаллоносец с небольшими (~ 1–2 мм на сторону) затравками опускали в перегретый на ~ 10 °C раствор, который затем охлаждали до температуры на 1,5 – 2 °C ниже температуры насыщения. Последующий температурный режим выбирали, исходя из количества затравок, массы расплава, концентрации кристаллообразующих компонент раствора и оптимальной скорости роста кристаллов, определенного состава. Средняя скорость роста кристаллов составляла три недели, после чего кристаллы поднимали над расплавом, а температуру в печи опускали до комнатной со скоростью порядка 30 – 40 °C/ч. Оптимальные составы и условия ростовых экспериментов для состава V_3BO_6, Cr_3BO_6 (Таблица 1).



1 – реакционная камера из огнеупорного материала; 2 – крышка; 3 – съемная заглушка; 4 – керамический тигель; 5 – керамический кристаллодержатель; 6 – монокристалл; 7 – канталовые термоэлементы; 8 – датчики температуры; 9 - тепловой экран; 10 – раствор-расплав; 11 – под из огнеупорного материала.
Рисунок 1 – Термоустановка для выращивания монокристаллов $RFeO_3$ методом переменного градиента температуры:

Таблица 1 – Диапазон химического состава растворов-расплавов, пригодных для управляемого выращивания ряда монокристаллов V_3BO_6 и Cr_3BO_6

Химический состав	V_3BO_6				Cr_3BO_6			
	V_2O_3	B_2O_3	PbF_2	PbO	Cr_3O_{43}	B_2O_3	PbF_2	PbO
Минимальная допустимая концентрация, $C_{мин}$ мол. %	14,5	24,3	4,3	37,0	14,1	24,9	6,0	34,3
Максимальная допустимая концентрация, $C_{макс}$ мол. %	27,0	26,0	10,0	56,9	17,0	30,9	17,8	55,0

Установлено, что при содержании в растворе компонент оксибората, превышающем $C_{макс}$ наблюдается уменьшение ширины метастабильной области ниже допустимого предела и растущие кристаллы имеют блочную структуру (параллельное сращивание), приводит к росту вязкости раствора-расплава настолько, что в результате уменьшения коэффициента диффузии происходит захват маточного раствора кристаллами, а также увеличивает смачиваемость платиновых поверхностей настолько, что может приводить к выползанию раствора-расплава из тигля и фатальной коррозии корундового держателя кристаллоносца. Уменьшение же концентрации этой компоненты до уровня ниже $C_{мин}$ приводит к понижению устойчивости раствора-расплава.

На основе диапазона минимальных и максимальных концентраций составов определены оптимальные скорости роста кристаллов вдоль основных кристаллографических направлений (Таблица 2).

Таблица 2 – Оптимальная концентрация кристаллообразующих компонент, скорости роста вдоль двух кристаллографических направлений и содержание примесного свинца в монокристаллах V_3BO_6 и Cr_3BO_6

Состав монокристалла	Концентрация R_3BO_6 в растворе-расплаве, мол. %	Концентрация примеси свинца в монокристалле, вес. %	Скорость роста вдоль кристаллографического направления (мм/сут.)	
			[001]	[110]
V_3BO_6	15,4	0,02	0,45	0,23
Cr_3BO_6	15,9	0,02	0,46	0,22

Выводы

Результаты роста монокристаллов бората ванадия и хрома, свидетельствуют о том, что вариант выбора типа печи и оснастки верны, определены $C_{мин}$ и $C_{макс}$ исходных компонентов, т.к. при превышении $C_{макс}$ происходит параллельное сращивание кристаллов и росту вязкости раствора-расплава, понижении ниже $C_{мин}$ приводит к понижению устойчивости раствора-расплава (Таблица 1). Оптимальные концентрации кристаллообразующих компонент в растворе-расплаве для V_3BO_6 = 15.4 мол. %, для Cr_3BO_6 = 15.9 мол. %.

Исследование выполнено при поддержке БРФФИ (проект № Ф21РМ-017).

Список литературы

1. E. Claude, Weak ferromagnetism and magnetoelectric coupling in bismuth ferrite / E. Claude, A. Nicola // Phys. Rev. B. – 2005. – V. 71. – P. 060401(R).

2. Evidence for the likely occurrence of magnetoferroelectricity in the simple perovskite $BiMnO_3$ / A. Moreira [et al] // Solid State Commun. – 2002. – V. 122. – P. 49.

3. A. Belik, Local distortions in multiferroic $BiMnO_3$ as a function of doping / A. Belik // Adv. Mater. – 2011. – V. 12 – P. 044610.

4. Magnetocapacitance effect in multiferroic $BiMnO_3$ / T. Kimura [et al] // Phys. Rev. B. – 2003. – V. 67 – P. 180401.

5. Structure Determination of Ferromagnetic Perovskite $BiMnO_3$ / T. Atou, [et al] // J. Solid State Chem. – 1999. – V. 145. – P. 639.

ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И СИМУЛЯЦИИ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ В ПРОЦЕССЕ ОБУЧЕНИЯ СТУДЕНТОВ НА КАФЕДРЕ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Лахвич Фёдор Фёдорович
к.х.н., доцент, доцент кафедры биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
lakhvichtt@gmail.com
Ринейская Ольга Николаевна
к.м.н., доцент, заведующий кафедрой биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
ryneiskaya@mail.ru

Обобщен опыт кафедры биоорганической химии использования в учебном процессе и организации научно-исследовательской работы студентов технологий молекулярного моделирования и симуляции свойств молекул.

Ключевые слова: *молекулярное моделирование; образовательные технологии; биоорганическая химия; органическая химия.*

MOLECULAR MODELING AND SIMULATION OF THE MOLECULA PROPERTIES S IN THE EDUCATIONAL PROCESS OF THE DEPARTMENT OF BIOORGANIC CHEMISTRY

Lakhvich Todar Todarovich
C.Ch.Sc., Associate Professor of Bioorganic Chemistry Department of Belarusian State Medical University, Minsk
lakhvichtt@gmail.com
Ryneiskaya Volha Mikolaevna
C.M.Sc., Head of Bioorganic Chemistry Department of Belarusian State Medical University, Minsk
ryneiskaya@mail.ru

The experience of the Department of Bioorganic Chemistry in the use of molecular modeling technologies and simulation of molecular properties in the educational process and organization of student research is reviewed.

Keywords: *molecular modeling; educational technologies; bioorganic chemistry; organic chemistry.*

В преподавании биоорганической химии студентам медицинских специальностей и органической химии для фармацевтического факультета в БГМУ используются современные компьютерные программы и онлайн-ресурсы для визуализации строения и симуляции свойств молекул. Занятия, посвященные изучению таких программ, включены в тематический план лабораторных занятий по дисциплине «Органическая химия» для студентов фармацевтического факультета. Основы работы в программном пакете

ChemOffice, который включает редакторы 2D- и 3D-визуализации, студенты изучают с самых первых занятий.

Учебный процесс в медицинских учебных учреждениях традиционно имеет практическую направленность [1] и включает только отдельные элементы исследовательских технологий. Тем не менее на протяжении последних лет на кафедре биоорганической химии БГМУ стали активно внедрятся методы молекулярного моделирования, с помощью которых студенты фармацевтического и медицинских факультетов выполняют свои первые научные проекты, в том числе курсовые и дипломные работы [2]. Показано, что подобная деятельность мотивирует студентов к изучению профессионально ориентированных тем, формирует профессиональные компетенции в области фармацевтической химии и молекулярной биологии [3,4]. Студентам предлагается ряд задач по поиску и оценке *in silico* биологической активности органических веществ как потенциальных лекарственных средств.

В рамках реализации новых образовательных стандартов методы молекулярного моделирования и экспериментов in silico внедрены в учебный процесс. Так, в программа дисциплины «Органическая химии» для студентов фармацевтического факультета предусматривает работу с программами молекулярного моделирования и симуляции в рамках большинства занятий.

В течение первых семи занятий студенты часть пятичасового занятия проводят в компьютерном классе, в котором установлены программы химической визуализации. Так, при изучении номенклатуры и классификации органических соединений (занятие 1) студенты учатся рисовать молекулы, используют возможности по взаимной трансформации структуры в название и наоборот. При изучении темы «Пространственное строение молекул» (занятие 3) студентам предлагается составить формулы стереоизомеров, рассмотреть изменения в строении, которые возникают при использовании отдельных операций редактора («Flip vertical», «Flip horizontal», «Rotate», др.), проверить правильность выбора и определения конфигурации стереоцентров, трансформировать структуры из 2D-формата (ChemDraw) в 3D-формат (Chem3D) и визуализировать конформационные переходы в рамках функции минимизации энергии. При изучении темы «Реакционная способность органических соединений (занятие 4) будущие провизоры осваивают навыки составления схем реакций с использованием различных графических инструментов. При изучении темы «Спектральные методы установления строения и идентификации соединений» студентам предлагается оценить некоторые физические и физико-химические свойства веществ, в частности спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C. Завершает первый раздел новая для курса органической химии тема «Основы молекулярного дизайна и моделирования *in silico* органических соединений», при изучении которой студенты всё занятие проводят в компьютерном классе. При изучении данной темы формируются

навыки конвертации форматов с двухмерными и трёхмерными визуализациями (*.cdx, *.c3d, *.c3xml и др.) в специальные форматы (*.pdb, *.mol и др.), которые используются в исследованиях по симуляции аффинности малых молекул к биологическим мишеням. Студенты также проводят эксперимент по предсказанию биологической активности соединений в online-ресурсе PASS (http://www.way2drug.com/passonline), преподаватель демонстрирует возможности программы для проведения молекулярного докинга AutoDock на примере online-ресурса Dockingserver (https://www.dockingserver.com/web); при этом студенты в симуляционной и частично игровой форме повторяют фундаментальные понятия и концепции (химическая связь и слабые взаимодействия, свободная энергия Гиббса и энергия связывания, и др.). Преподаватель показывает области и пределы использования, преимущества и ограничения программ. В результате уже на стадии изучения вводного раздела дисциплины «Органическая химия» студенты фармацевтического факультета осваивают навыки, обеспечивающие реализацию не только базовых, но и специальных профессиональных компетенций. При этом занятия проходят в живой атмосфере с использованием технологий и элементов геймеризации учебного процесса.

Студенты, обучающиеся медицинским специальностям, пользуются программами химической визуализации, выполняя исследования в студенческом научном кружке. При этом моделирование и использование симуляционных технологий является одним из важнейших путей развития познавательных способностей студентов, активизирует умственную деятельность, играет огромную роль в формировании понятийного аппарата, а также развивает самостоятельность и инициативность в процессе обучения [1].

Молекулярный докинг и молекулярное моделирование являются ключевыми элементами внедрения современных образовательных технологий на кафедре биоорганической химии как в рамках основного учебного процесса, так и при проведении студенческих научных исследований. Решение поставленных задач включает анализ информации, полученной из периодических изданий, баз данных использующихся лекарственных средств. Protein Data Bank позволяет выбрать и получить в необходимом формате возможные мишени – ферменты, регуляторные белки, которые могут связываться с потенциальным лигандом. Далее проводится молекулярный дизайн новых веществ-кандидатов при помощи ChemOffice с последующей конвертацией в формат, который используется в молекулярном докинге (например, с помощью конвертера форматов OpenBabelGUI).

Моделирование при помощи различных средств визуализации, таких как онлайн-серверы Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP; https://proteins.plus), Protein-Plus; https://proteins.plus, программа PyMol и др. – важный элемент преподавания и самостоятельной работы студентов. Структура «малых»

молекул, взаимодействие биополимеров с которыми изучается *in silico* как элемент рациональных научно-исследовательских и образовательных технологий (рациональный драг-дизайн), может быть загружена как из баз данных, так и смоделирована с помощью графических редакторов, например, программного пакета ChemOffice.

Для проведения докинга в рамках научных исследований на кафедре используют AutoDock4 и DockingServer. В случае, если центр связывания неизвестен, сначала проводится «слепой» докинг с большим числом (50-100) пробегов, при котором захватывается молекула белка полностью. Полученный в результате такого исследования отчет позволяет выявить возможные центры связывания, обнаружить наиболее вероятный из них, рассмотреть все варианты стыковки лиганда и протеина. Онлайн ресурсы 3D- (PLIP) и 2D-визуализации (Protein-Plus), программный ресурс Pymol дают возможность проанализировать взаимодействия между лигандом и рецептором, оценить вклад гидрофобных и стекинг взаимодействий, водородных, галогеновых и ионных связей. На основании расчета изменения энергии Гиббса полученных комплексов можно определить наиболее предпочтительный из них. Далее, как правило, проводится докинг с модифицированными структурами лигандов в выявленной активном центре (ограниченный докинг) для выявления молекулы-лидера.

Проведение научно-исследовательской работы в совместных группах с участием преподавателей и студентов способствует социальной интеграции, формированию новых профессиональных и адаптивных компетенций у всех участников проекта [4]. Выполняя подобные проекты, студенты чувствуют себя членами единой команды, в которой происходит обмен компетенциями, профессиональным и жизненным опытом.

Таким образом, использование современных симуляционных технологий, в частности, молекулярных редакторов для дизайна и моделирования структур, а также для проведения молекулярного докинга является важной составляющей формирования компетенций будущего врача и провизора.

Список литературы

1. M. Amgad, Medical student research: an integrated mixed-methods systematic review and meta-analysis. / M. Amgad, M. Tsui // PLoS – 2015. 10 (6), e0127470.

2. Ф.Ф. Лахвич, О.Н. Ринейская, Использование элементов исследовательской технологии рационального драг-дизайна в процессе обучения студентов фармацевтических специальностей//Сборник научных трудов 2-й Всероссийской конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» / - Санкт-Петербург, - 2021. – С. 296-301.

3. T. Lakhvich, Beautylity of chemistry visualization: Whether useful can be aesthetic. // PEC, 2010. - 19, 46-50.

4. T. Lakhvich, Student research: acquiring knowledge about the nature and process of science // JBSE, 2017. - 16 (6), p. 832-835.

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

Литвинова Татьяна Михайловна
д.м.н., профессор кафедры онкологии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
doctor.litvinova@gmail.com
Церковский Дмитрий Александрович
к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории фотодинамической терапии и гипертермии с группой химиотерапии Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», г. Минск
tzerkovsky@mail.ru
Мазуренко Александр Николаевич
врач-онколог блока централизованного разведения цитостатиков Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», г. Минск
malenik@yandex.ru
Демидова Светлана Анатольевна
заведующий химиотерапевтическим отделением №2 Учреждения здравоохранения «Минский городской клинический онкологический центр», г. Минск
doctor.litvinova@gmail.com

Цель исследования: изучение влияния внутривенного лазерного облучения крови (ВЛОК) на противоопухолевую эффективность полихимиотерапии (ПХТ) перевивных опухолей в эксперименте in vivo. Объектом исследования были 30 белых нелинейных крыс с лимфосаркомой Плисса. В качестве химиотерапевтических лекарственных средств (ЛС) использовались доксорубицин (5 мг/кг), гемцитабин (50 мг/кг) и доцетаксел (7,5 мг/кг). Сеансы ВЛОК проводили через 24 ч после внутрибрюшного введения ЛС с мощностью излучения 1,5-2 мВт при λ=670±2 нм. Оценивался характер изменения динамики роста перевивных опухолей, частота полных регрессий опухолей и показатели выживаемости. Наиболее эффективными были схемы ПХТ «Гемцитабин + доцетаксел» и «Гемцитабин + доксорубицин» при их комбинации с ВЛОК. Их применение приводило к более выраженному торможению роста опухолей, оптимизации показателей частоты полных регрессий опухолей и выживаемости по сравнению с полихимиотерапией в монорежиме.

Ключевые слова: *внутривенное лазерное облучение крови; полихимиотерапия; крысы; лимфосаркома Плисса.*

INFLUENCE OF INTRAVENOUS LASER THERAPY ON THE ANTI-TUMOR EFFECTIVENESS OF POLYCHEMOTHERAPY IN THE IN VIVO EXPERIMENT

Litvinova Tatyana Mikhailovna,
Dr.M.Sc., professor of the Department of oncology, Educational Establishment «Belarusian State Medical University», Minsk
doctor.litvinova@gmail.com
Tzerkovsky Dmitry Alexandrovich,
C.M.Sc. leading researcher of laboratory of photodynamic therapy and hyperthermia with chemotherapy groups, N.N. Alexandrov National Cancer of Belarus, Minsk
tzerkovsky@mail.ru
Mazurenko Alexandr Nikolaevich,
oncologist of the block of centralized dilution of cytostatics N.N. Alexandrov National Cancer of Belarus, Minsk
malenik@yandex.ru
Demidova Svetlana Anatolievna,
head of chemotherapy department № 2, Health Institution «Minsk City Clinical Cancer Center», Minsk
doctor.litvinova@gmail.com

The aim of the study: to explore the effect of intravenous laser blood irradiation (ILBI) on the antitumor efficacy of polychemotherapy (PCT) of transplanted tumors in an in vivo experiment. The object of the study were 30 white non-linear rats with Pliss lymphosarcoma. Doxorubicin (5 mg/kg), gemcitabine (50 mg/kg), and docetaxel (7.5 mg/kg) were used as chemotherapeutic drugs. ILBI sessions were performed 24 hours after intra-abdominal administration of drugs with a radiation power of 1.5-2 mW at λ=670±2 nm. The nature of changes in the growth dynamics of transplanted tumors, the frequency of complete regressions of tumors and survival rates were assessed. The most effective were the PCT schemes «Gemcitabine + docetaxel» and «Gemcitabine + doxorubicin» when combined with ILBI. Their use led to a more pronounced inhibition of tumor growth, optimization of rates of complete tumor regression and survival compared with polychemotherapy in mono mode.

Key words: *intravenous laser blood irradiation; polychemotherapy; rats; Pliss lymphosarcoma.*

Материалы и методы

Лабораторные животные. Экспериментальное исследование выполнено на 30 белых нелинейных крысах обоих полов (далее – крысы) с массой тела от 150 до 300 г в возрасте 2,5–3 мес. (виварий РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова). Длительность карантина перед включением в эксперимент составляла 14 суток. Крысы содержались при 12-часовом режиме освещения, температуре 20–22°С,

влажности 50–60% в индивидуальных клетках по 6 особей в каждой со стандартным пищевым и питьевым рационом и доступом к ним ad libitum. Показатели влажности, температуры, освещенности в помещении соответствовали действующим санитарным нормам по устройству, оборудованию и содержанию виварием [1].

Опухолевый штамм. В качестве первого опухолевого штамма использовали лимфосаркому Плисса (ЛСП) (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация) [2].

Опухолевая модель. Опухолевую модель у крыс создавали путем подкожного пассивирования in vivo. Перевивка опухолей включала введение под кожу левой паховой области 0,5 мл взвеси опухолевых клеток в растворе Хенкса. ЛСП относится к числу быстрорастущих опухолей с коротким латентным периодом, в среднем, составляющем, 5–7 суток. В связи с чем, крыс с ЛСП включали в эксперимент на 6-е сутки после перевивки по достижению диаметра опухолевого узла, в среднем, 3–5 мм.

Этические аспекты. Экспериментальные исследования были реализованы в соответствии с международным законодательством и действующими в Республике Беларусь нормативными правовыми актами по проведению экспериментальных исследований с лабораторными животными (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, Франция, от 18.03.1986 г.) с изменениями в соответствии с положениями Протокола (СЕД № 170 от 02.12.2005 г.); Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (от 22.09.2010 г.); ТПК 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденный постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008 г.). Выполнение исследования одобрено Комитетом по этике РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова (выписка из протокола № 173).

Полихимиотерапия. В качестве химиотерапевтических лекарственных средств (ЛС) использовали инъекционные формы лиофилизированных порошков: доксорубицин (ДОКС; доза – 5 мг/кг), гемцитабин (ГЕМ; доза – 50 мг/кг) и доцетаксел (ДОЦ; доза – 7,5 мг/кг) (РУП «Белмедпрепараты», г. Минск, Республика Беларусь). ЛС в виде раствора вводилось на 6-е сутки после перевивки опухоли ЛСП однократно, внутрибрюшинно, в указанных дозах.

Сеанс внутривенно лазерного облучения крови. Внутривенное лазерное облучение крови (ВЛОК) проводили с помощью аппарата лазерного терапевтического «Люзар-МП» («Люзар», Беларусь, λ=670±2 нм) с мощностью излучения 1,5-2 мВт и длительностью сеанса 10 мин. Воздействие осуществляли через 24 ч после введения комбинаций ЛС.

Дизайн экспериментального исследования. Все крысы случайным образом были распределены на 5 групп по 6 особей в каждой, а именно: ГЕМ + ДОКС; ГЕМ + ДОКС + ВЛОК; ГЕМ + ДОЦ; ГЕМ + ДОЦ + ВЛОК. В качестве контроля были крысы-опухоленосители, которым не вводились ЛС и не осуществлялись сеансы ВЛОК (интактный контроль, ИК).

Критерии оценки противоопухолевой эффективности. Оценку противоопухолевой эффективности воздействий осуществляли по общепринятым в экспериментальной онкологии показателям, характеризующим динамику изменения среднего объема опухолей ($V_{ср.}$, в $см^3$), коэффициента абсолютного прироста опухоли (К) и коэффициента торможения роста опухолей (ТРО). Динамику роста опухолей регистрировали, начиная с 6-х суток после перевивки опухолевого штамма ЛСП в течение 2-х недель с интервалом 2–3 суток.

Объем опухолей вычисляли по формуле Шрека:

$$V=1/6\pi\times d_1\times d_2\times d_3, \quad (1)$$

где $d_{1,2,3}$ – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли (в см); $\pi/6 = 0{,}52$ – постоянная величина; V – объем опухоли (в $см^3$).

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (К, в ОЕ) рассчитывали по формуле:

$$K=(V_t - V_0)/V_0, \quad (2)$$

где: V_0 – исходный объем опухоли (до начала воздействий); V_t – объем опухоли на определенный срок наблюдения.

Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, в %) рассчитывали по формуле:

$$ТРО=(V_{контроль} - V_{опыт})/V_{контроль} \times 100\%, \quad (3)$$

где: $V_{контроль}$ – средний объем опухоли в контрольной группе (в $см^3$); $V_{опыт}$ – средний объем опухоли в основной группе (в $см^3$). Минимально значимый критерий ТРО, демонстрирующий эффективность терапии перевивных опухолей, считался при ТРО > 50%.

Частота полных регрессий (ПР) оценивалась через 60 суток после окончания воздействий при отсутствии визуальных и пальпаторных признаков опухолевого роста и рассчитывалась по формуле: частота ПР=(число крыс без признаков опухолевого роста/общее число крыс в группе) × 100%.

Оценка противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни проводилась по окончании опыта и гибели всех крыс. Определяется средняя продолжительность жизни (СПЖ, сутки) в группах и вычисляются показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %) по формуле:

$$УПЖ = (СПЖ_{опыт} - СПЖ_{контроль})/СПЖ_{контроль} \times 100\%, \quad (4)$$

где: УПЖ – показатель увеличения продолжительности жизни крыс (в %); $СПЖ_{опыт}$ – средняя продолжительность жизни крыс в опытных группах (в сут.);

СПЖ*контроль* – средняя продолжительность жизни крыс в контрольной группе (в сут.).

Статистическая обработка полученных данных. Статистическая обработка экспериментальных данных и графическое представление результатов планируется проводить с помощью пакетов прикладных программ Excel, Origin Pro (версия 7.0) и Statistica (версия 10.0). Данные представляли, как M±m (среднее значение ± ошибка среднего значения). Для оценки достоверности различий использовали U критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты исследования

Перевивка суспензии опухолевых клеток ЛСП в растворе Хенкса осуществлялась путем ее подкожного введения в левую паховую область в объеме 0,5 мл. Латентный период, в среднем, варьировал от 3 до 5 суток. Перевиваемость опухолей составила 100%.

Итоговая информация, характеризующая как непосредственные, так и отдаленные результаты, представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Комплексная оценка результатов эксперимента

Параметры воздействий	Критерии эффективности						p vs. ИК
	$V_{ср.}$, $см^3$	ТРО, %	p vs. ИК	ПР, %	СПЖ, сутки	УПЖ, %	
ИК	47,68±3,58	–	–	0,0	19,33±0,67	–	–
ГЕМ 50 мг/кг + ДОЦ 7,5 мг/кг	1,57±1,48	96,71	0,00000	16,7	49,80±6,25	157,63	0,00032
ГЕМ 50 мг/кг + ДОЦ 7,5 мг/кг + ВЛОК	0,56±0,38	98,83	0,00000	16,7	35,60±6,75	84,17	0,032

Таблица 2 – Комплексная оценка результатов эксперимента

Параметры воздействий	Критерии эффективности						p vs. ИК
	$V_{ср.}$, $см^3$	ТРО, %	p vs. ИК	ПР, %	СПЖ, сутки	УПЖ, %	
ИК	47,68±3,58	–	–	0,0	19,33±0,67	–	–
ДОКС 5 мг/кг + ГЕМ 50 мг/кг	3,11±2,42	93,48	0,00000	16,7	25,60±5,33	32,44	0,26
ДОКС 5 мг/кг + ГЕМ 50 мг/кг + ВЛОК	0,33±0,21	99,31	0,00000	33,3	24,50±4,57	26,75	0,28

Заключение

1. Экспериментальное исследование было выполнено на достаточной по количеству наблюдений выборке крыс, а именно, на 30 белых нелинейных крысах обоих полов с перевивной опухолью ЛСП.

2. Осуществление сеансов ВЛОК через 24 ч после внутрибрюшного введения химиотерапевтических ЛС по схеме ГЕМ 50 мг/кг + ДОЦ 7,5 мг/кг позволяло статистически не значимо по сравнению с ПХТ без ВЛОК тормозить рост перевивных опухолей, уменьшая на 17-е сутки эксперимента $V_{ср}$. опухолей в 2,80 раза: с 1,57±1,48 $см^3$ до 0,56±0,38 $см^3$, а также увеличивая коэффициент ТРО на 2,12%: с 96,71% до 98,83% (p=0,52). При оценке показателей выживаемости павших крыс (СПЖ, УПЖ) по сравнению с группой ИК положительный эффект достигнут в группе «ГЕМ 50 мг/кг + ДОЦ 7,5 мг/кг» (СПЖ = 49,80±6,25 сут., УПЖ = 157,63%; p=0,00032), в сравнении же с группой химиотерапии без ВЛОК отмечена обратная тенденция (p=0,14). При оценке частоты ПР, зарегистрированных в группах через 60 суток после начала экспериментов, получены идентичные данные (16,7% и 16,7%; соответственно).

3. Осуществление сеансов ВЛОК через 24 ч после внутрибрюшного введения химиотерапевтических ЛС по схеме ГЕМ 50 мг/кг + ДОКС 5 мг/кг позволяло статистически не значимо по сравнению с химиотерапией без ВЛОК тормозить рост перевивных опухолей, уменьшая на 17-е сутки эксперимента $V_{ср}$. в 9,42 раза: с 3,11±2,42 $см^3$ до 0,33±0,21 $см^3$, а также увеличивая коэффициент ТРО на 5,83%: с 93,48% до 99,31% (p=0,27; p=0,00000 – в сравнении с группой ИК). При оценке показателей выживаемости павших крыс (СПЖ, УПЖ) оптимальный показатель по сравнению с группой ИК достигнут в группе «ДОКС 5 мг/кг + ГЕМ 50 мг/кг + ВЛОК» (СПЖ = 25,60±5,33 сут., УПЖ = 32,44%; p=0,26), в сравнении же с группой химиотерапии без ВЛОК отмечены идентичные результаты (p>0,05). При оценке частоты ПР, зарегистрированных в группах через 60 суток после начала экспериментов, отмечено увеличения частоты ПР в группе с ВЛОК в 2 раза (16,7% и 33,3%; соответственно).

Список литературы

1. Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», Постановление от 31.10.2006 г. № 131, г. Минск, Республика Беларусь.

2. Лимфосаркома Плисса [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.bionco.ru/methods/exp_chemotherapy/strains/char_strains/LSP/. – Дата доступа: 30.08.2022.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЛИГОПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ C3A КОМПОНЕНТА СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Макаревич Денис Александрович
ведущий научный сотрудник ГНУ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г.Минск
demkarevich@yandex.ru
Бруякин Сергей Дмитриевич
младший научный сотрудник ГНУ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г.Минск
bruyakin.sergey@gmail.com

Цель исследования – молекулярный докинг олигопептидов, являющихся аналогами центра связывания рецептора C3aR, с компонентом комплемента C3a и определение максимально энергетически выгодного комплекса.

Материалы и методы. С использованием программных продуктов UCSF Chimera 1.15rc и AutoDock Vina 1.1.2. проводили виртуальный докинг олигопептидов, сконструированных на основе последовательности рецептора C3aR.

Установлены аминокислотные последовательности трипептидов, аналогов рецептора C3aR потенциально способных к образованию максимально энергетически выгодных комплексов с C3a компонентом комплемента.

Ключевые слова: *олигопептиды, система комплемента, молекулярный докинг, свободная энергия связывания*

MOLECULAR DOCKING AND EFFICIENCY EVALUATION OLIGOPEPTIDE LIGANDS FOR BINDING THE C3A COMPONENT OF THE COMPLEMENT SYSTEM

Makarevich Denis Alexandrovich
Leading Researcher of the Research Department of the Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk
demkarevich@yandex.ru
Bruyakin Sergey Dmitrievich
Junior Researcher, State Scientific Institution Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
bruyakin.sergey@gmail.com

The purpose of the study was molecular docking of oligopeptides, which are analogues of the C3aR receptor binding site, with the C3a complement component and determination of the most energetically favorable complex.

Materials and methods. Using software products UCSF Chimera 1.15rc and AutoDock Vina 1.1.2. virtual docking of oligopeptides designed on the basis of the C3aR receptor sequence was performed.

The amino acid sequences of tripeptides, analogs of the C3aR receptor, potentially capable of forming the most energetically favorable complexes with the C3a component of the complement, have been established.

Keywords: *oligopeptides, complement system, molecular docking, binding free energy*

Введение. Субкомпонент комплемента С3а - низкомолекулярный полипептид, активный компонент системы комплемента. Образуется при активации системы комплемента, при чрезмерном накоплении способен вызывать развитие патологических процессов [1]. Он играет важную роль в реализации неспецифической защиты организма, опосредует процессы опсонизации, хемотаксиса, фагоцитоза, цитолиза [2,3]. С3а относится к главным анафилотоксинам, его высокие концентрации обнаруживаются при атеросклерозе, ревматоидном артрите, нефритt, нейродегенеративных расстройствах и др. [4,5]. Накопление продуктов активации системы комплемента, в частности С3а компонента, отмечается во время проведения экстракорпоральных методов детоксикации (диализ, гемосорбция, искусственное кровообращение) с помощью автоматизированных систем [6, 7]. Основными клиническими признаками высокой концентрации анафилотоксинов в крови являются падение артериального давления, гиперемия кожных покровов, жар, затрудненное дыхание, повышение частоты сердечных сокращений.

Применение отечественных гемосорбентов также часто сопровождается развитием псевдоаллергических реакций из-за накопления продуктов активации системы комплемента при их применении. Для решения данной проблемы с целью повышения безопасности применения отечественных гемосорбентов необходима разработка лигандов, способных связывать, тем самым инактивировать анафилотоксины. В качестве таких лигандов могут быть использованы олигопептиды (3-5 аминокислот). Так они обладают достаточной специфичностью взаимодействия и не иммуногенны [8].

Целью работы являлся молекулярный докинг олигопептидов, являющихся аналогами центра связывания рецептора С3aR, с компонентом комплемента С3а и определение максимально энергетически выгодного комплекса.

Материалы и методы. Для разработки олигопептидов, способных специфически связываться с С3а использовали аминокислотную последовательность активного центра рецептора С3aR, участвующего в связывании компонента С3а. Участки аминокислотной последовательности, используемые для построения олигопептидов представлены на рисунке 1: {1M---25Y}; {77F---100S}; 162-183 {162I---183E}; 309-322 {309E---322Q} [1].

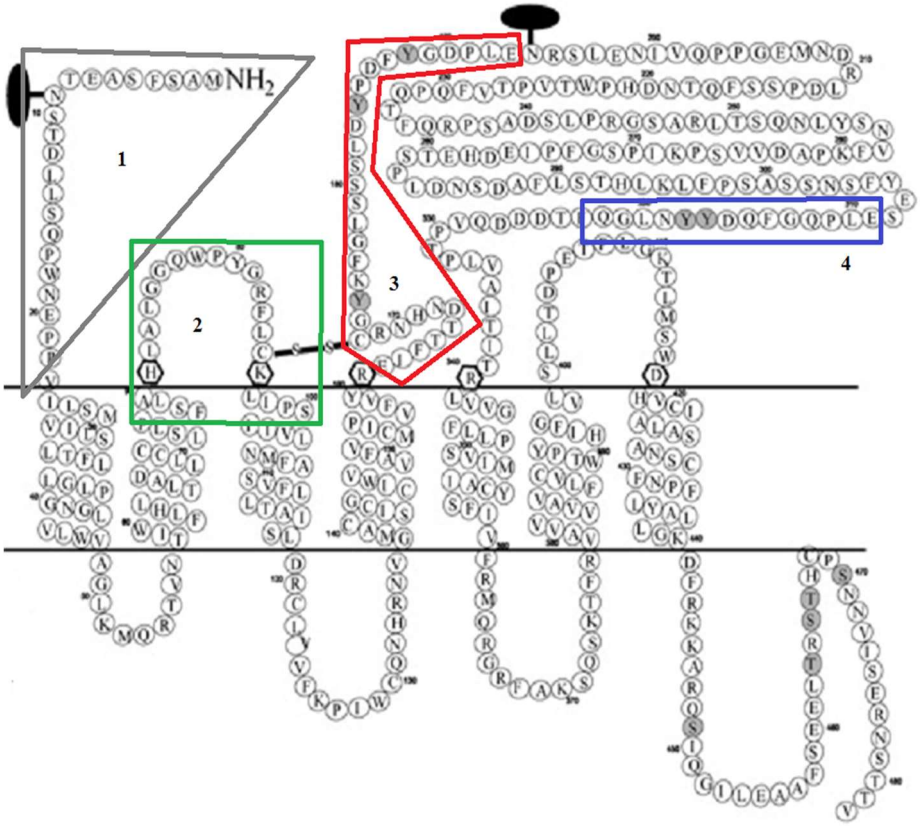


Рисунок 1 – Трансмембранный рецептор C3aR: Выделенные области (1,2,3,4 – вероятные участки связывания C3a)

Путем последовательного деления выделенных аминокислотных последовательностей на трипептиды, сконструировали 87 олигопептидов. Оценку энергетической эффективности комплексов проводили методом молекулярного докинга в UCSF Chimera 1.15rc с использованием AutoDock Vina 1.1.2. Рецептором являлась молекула C3a компонента комплемента (pdb-файл 4HW5), лигандом - сконструированный олигопептид. Для каждого олигопептида было получено 10 наилучших (наиболее энергетически выгодных) вариантов связывания. Результаты представляли в виде медианного, максимального значения и интерквартильного размаха (25% - 75%).

Результаты исследования. В ходе исследований проведен скрининг связывания молекулы C3a с 88 олигопептидами. Медиана модуля свободной энергии по всем пептидам составила |5,6 (5,1;5,7)| ккал/моль.

Участок 1 представляет собой N-концевой участок рецептора, состоящий из 25 аминокислот (рисунок 1). Данный участок был разделен на 25 трипептидов. Образование комплекса трипептида Pro-Trp-Asn с C3a является наиболее энергетически выгодным, модуль энергии связывания составляет |7,20| ккал/моль (таблица 1). Наименьшим модулем энергии связывания характеризуется взаимодействие трипептида Met-Ala-Ser с C3a - |4,7| ккал/моль.

На основании аминокислотной последовательности участка 2, который является экстрацеллюлярной петлей между вторым и третьим трансмембранными доменами сконструировали и проанализировали связывание 22 трипептидов. Наиболее высокие модули энергии установлены для связывания С3а с Gly-Gln-Trp и Trp-Pro-Tyr, которые составили |7,50| ккал/моль и |7,20| ккал/моль соответственно. Наименьшая эффективность связывания была для комплекса С3а с Cys-Lys-Leu - |4,70| ккал/моль.

Таблица 1 – Пептиды, образующие максимально энергетически выгодные комплексы с молекулой С3а

Олигопептид	Участок расположения	Максимальная |ккал/моль|	Медиана |ккал/моль|	25-75% |ккал/моль|
Pro-Trp-Asn	1	7,20	6,75	6,50-6,98
Gly-Gln-Trp	2	7,50	7,10	7,00; 7,20
Trp-Pro-Tyr	2	7,20	6,88	6,73; 7,08
Tyr-Lys-Phe	3	7,10	6,62	6,40; 6,88
Asp-Phe-Tyr	3	7,20	6,69	6,65; 6,70
Phe-Tyr-Gly	3	7,10	6,70	6,50; 6,90
Asp-Tyr-Tyr	4	7,20	6,60	6,35; 6,60
Tyr-Tyr-Asn	4	7,40	6,97	6,93; 7,00

Из третьего участка, состоящего из 31 аминокислотного остатка, составили и проанализировали 29 трипептидов. Максимальный модуль энергии связывания (|7,20| ккал/моль) характеризует связывание С3а с Asp-Phe-Tyr. Минимальная эффективность взаимодействия описывает комплекс С3а с Arg-Cys-Gly (|4,70| ккал/моль).

Исследование свободной энергии образования комплексов С3а с 12 трипептидами, построенными по аминокислотной последовательности четвертого участка рецептора показало, что трипептид **Tyr-Tyr-Asn** связывается с С3а с максимальным модулем энергии (|7,40| ккал/моль), а трипептид Leu-Pro-Gln – с минимальным модулем энергии (|5,30| ккал/моль) (таблица 1).

Перспективными для дальнейшего химического синтеза и исследования считали олигопептиды, модуль свободной энергии связывания которых с С3а, был выше |7,0| ккал/моль (таблица 1).

Результаты молекулярного докинга позволили установить локализацию взаимодействия трипептидов с С3а (рисунок 2). Согласно полученному изображению, сайт связывания трипептида с С3а совпадает с местом, в котором

происходит отщепления молекулы C3a от молекулы C3 при активации системы комплемента.

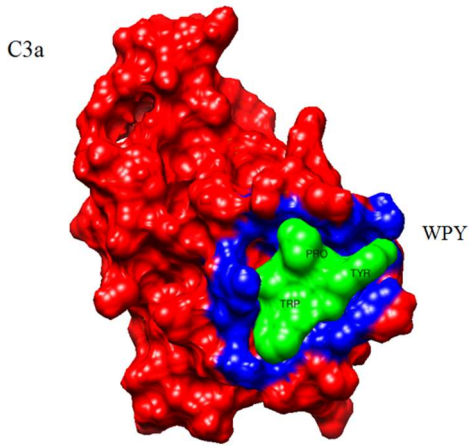


Рисунок 2 – Пример комплекса анафилотоксина C3a и пептида Trp-Pro-Tyr (Синим цветом выделен сайт взаимодействия (17 аминокислотных остатков <5Å)

Заключение. В результате исследований in silico определили аминокислотную последовательность трипептидов, являющихся аналогами рецептора C3aR и потенциально способные к образованию максимально энергетически выгодных комплексов с C3a компонентом комплемента. В дальнейшем они могут быть синтезированы и проанализирована их эффективность связывания с C3a in vitro.

Список литературы

1. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors / A. Klos [et al.] // Pharmacol. Rev. –2013. – Vol.65, N1. – P. 500–543.

2. Potential link between C3a, C3b and endothelial progenitor cells in resistant hypertension / E. Magen [et al.] // Am. J. Med. Sci. – 2010. – Vol. 339, N5. – P. 415–419.

3. Distinct roles for C3a and C5a in complement-induced tubulointerstitial injury / L. Bao [et al.] // Kidney int. – 2011. – Vol.80, N5. – P.524–534.

4. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis / M. Hashimoto [et al.] // J. Exp. Med. – 2010. – Vol. 207. N6. – P.1135–1143.

5. J.D. King, Extracorporeal Removal of Poisons and Toxins / J.D. King, M.H. Kern, B.G. Jaar // Clinical journal of the american society of nephrology. – 2019. – Vol. 14. – P. 1–8.

6. Extracorporeal membrane oxygenation: a literature review / R.C.F. Chaves [et al.] // Rev. Bras. Ter. Intensiva. – 2019. – Vol.31, N3. – P.410–424.

7. Role of the second extracellular loop of human C3a receptor in agonist binding and receptor function. / T.N. Chao [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N14. – P.9721–9728.

8. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. / V. Apostolopoulos [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, N2. – P. 1-45.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОРБЦИИ БИЛИРУБИНА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ УГЛЕРОДА В СРАВНЕНИИ С НЕПОКРЫТЫМ УГОЛЬНЫМ СОРБЕНТОМ

Макаревич Денис Александрович
ведущий научный сотрудник научно-исследовательской части Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г.Минск
demkarevich@yandex.ru
Рябцева Татьяна Владимировна
ассистент кафедры биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г.Минск
ta-yana@yandex.ru
Ковганко Николай Николаевич
доцент кафедры биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г.Минск
mikalai44@tut.by
Штемплюк Роман Георгиевич
Научный сотрудник научно-производственного закрытого акционерного общества «Синта», г.Минск
sinta92@yandex.by

Цель исследования – сравнительная оценка адсорбции билирубина из плазмы крови иммобилизованными наночастицами углерода и непокрытым угольным сорбентом.

Материалы и методы. Исследовали четыре образца наноалмазов детонационного синтеза: УДА-СП (тип ζ+) (НА-1), УДА-ГО-СП (НА-2), УДА-ЧОШ (НА-4). Иммобилизацию наночастиц углерода в полиакриламидный гель проводили на стадии полимеризации. Эффективность адсорбции оценивали по изменению концентрации билирубина в плазме крови после прохождения объема сорбента.

Показано, что наночастицы углерода, иммобилизованные в полиакриламидный гель, обладают более высокой адсорбционной активностью (на единицу площади поверхности) по отношению к билирубину, чем непокрытый угольный сорбент. Наибольшая эффективность отмечается у наночастиц типа УДА-СП (тип ζ+).

Ключевые слова: *полиакриламидный гель; сорбция; билирубин; наноуглерод.*

EFFICIENCY OF SORPTION OF BILIRUBIN FROM BLOOD PLASMA BY IMMOBILIZED CARBON NANOPARTICLES IN COMPARISON WITH UNCOATED CARBON SORBENT

Makarevich Denis Alexandrovich
Leading Researcher of the Research Department of the Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk
demkarevich@yandex.ru
Ryabtseva Tatyana Vladimirovna
Assistant of the Department of Biological Chemistry, Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk
ta-yana@yandex.ru
Kauhanka Nikolai Nikolaevich
Associate Professor of the Department of Biological Chemistry, Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk
mikalai44@tut.by
Shtemplyuk Roman Georgievich
Researcher at Scientific and Production Closed Joint Stock Company Sinta, Minsk
sinta92@yandex.by

The purpose of the study is a comparative assessment of the adsorption of bilirubin from blood plasma by immobilized carbon nanoparticles and uncoated carbon sorbent.

Materials and methods. Four samples of detonation nanodiamonds were studied: UDD-SP (type ζ+) (NA-1), UDD-GO-SP (NA-2), and UDD-CHOSH (NA-4). Immobilization of carbon nanoparticles in a polyacrylamide gel was carried out at the stage of polymerization. The efficiency of adsorption was assessed by the change in the concentration of bilirubin in the blood plasma after passing through the volume of the sorbent.

It has been shown that carbon nanoparticles immobilized in a polyacrylamide gel have a higher adsorption activity (per unit surface area) with respect to bilirubin than uncoated carbon sorbent. The highest efficiency is noted for nanoparticles of the UDD-SP type (type ζ+).

Keywords: *polyacrylamide gel; sorption; bilirubin; nanocarbon.*

Введение. Наноразмерные детонационные алмазы (нДА), получаемые с использованием взрывчатых веществ в изолированном объеме [1,2], представляют собой уникальный тип алмазных материалов. От алмазов, полученных другими методами, нДА отличаются тем, что представляют собой типичный наноматериал со средним размером зерен примерно 4 нм, характеризующихся преимущественно сферической формой. Отличительной морфологической особенностью нДА являются кубическая, редко октаэдрическая форма, часто организованная из составных беспорядочно ориентированных кубических блоков. Доля поверхностных атомов составляет около 15%, в отличие от фуллеренов, все атомы которых являются поверхностными. В зависимости от метода химической очистки на поверхности

нДА выделяют различные органические функциональные группы (CO_2H, CO_2R, CH_x, C-N, C=N, C-O-O, OH, CO, C_6H_x), которые наделяют частицы уникальными физико-химическими свойствами по сравнению с другими углеродными материалами [3-5].

Основными преимуществами наноалмазов по сравнению с фуллеренами, графеном и нанотрубками являются низкая токсичность и высокая биодоступность, сопряженная с большой удельной поверхностью [6,7]. В следствии этого нДА обладают высокой адсорбционной способностью, кроме того, имеют большое количество свободных электронов на поверхности (множественный радикал-донор), нанометрические размеры, химически инертны и имеют гидрофильный характер поверхности [4].

Парентеральное введение стерильных золей наноалмазов разным представителям класса млекопитающих в условиях эксперимента не приводило к гибели животных [8]. Подкожное, внутримышечное и внутривенное введение золей, содержащих наноалмазы, не активирует иммунную систему и не сопровождается разрушением мембран клеток крови [9].

Возможность химической модификации поверхностных активных групп (гидроксильных, карбоксильных, амидных позволяют применять нДА в качестве лекарственных веществ и биосенсоров. Основное применение нДА находят в современной медицине при доставке лекарственных средств в клетки (в том числе опухолевые), антибактериальной терапии, клеточной фототерапии, синтезе имплантов [10].

Исследования, проведенные в ИСМ НАН Украины по изучению адсорбционных свойств микропорошков синтетических алмазов различных зернистостей и различной модификации поверхности, показали, что нДА являются селективными адсорбентами компонентов биологических сред. Так, например, модифицированные группами CO_2H, CO_2R, C-O-O, OH, CO алмазы селективно связывают альбумины и глобулины плазмы крови. Группы CH_x, C-N, C=N, C_6H_x на поверхности придают наноалмазным сорбентам способность адсорбировать ионы тяжелых металлов (железо, никель, кобальт) [5].

Применяемые в медицине активированные угли (СКТ-6А, БАУ, ВНИИТУ-1, Карбон) имеют ряд недостатков: низкое качество углеродных гранул с высоким содержанием минеральных примесей (золы), шероховатый рельеф поверхности, низкая адсорбционная активность к азотсодержащим токсическим продуктам белков и нуклеиновых кислот, накапливающихся в организме при различных заболеваниях, в частности, билирубину, креатинину и мочевине. Поэтому использование нДА в качестве альтернативы активированных угольных частиц для удаления билирубина является перспективным направлением при разработке новых гемосорбентов.

Цель данного исследования – сравнительная оценка адсорбции билирубина из плазмы крови иммобилизованными наночастицами углерода и непокрытым угольным сорбентом.

Материалы и методы. Исследовали образцы наноалмазов детонационного синтеза: УДА-СП (тип ζ+) (НА-1), УДА-ГО-СП (НА-2), УДА-ЧОШ (НА-4) (ЗАО «Синта», РБ) и непокрытый угольный гемосорбент «Гемосбел-К» Фармавит. Иммобилизацию наночастиц углерода в полиакриламидный гель проводили на стадии полимеризации. Гель (100 мл), содержащий наночастицы углерода (500 мг) и угольный сорбент (50 г) помещали в колонку, которую заполняли плазмой крови (200 мл).

Эффективность адсорбции оценивали по изменению концентрации билирубина в плазме крови после прохождения объема сорбента. Концентрацию билирубина исследовали с использованием набора реактивов («Витал», РФ) для количественного фотометрического определения методом Ендрашика-Грофа. Образцы плазмы крови с повышенным содержанием билирубина были получены в отделении экстракорпоральных методов лечения ГУ «МНПЦ ХТ и Г», Минск.

Сравнение показателей сорбции проводили с учетом удельной площади поверхности и массы сорбента в гемосорбционной колонке. Удельная площадь поверхности непокрытых угольных частиц «Гемосбел-К» составляла 1000 $м^2/г$, наноразмерных частиц углерода - 300 $м^2/г$. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 10.0. Значения представляли в виде Me (25;75) Для сравнения групп данных использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p \leq 0,05$.

Результаты. Исследование концентрации общего билирубина в ходе экспериментов с иммобилизованными наноалмазами показало снижение концентрации общего билирубина после контакта со всеми экспериментальными образцами. Образцы иммобилизованных НА-1 связали 25,75(22,65;39,91) мкмоль/л общего билирубина или на 1 $м^2$ удельной поверхности наночастиц - 0,17 (0,15;0,27) мкмоль/л. Для НА-2 образцов связывание общего билирубина составило 21,5 (18,25; 27,84) мкмоль/л или 0,14 (0,12;0,18) мкмоль/л на 1 $м^2$ удельной поверхности. Образцы иммобилизованных НА-4 в среднем связали 11,04 (8,62;11,92) мкмоль/л, это составляет 0,07 (0,06;0,08) мкмоль/л на 1 $м^2$ поверхности наночастиц (Таблица).

В образцах плазмы после контакта с полиакриламидным гелем без наночастиц снижение концентрации общего билирубина составило 1,4 (0,9;1,5) мкмоль/л. После контакта плазмы с непокрытым угольным гемосорбентом, изменение концентрации общего билирубина составило 62,7 (58,45; 70,34) мкмоль/л, что в перерасчете на $1м^2$ поверхности составляет 0,001 (0,001;0,001) мкмоль/л.

Таблица 1 – Эффективность адсорбции билирубина (мкмоль/мл/м^2) из плазмы крови с помощью наночастиц углерода и непокрытого угольного сорбента

Показатель	НА-1	НА-2	НА-4	Карбон	ПААГ
Общий билирубин,	0,17 (0,15;0,27)	0,14 (0,12;0,18)	0,07 (0,06;0,08)	0,001 (0,001;0,001)	0,001 (0,0009;0,0015)
Прямой билирубин,	0,06 (0,05;0,08)	0,01 (0,007;0,03)	0,05 (0,04;0,05)	0,0005 (0,0005;0,0006)	0,0005 (0,0004;0,0006)
Непрямой билирубин,	0,08 (0,08;0,09)	0,14 (0,12;0,15)	0,05 (0,04;0,06)	0,0007 (0,0006;0,0008)	0,0007 (0,0006;0,0008)

Доля связывания прямого и непрямого билирубина для образцов иммобилизованных наноалмазов различна, так НА-4 в равных долях связывали как прямой, так и непрямой билирубин. Что касается НА-1 то доля связывания непрямого билирубина на 22,3 (18,4; 25,7)% выше, чем прямого; для образцов НА-2 установлено снижение преимущественно непрямого билирубина 91,2 (88,3; 95,2)%, что обусловлено, по-видимому, с различной степенью окислительного разложения образцов наноалмазов, использованных в качестве лигандов. Для гемосорбента «Гемосбел» доля связывания непрямого билирубина была выше на 14,5 (10,7; 18,2)%.

Заключение. Согласно полученным результатам наночастицы углерода, иммобилизованные в полиакриламидный гель, обладают более высокой адсорбционной активностью (на единицу площади поверхности) по отношению к билирубину, чем непокрытый угольный сорбент. Наибольшая эффективность отмечается у наночастиц типа УДА-СП (тип ζ+).

Список литературы

1. В.В. Даниленко, Из истории открытия синтеза наноалмазов / В.В. Даниленко // Физика твердого тела. – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 581–584.

2. E. Osawa, «Superaromacity»/ E. Osawa, Kagaku (Kyoto) // Chem. Abs. – 1970. – Vol. 25. – P. 854–863.

3. Surface peculiarities of detonation nanodiamonds independence of fabrication and purification methods / D. Mitev [et al.] // Diam.Relat.Mater. – 2007. – Vol. 16. – P. 776–780.

4. Vapor deposition of diamond particles from methane / S. Matsumoto [et al.] // Jpn. J. Appl. Phys. 1982. – Vol. 21. – P.183–185.

5. G. P. Bogatyreva, 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.

6. Surface functionalization of detonation diamond suitable for biological applications / A. Krüger [et al.] // J. Mater. Chem. – 2006. – Vol. 16, N.24. – P. 2322–2328.

7. O. A. Shenderova, Carbon nanostructures / Shenderova, O. A., Zhirnov, V. V., & Brenner, D. W. // Critical reviews in solid state and materials sciences. – 2002. – Vol. 27, N. 3-4. – P. 227–356.

8. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity / Gharbi, N. [et al.] // Nano letters. – 2005. – Vol.5, N.12. – P. 2578–2585.

9. Nanodiamonds for medical applications: interaction with blood in vitro and in vivo / Tsai, L.-W. [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2016. – Vol. 17, N.7. – P. 1-17.

10. K. Turcheniuk, Biomedical applications of nanodiamond / K. Turcheniuk, V.N. Mochalin // Nanotechnology. – 2017. – Vol.28, N.25. – P. 1–28.

ВЫЯВЛЕНИЕ РЕАКЦИЙ АВТОНОМНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА ПРЕДЪЯВЛЕНИЕ ЗАПАХА И ВКУСА МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ДО И ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Матвеенко Ульяна Денисовна
Стажёр младшего научного сотрудника, БГУ, Минск
Arbuzovaola02@gmail.com

Цель: анализ реакций автономной нервной системы при предъявлении запаха и вкуса молочных продуктов, сравнение показателей здоровых людей с показателями испытуемых, утративших обоняние после перенесения коронавирусной инфекции. Метод исследования: электрокардиография. Результаты. Реакция автономной системы на запах однонаправленна и показатель общей вариабельности сердечного ритма SDNN возрастает у всех испытуемых, вне зависимости от индивидуальных особенностей автономной нервной системы. Установлено, что лица, субъективно не ощущающие запахов молочных продуктов после перенесения коронавирусной инфекции, демонстрируют реакцию автономной нервной системы, существенно не отличающуюся от реакции испытуемых, обладающих обонянием в полной мере. В ряде случаев зафиксировано усиление реакции на запах после утраты обоняния в сравнении с показателями до потери обонятельной функции.

Ключевые слова: *автономная нервная система, вариабельность сердечного ритма, обоняние, запах и вкус молочных продуктов, коронавирусная инфекция.*

DETECTION OF REACTIONS OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM TO THE PRESENTATION OF SMELL AND TASTE OF DAIRY PRODUCTS BEFORE AND AFTER CORONAVIRUS INFECTION

Matveyenko Ulyana Denisovna
Intern, junior researcher, Belarusian State University, Minsk
Arbuzovaola02@gmail.com

Purpose: to analyze the reactions of the autonomic nervous system upon presentation of the smell and taste of dairy products, to compare the indicators of healthy people with those of subjects who lost their sense of smell after suffering a coronavirus infection. Research method: electrocardiography. Results. The reaction of the autonomic system to the smell is unidirectional and the indicator of the overall heart rate variability SDNN increases in all subjects, regardless of the individual characteristics of the autonomic nervous system. It was found that persons who subjectively do not smell dairy products after undergoing a coronavirus infection demonstrate a reaction of the autonomic nervous system that does not differ significantly from the reaction of subjects who have a full sense of smell. In some cases, an increase in the reaction to the smell after the loss of sense of smell was recorded in comparison with the indicators before the loss of olfactory function.

Key words: *Autonomic nervous system, heart rate variability, smell, smell and taste of dairy products, coronavirus infection.*

Вкус и запах пищевых продуктов являются существенной компонентой стимулов для реализации функций аппетитивной поисковой системы человека. Анализ химического состава пищи до или во время ее непосредственного контакта с рецепторами ротовой полости может вовлекать лимбическую и все отделы автономной нервной системы. Сведений об этом в литературе недостаточно. [1]

Исследование осуществлялось методом электрокардиографии с помощью компьютеризованного полиграфического прибора «НС-Психотест» (Нейрософт, Российская Федерация). Перед выполнением эксперимента регистрировали фоновую активность нервной системы испытуемого в течении 5 минут. Затем в течении двух минут осуществляли воздействие на обонятельные рецепторы запахом того или иного продукта (топлёное молоко с жирностью 2,5% и творог с жирностью 5% производства ОАО «Минский молочный завод №1», сыр полутвёрдый «Брест-Литовск классический» с жирностью 45%, кефир марки «Савушкин продукт» с жирностью 2.5%). Данные продукты питания были выбраны в виду чёткого специфического вкуса и аромата. После этого осуществляли вкусовое воздействие без глотания продукта. Регистрация реакции на вкус творога не производилась. Далее следовала запись последействия длительностью в 5 минут. Результаты обработаны встроенной программой компьютера и статистически обработаны «STATISTICA 6.0».

В качестве показателя вариабельности сердечного ритма для анализа было выбрано изменение суммарного показателя вариабельности величин интервалов RR (SDNN) в последовательности фон – предъявление запаха – предъявление вкуса – последействие. Иными словами, был произведён анализ, как сильно изменился тот или иной показатель при предъявлении запаха по сравнению с фоновой записью, при предъявлении вкуса по сравнению с реакцией на запах и при возвращении к обычному состоянию по сравнению с реакцией на глотание. Таким образом, для каждой новой реакции предыдущая выступала в качестве фоновой, что позволяет оценить реакцию на один конкретный стимул, и избежать оценки суммации реакций на различные стимулы. Программное обеспечение комплекса «НС-Психотест» обеспечивало автоматическую обработку данных вариабельности ритма сердца, после чего производился статистический дисперсионный анализ данных в системе STATISTICA 6.0 с использованием непараметрического критерия Красела-Уоллиса, предназначенного для сравнения множественных малых выборок. [2]

В ходе эксперимента было проведено сравнение реакции испытуемой на запахи и вкусы молочных продуктов по изменению SDNN в процентах до и после перенесения коронавирусной инфекции. В октябре 2021 года испытуемая

перенесла коронавирусную инфекцию, после чего полностью утратила обоняние на полгода. Через 15 дней после болезни было проведено исследование субъективной оценки запаха молочных продуктов и анализ полученных данных вариабельности сердечного ритма. Испытуемая утверждала, что не чувствовала запахи предложенных продуктов, однако реакция автономной нервной системы была зафиксирована, что отражено в таблице 1:

Таблица 1 – Сравнение изменения SDNN в процентах до и после перенесения коронавирусной инфекции при предъявлении запахов и вкусов молочных продуктов

	До утраты обоняния 22.07.2021			**После утраты обоняния 22.10.2021**		
	Запах	**Вкус**	**После-действие**	**Запах**	**Вкус**	**После-действие**
Молоко	329	-32	-61	210	-10	-64
Сыр	88	-40	-11	200	-25	-61
Кефир	325	-21	-56	186	-5	-58
Творог	60	–	-56	200	–	-61

Из данной таблицы видно, что чёткая реакция автономной нервной системы на запах присутствует даже в том случае, если человек не чувствует запахов. В ряде случаев реакция после потери обоняния была более выраженной, чем когда испытуемая чувствовала запахи. Так, значение SDNN при предъявлении запаха сыра до болезни возросло на 88%, а после утраты обоняния – на 200% по сравнению с фоновой активностью автономной нервной системы до предъявления раздражителя. Значение SDNN при обонянии творога возросло на 60% и на 200% до утраты обоняния и после соответственно. Однако, в случае запаха молока и кефира замечено снижение интенсивности реагирования автономной нервной системы: SDNN возрастало на 329% до болезни и на 210% после – в случае молока, на 325% до болезни и на 186% после – в случае кефира.

Таблица 2 – Изменение SDNN в процентах при предъявлении запаха и вкуса молока

Тип испытуемых	**Ваготоники (n=3)**	**Нормотоники (n=4)**	**Симпатотоники (n=7)**	**p**
Запах	240 ± 164	235 ± 52	203 ± 92	0,721
Вкус	4 ± 31	-8 ± 31	-1 ± 52	0,902
Последействие	-62 ± 6	-60 ± 15	-56 ± 16	0,713

Таблица 3 – Изменение SDNN в процентах при предъявлении запаха и вкуса сыра

Тип испытуемых	**Ваготоники (n=3)**	**Нормотоники (n=4)**	**Симпатотоники (n=8)**	**p**
Запах	270 ± 85	221 ± 130	206 ± 150	0,404
Вкус	-31 ± 24	-27 ± 30	-15 ± 20	0,502
Последействие	-59 ± 10	-49 ± 4	-50 ± 18	0,297

Сравнение реакции лиц с разными типами реагирования нервной системы не выявило статистически значимых различий между реакцией ваготоников, нормотоников и симпатотоников на запахи и вкусы тех или иных молочных продуктов, что отражено в таблицах 2–3 и подтверждается значением критерия Краскела-Уоллиса ($p \geqslant 0,05$). Таким образом, данные таблиц 2-3 позволяют рассматривать всю генеральную совокупность здоровых испытуемых как подходящую для сравнения с совокупностью испытуемых, утративших обоняние, без выделения отдельных выборок лиц с преобладанием парасимпатических и симпатический регуляторных механизмов или со сбалансированным вкладом обоих отделов.

Таблица 4, в которой содержатся данные такого сравнения, отражает отсутствие статистически значимой разницы в реагировании автономной нервной системы на запах и вкус молока у лиц, утративших обоняние, и у здоровых лиц. Значения критерия Краскела-Уоллиса опровергли наличие таких различий.

Таблица 4 – Сравнение изменения SDNN в процентах при предъявлении запаха и вкуса молока у здоровых испытуемых, с испытуемыми, перенесшими коронавирусную инфекцию

Тип испытуемых	**Запах**	**Вкус**	**Последействие**
Не утратившие обоняние	213 ± 95,8	2 ± 40,3	-60 ± 13
Утратившие обоняние	252 ± 59,4	-31 ± 30,1	-51 ± 18,2
p	0,158	0,382	0,736

В таблице 5 содержатся аналогичные данные при обонянии запаха сыра и вкусовой стимуляции. Различий в реагировании здоровых лиц и испытуемых, утративших обоняние, не обнаружено, что подтверждается высокими значениями p-критерия.

Таким образом, установлено, что даже лица, субъективно не ощущающие запахов молочных продуктов после перенесения коронавирусной инфекции, демонстрируют реакцию автономной нервной системы, существенно не отличающуюся от реакции испытуемых, обладающих обонянием в полной мере.

Таблица 5 – Сравнение изменения SDNN в процентах при предъявлении запаха и вкуса сыра у здоровых испытуемых, с испытуемыми, перенесшими коронавирусную инфекцию

Тип испытуемых	**Запах**	**Вкус**	**Последействие**
Не утратившие обоняние	229 ± 139,3	-24 ± 23,0	-51 ± 15,4
Утратившие обоняние	205 ± 58,9	-2 ± 7,2	-64 ± 5,5
p	0,158	0,382	0,736

Список литературы

1. The evolution of taste and perinatal programming of taste preferences / Š. Podzimek [et al.] // Physiol Res. – 2018 – P. S421-S429.

2. Laborde, S. Heart rate variability and cardiac vagal tone in psychophysiological research – recommendations for experiment planning, Data Analysis, and Data Reporting / S. Laborde, E. Mosley, J.F. Thayer // Front. Psychol. – 2017. – T. 08.

ЭФФЕКТЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ МОНОПРОБИОТИКОВ В МОДЕЛИ ПЕНТИЛЕНТЕТРОЗОЛОВОГО ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗА

Мелик-Касумов Тигран Беглярович
к.б.н., заведующий лабораторией физиологии питания и спорта
Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск
tigranbmk@gmail.com
Жабинская Алеся Александровна
младший научный сотрудник Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск
lesiaalex26@gmail.com
Чуприна Алеся Вадимовна
младший научный сотрудник Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск
lesy-25.03.1995@tut.by
Колыхан Степан Александрович
младший научный сотрудник Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск
stehllek@gmail.com
Корнеева Марина Александровна
к.б.н., старший научный сотрудник
Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск
mari.derewianko@mail.ru

Цель настоящей работы – экспериментальная оценка противосудорожных и нейропротекторных свойств длительного применения монопробиотиков в модели эпилептогенеза на основе пентилентетразолового киндлинга у крыс.

За 2 недели до начала моделирования эпилептогенеза и далее животные получали ежедневно суспензию пробиотика Bifidobacterium longum BL-05 или Lactobacillus rhamnosus LR-32 в количестве 10^9 КОЕ. Контрольная группа получала аналогичный объем жидкости. Киндлинг осуществляли путем внутрибрюшинного введения пентилентетразола в подпороговой дозе 30 мг/кг три раза в неделю в течение 8 недель. Оценивали общее количество приступов и максимальный балл их интенсивности, а также гистоструктуру CA1 области гиппокампа.

Установлено, что применение монопробиотиков не оказывает влияния на нарастание судорожной активности в модели, однако при этом ослабляет нейродеструкцию в дорсальном гиппокампе.

Ключевые слова: *эпилептогенез; нейродеструкция; кишечная микробиота; бифидобактерии; лактобациллы.*

EFFECTS OF LONG TERM MONOPROBIOTICS CONSUMPTION IN THE MODEL OF PENTYLENETETRAZOLE KINDLING

Tigran Beglyrovich Melik-Kasumov
C.B.Sc., Head of the Laboratory of Nutrition and Sports Physiology
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
tigranbmk@gmail.com
Alesya Alexandrovna Zhabinskaya
junior researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
lesiaalex26@gmail.com
Alesya Vadimovna Chuprina
junior researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
lesy-25.03.1995@tut.by
Stepan Alexsandrovich Kolykhan
junior researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
stehllek@gmail.com
Marina Alexsandrovna Korneyeva
C.B.Sc., senior researcher
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
mari.derewianko@mail.ru

The aim of the study is to assess the anticonvulsant and neuroprotective effects of the long term monoprobiotics consumption in the rat model of pentylenetetrazole epileptogenesis.

Two weeks prior to the pentylenetetrazole kindling and further animals got a suspension of the probiotic Bifidobacterium longum BL-05 or Lactobacillus rhamnosus LR-32 (10^9 CFU). Control group got the same volume of fluid. Animals were kindled by intraperitoneal administration of pentylenetetrazole at a subthreshold dose of 30 mg/kg three times a week for 8 weeks. The total number of seizures and the maximum score of their intensity, as well as the morphology of the CA1 region of the hippocampus, were assessed.

It has been established that the use of monoprobiotics do not affect the growing seizure activity in the model, however, it weakens neurodestruction in the dorsal hippocampus.

Key words: *epileptogenesis; neurodestruction; gut microbiota; bifidobacteria; lactobacilli.*

Введение. Распространённость эпилепсии сохраняет актуальность исследований механизмов её патогенеза [1]. Кроме того, стабильно высокий процент не поддающихся консервативному лечению случаев эпилепсии многократно усиливает интерес к таким исследованиям. В последние годы, в частности, активно обсуждается роль питания и пищеварительной системы в

патогенезе различных видов нервно-психической патологии [2], включая эпилепсию [3]. Ключевое значение в этом направлении играют вопросы изучения роли кишечной микробиоты в патогенезе нервных расстройств [4]. В настоящее время формируется научный консенсус о том, что статус микробиоты кишечника может влиять на нервно-психические процессы и состояния в норме и при патологиях: аффект, когнитивные функции, тревожность, депрессивность и так далее. Микробный дисбиоз может коррелировать с предрасположенностью к припадкам при эпилепсии [5]. Установлено, например, что у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией увеличиваются показатели видового разнообразия микробиоты и отмечается увеличение содержания редких представителей [6]. При этом содержание бифидобактерий и лактобацилл коррелирует с частотой приступов.

В экспериментальных и клинических исследованиях эффективности нутритивной модификации кишечной микробиоты при эпилепсии часто используют смеси большого количества пробиотических бактерий и пребиотических нутриентов [7]. В данном контексте представляется актуальным оценить в экспериментальной модели эффективность применения монопробиотиков, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы. Исследование выполнено в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями комиссии по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси. Для моделирования эпилептогенеза у крыс использовали модель пентилентетразолового киндлинга, при котором животным в течение длительного времени несколько раз в неделю вводят подпороговые дозы конвульсанта пентилентетразола, что постепенно приводит к появлению и нарастанию судорожной активности.

В работе использовали монопробиотики *Bifidobacterium longum BL-05* и *Lactobacillus rhamnosus LR-32* (*CustomProbiotics*, США). Порошок пробиотических бактерий суспендировали в 1 мл натрий-фосфатного буфера (PBS, pH 7,4) и вводили внутрижелудочно с помощью металлического зонда в дозе 10^9 КОЕ/мл. Каждое животное получало 1 мл соответствующей суспензии или чистого PBS ежедневно независимо от возраста и массы тела. В течение первых двух недель животные получали только пробиотики или PBS. Далее моделировали эпилептогенез в течение еще 8 недель. Таким образом, было сформировано 4 группы: 1.) Здоровый контроль (K-PBS, n=8); 2.) Животные в модели эпилептогенеза эпилептогенеза, получавшие PBS (Epi-PBS, n=12); 3.) Животные в модели эпилептогенеза, получавшие *B. longum* (Epi-B, n=12); 4.) Животные в модели эпилептогенеза, получавшие *L. rhamnosus* (Epi-L, n=12).

Инъекции пентилентетразола (PTZ, Sigma США) в соответствующих экспериментальных группах производили внутрибрюшинно в дозе 30мг/кг три раза в неделю (понедельник, среда, пятница). Для корректировки индивидуальной дозы животных этих групп дополнительно взвешивали перед

каждым введением конвульсанта. PTZ растворяли в апирогенном 0,9% растворе NaCl в концентрации 15 мг/мл.

Перед введением PTZ животных рассаживали в индивидуальные прозрачные клетки размером 20x14x16 см. После инъекции в течение 30 минут проводилась одновременная видеорегистрация поведения 18 животных. Далее эксперимент повторялся для следующей партии из 18 животных. Животные разных групп были распределены по партиям одинаково.

Впоследствии по видеозаписи проводили оценку судорожной активности по бальной шкале Расина: 0.) Отсутствие судорог; 1.) Клонусы лицевых мышц; 2.) Усиление лицевого клонуса с переходом на шею с характерным миоклоническим вздрагиванием; 3.) Клонические сокращения обеих передних конечностей без подъема на задние лапы; 4.) Клонус передних конечностей с подъемом на задние лапы; 5.)Падение на бок с клоническими судорогами передних и/или задних лап и генерализацией приступа – 5 баллов; 6. Падение на бок с клоническими судорогами конечностей, переходящими в тонические судороги, или эпистатус, или смерть. Животное считали развившим киндлинг после троекратного повторения 5 или 6 баллов по шкале Расина, а также при достижении эпистатуса. В таком случае инъекции прекращали, а показатели такого животного оставляли до конца эксперимента неизменными в соответствии с последними зарегистрированными.

Через 2 дня после 24-го введения PTZ животных декапитировали, головной мозг быстро извлекали из черепа, разделяли на полушария и помещали на сутки в 10%-й раствор формалина. Далее готовили парафиновые фронтальные (левое полушарие) и горизонтальные (правое полушарие) срезы толщиной 5 мкм, окрашивали их тионином по Нисслю и определяли плотность нейронов в дорсальном и вентральном гиппокампе (область CA1) в программе ImageJ.

Статистическую обработку данных осуществляли в программах Microsoft Excel и Statistica. Для межгруппового сравнения в морфометрических исследованиях использовали критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна (данные представлены в виде медианы и квартилей (M(25%;75%)). В случае судорожной активности использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями с апостериорным критерием Тьюки (данные представлены в виде средней арифметической и её ошибки (M±m)). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. Анализ динамики судорожной активности заключался в расчете в группах среднего суммарного количества судорожных приступов (рисунок 1), а также среднего максимального балла по шкале Расина (рисунок 2) в ответ на каждое из двадцати четырех введений PTZ.

Длительное введение PTZ в дозе 30 мг/кг три раза в неделю в группе контроля (Epi-PBS) приводило к постепенному росту как количества судорог,

так и максимального балла их интенсивности по шкале Расина. Первый показатель к концу эксперимента составил в среднем 12,3±2,3 судорожных приступа за 30 минут после инъекции PTZ. Второй показатель составил 3,6±0,3 балла. Вместе с тем, в течение первых двух инъекций реакций на введение конвульсанта не наблюдалось ни у одного животного.

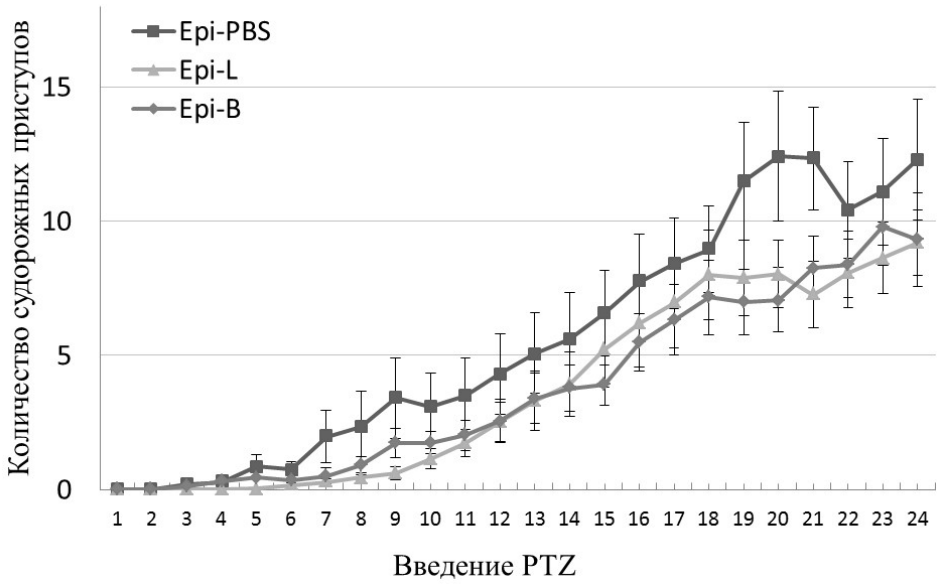


Рисунок 1 – Изменение среднего количества судорожных приступов в модели пентилентетразолового киндлинга в различных экспериментальных группах.

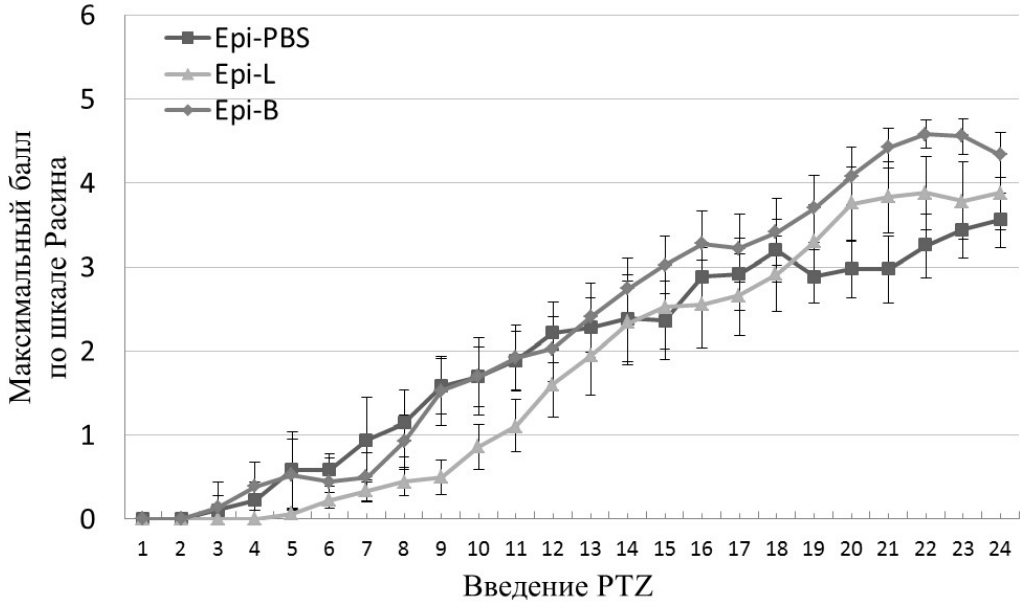


Рисунок 2 – Изменение среднего максимального балла по шкале Расина в модели пентилентетразолового киндлинга в различных экспериментальных группах.

Динамика киндлинга в случае применения монопробиотиков – как *B. longum,* так и *L. rhamnosus* – существенно не отличалась. Вместе с тем, в этих группах отмечались некоторые тенденции. С одной стороны, средние значения максимального балла судорожной активности были к концу эксперимента несколько выше контрольных значений. С другой стороны, в это же время средние значения количества приступов были меньше. Эти различия можно объяснить вариацией показателей в группах, получавших пробиотики: в среднем происходило уменьшение количества судорог, но увеличение их интенсивности. Тем не менее, важно подчеркнуть, что видимые отличия в динамике судорожной активности даже к концу эксперимента оставались незначимыми при выбранных статистических подходах.

Морфологический и морфометрический анализ гистоструктуры гиппокампа крыс различных экспериментальных оказался несколько более информативным. У здоровых животных (K-PBS) область *stratum pyramidale* CA1 гиппокампа была представлена компактными слоями (как правило 4-6) плотно расположенных нейронов. Нейроны имели пирамидальную форму со светлой цитоплазмой и крупным ядром, в котором хорошо визуализировалось ядрышко, реже два (рисунок 3).

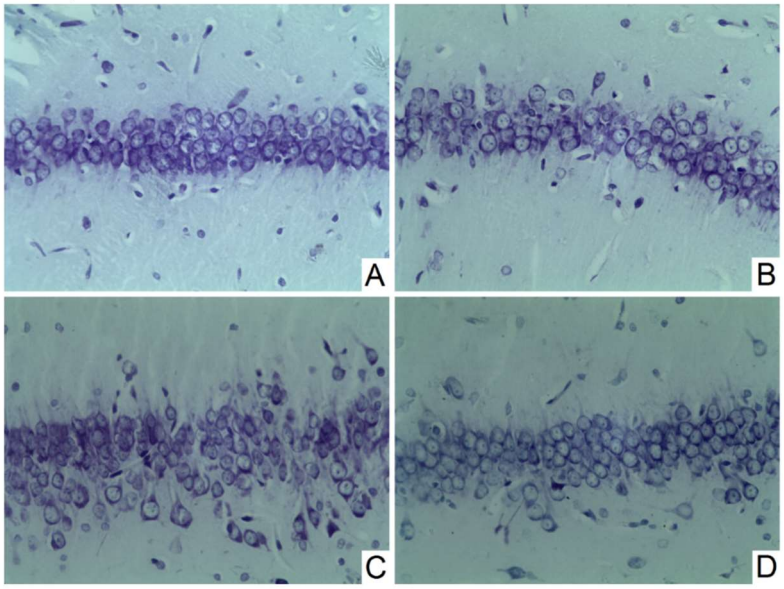


Рисунок 3 – Микрофотографии гистологических срезов CA1 области гиппокампа крыс. A – дорсальная область CA1 крысы из группы здорового контроля (K-PBS); B – дорсальная область CA1 крысы из группы Epi-PBS; C – вентральная область CA1 крысы из группы здорового контроля (K-PBS); D – вентральная область CA1 крысы из группы Epi-PBS. Увеличение x400.

При гистологическом исследовании в зоне CA1 пирамидного слоя гиппокампа крыс после моделирования эпилептогенеза (Epi-PBS) часто выявлялось незначительное клеточное опустошение, которое характеризовалось

менее плотным, чем в контрольной группе прилеганием нейронов пирамидного слоя друг к другу. Здесь также чаще встречались гиперхромные нейроны.

Морфометрический анализ показал, что плотность нейронов в зоне CA1 вентрального гиппокампа во всех экспериментальных группах практически не отличалась: моделирование эпилептогенеза, несмотря на видимую тенденцию, не приводило значимому уменьшению показателя по сравнению с контрольными значениями (рисунок 4А). Аналогично, в группах животных, получавших пробиотики на фоне развития модели показатели достоверно не отличалтсь от значений контрольной группы. Вместе с тем, в дорсальном гиппокампе развитие модели эпилептогенеза приводило к уменьшению плотности нейронов CA1 области: в группе K-PBS показатель составлял 278(242; 304) клеток на мм, тогда как в группе Epi-PBS – 194(179; 218) клеток на мм (p=0,013).

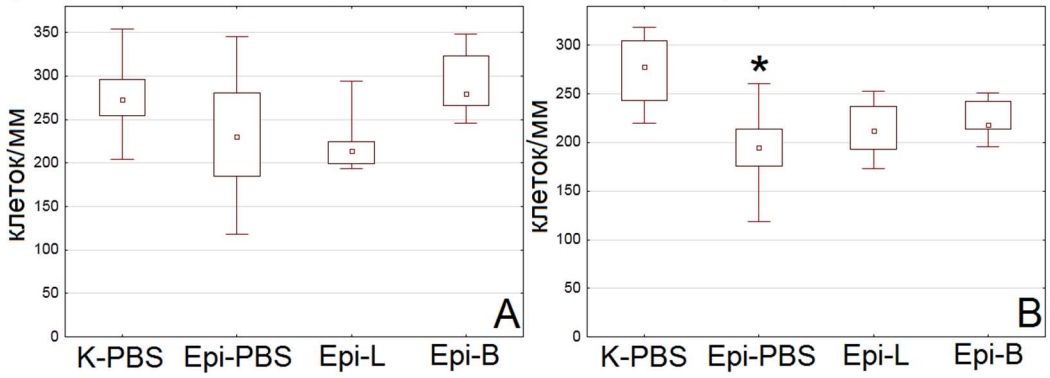


Рисунок 4 – Плотность нейронов в CA1 области вентрального (А) и дорсального гиппокампа у крыс различных экспериментальных групп.
** – p<0,05 по критерию Данна к группе K-PBS*

Несмотря на видимую тенденцию к снижению в обеих группах крыс, получавших при моделировании эпилептогенеза пробиотики, достоверных отличий от значений здоровых животных не отмечено.

Заключение. Таким образом, длительное применение монопробиотиков, относящихся к двум основным группам пробиотических бактерий кишечника – бифидобактериям и лактобациллам – не приводит к значимому изменению динамики нарастания судорожной активности в модели пентилентетразолового киндлинга, что может говорить об отсутствии выраженного противосудорожного действия монопробиотикотерапии относительно использованных штаммов. Вместе с тем, применение любого из использованных монопробиотиков оказывает слабое, однако значимое нейропротекторное действие в CA1 области дорсального гиппокампа – наиболее подверженной эпилептогенезу области височной доли мозга.

Список литературы:

1. J.W. Sander, The epidemiology of epilepsy revisited / J.W. Sander // CurrOpinNeurol. – 2003. – Vol.16. – P:165–170.

2. Gut-Brain Axis in the Early Postnatal Years of Life: A Developmental Perspective / A. Jena [et al.] // Front Integr Neurosci. – 2020. – Vol.14. – P:44.

3. The Gut-Brain-Axis on the Manifestation of Depressive Symptoms in Epilepsy: An Evidence-Driven Hypothesis / M.F.Shaikh [et al.] // Front Pharmacol. – 2020. – Vol.11. – P: 465.

4. Gut Microbes and the Brain: Paradigm Shift in Neuroscience / E.A. Mayer [et al.] // J Neurosci. – 2014. – Vol.34. – P:15490–15496.

5. Can we ‘seize’the gut microbiota to treat epilepsy? / C. De Caro [et al.] // Neurosci Biobehav Rev. – 2019. – Vol.107. – P: 750–764.

6. Altered composition of the gut microbiome in patients with drug-resistant epilepsy / A. Peng [et al.] // Epilepsy Res. – 2018. – Vol.147. – P:102–107.

7. The beneficial effect of probiotics as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study / M. Gómez-Eguílaz [et al.] // Benef Microbes. – 2018. – Vol.9. – P: 875–881.

ВЛИЯНИЕ ОФЛОКСАЦИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИНДЕКСОВ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ В КРОВИ ЦЫПЛЯТ

Моисеева Анна Анатольевна
научный сотрудник, Белгородский филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», г. Белгород
annamoiseeva1202@yandex.ru
Присный Андрей Андреевич
д.б.н., директор института фармации, химии и биологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород
andreyprisny@gmail.com
Скворцов Владимир Николаевич
д.в.н., руководитель филиала, Белгородский филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», г. Белгород
skvn59@yandex.ru

В связи с недостаточностью имеющейся информации о возможном воздействии применения фторхинолонов на показатели крови, нами изучены особенности влияния офлоксацина на динамику лейкоцитарных индексов эндогенной интоксикации и неспецифической реактивности, отражающих физиологическое состояние организма и позволяющих оценить работу эффекторных механизмов иммунной системы в крови цыплят раннего возраста. Сформированы две группы, в которых I – контрольная, где выпаивали чистую воду, в то время как группа II (опытная) получала офлоксацин на протяжении 10 суток, после чего осуществляли отбор крови. Индексы ИК, ЛИ, ИИР, ЛИИ, ИСЛК, ИЛГ определяли расчетным методом. Установлено, что использование офлоксацина не обуславливает негативного эффекта на обозначенные показатели, зарегистрированные достоверные их изменения мало выражены и непродолжительны.

Ключевые слова: *кровь; гематологические показатели; лейкоцитарные индексы; фторхинолоны; офлоксацин*

THE EFFECT OF OFLOXACIN ON INDICES OF ENDOGENOUS INTOXICATION AND INDICES OF NON-SPECIFIC REACTIVITY IN CHICKEN BLOOD

Moiseeva Anna Anatolievna

Researcher, Belgorod Department of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre - All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Scriabin and Ya. R. Kovalenko", Belgorod
annamoiseeva1202@yandex.ru
Prisnyi Andrey Andreevich
Dr.Bi.Sc., Director of the Institute of Pharmacy, Chemistry and Biology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Belgorod National Research University", Belgorod
andreyprisny@gmail.com
Skvortsov Vladimir Nikolaevich
Dr. Vet. Sci., Head of Department, Belgorod Department of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre - All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Scriabin and Ya. R. Kovalenko", Belgorod
skvn59@yandex.ru

Due to the scarce available information on the effect of fluoroquinolones on hematological indices we studied in detail the effect of ofloxacin on the dynamics of leukocyte indices of endogenous intoxication and non-specific reactivity. These indices reflect the physiological state of organism enabling us to assess the function of the effector mechanism of immune system of neonatal chickens. We divided the chickens into 2 groups. Group I was control, receiving pure drinking water, Group II was experimental, receiving ofloxacin 10 consecutive days, subsequently we collected blood samples. The following indices were calculated by computational method: Krebs index (KI), leukocyte index (LI), index of immunoreactivity (IIR), leukocyte index of intoxication (LII), leukocyte shift index (LSI) and lymphocyte-granulocyte index (LGI). We came to the conclusion that ofloxacin administration does not cause any negative effect on the aforementioned indices, inasmuch as their registered reliable changes are not pronounced and transitory.

Keywords: *blood; hematological indices; leukocyte indices; fluoroquinolones; ofloxacin*

Благодаря своеобразию реакций и чувствительности гематологические показатели, зачастую, представляют собой серьезный аргумент и решающее звено в диагностике заболеваний и последующей терапии [3]. Анализ системы крови может отражать физиологическое состояние организма, при этом одними из важных данных являются лейкоцитарные индексы, способствующие оценке работы эффекторных механизмов иммунной системы, а также тяжести воспалительной реакции и степени компенсации резистентности [2].

Интерес изучения фторхинолонов обусловлен их частым применением в качестве терапии животных, инфицированных лекарственнорезистентными формами бактерий [4]. Тем не менее, существуют сведения о том, что

офлоксацин, как и другие препараты фторхинолоновой группы, способен оказывать негативные эффекты на организм в виде супрессии кроветворной системы [6].

В связи с недостаточностью имеющихся данных о воздействии отдельных представителей фторхинолонов на гематологические показатели, нами изучено влияние офлоксацина на показатели индексов эндогенной интоксикации и неспецифической реактивности в крови цыплят.

Для исследования были сформированы две группы цыплят кросса Хайсекс Браун суточного возраста, одна из которых на протяжении 10 суток получала чистую воду (контрольная), в то время как другой выпаивали офлоксацин в дозе 200 мг/л (опытная). Отбор крови происходил на 1, 3, 5, 7 и 9 сутки после отмены препарата. Расчетным методом изучены индекс Кребса (ИК), лейкоцитарный индекс (ЛИ), индекс иммунореактивности (ИИР) – индексы неспецифической реактивности, а также лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК), лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ИЛГ) (индексы эндогенной интоксикации).

Согласно существующим данным о негативных последствиях проведения антимикробной терапии фторхинолонами у млекопитающих, зачастую выявляют агранулоцитоз и нейтропении после применения этих препаратов, что, вероятно, так же должно отражаться в изменении динамики лейкоцитарных индексов [1, 7]. Однако в результате исследования крови цыплят подобных изменений нами не выявлено. Полученные значения индексов опытной группы малозначительно и непродолжительно отличались от контроля. Так, на третьи сутки зафиксировано падение индекса Кребса на 25 % и рост лейкоцитарного индекса на 23 %, что, вероятно, не характеризует воздействие применения офлоксацина как негативное, так как известно, что именно длительное падение ИК может быть обусловлено иммуносупрессивным эффектом токсинов на клетки крови, при этом динамика показателей ЛИ тесно взаимосвязана с процессами обмена веществ [2]. Установлена волнообразная динамика индекса иммунореактивности, что проявилось сначала повышением на первые сутки на 47 %, а затем снижением на пятые и седьмые сутки на 41 % и 54 %, что, возможно, является реакцией организма на офлоксацин как на чужеродный агент. Тем не менее, необходимо отметить, что использование препарата не вызвало серьезного токсического воздействия на физиологическое стояние цыплят даже несмотря на их ранний возраст, о чем свидетельствует отсутствие достоверных отличий к концу опыта.

Данные ЛИИ, характеризующие развитие интоксикационных процессов, на протяжении всего опыта достоверно не отличались от данных контроля. Установлено изменение лимфоцитарно-гранулоцитарного индекса сначала в сторону увеличения на третьи сутки на 33 %, после чего, на пятые и девятые сутки исследования показатель в крови цыплят опытной группы упал на 22 % и

56 %. Тем не менее, аналогично индексу, описанному ранее, данные также не выходили за пределы установленной нормы. Индекс сдвига лейкоцитов крови был меньше контрольных значений на третьи сутки на 32 %, а затем достоверно увеличился на 60 %, но в целом, полученные результаты не превышали обозначенные границы для этого показателя – 0,99.

Маловыраженные изменения, описанные нами ранее, позволяют предположить, что использование офлоксацина не оказывает негативного действия на функциональную активность лейкоцитарных клеток цыплят, что определяет его иммунотоксикологическую безопасность. Существуют данные о другом представителе фторхинолонов – пефлоксацине, характеризующемся похожими свойствами и отсутствием отрицательного эффекта на организм [5], однако обладающем меньшим спектром активности в сравнении с офлоксацином. Таким образом, можно отметить, что, несмотря на более сложную химическую структуру, офлоксацин так же незначительно воздействует на физиологическое состояние организма, имея при этом большую широту противомикробного влияния.

Нами установлено непродолжительное влияние офлоксацина на лейкоцитарные индексы в крови цыплят, что, вероятно, не подразумевает серьезного негативного эффекта для их организма. Кроме того, кратковременная динамика, возможно, связана с первичной реакцией иммунной системы на воздействие препарата в качестве чужеродного аллергического вещества.

Список литературы

1. Е.Г. Бардина, Исследование гематологических эффектов токсической дозы энрофлона морфологическими и цитохимическими методами / Е.Г. Бардина // Вестник Омского университета. – 2006. – № 3. – С. 32-33.

2. Е.И. Ермашкевич, О возможности применения лейкоцитарных индексов в комплексной диагностике субклинических гепатозов у кур-несушек / Е.И. Ермашкевич, Л.В. Клепикова, А.Н. Мартынов // Успехи современной науки и образования. – 2016. – № 7. – С. 161-165.

3. А.А. Кудрявцев, Клиническая гематология животных / А.А. Кудрявцев, Л.А. Кудрявцева. – М.: Колос, 1974. – 339 с.

4. В.Н. Скворцов, Антимикробная активность офлоксацина в отношении микроорганизмов, выделенных от больных животных / В.Н. Скворцов, Н.А. Сафонова, А.А. Балбуцкая, В.В. Маханев, А.В. Войтенко // Ветеринарная патология. – 2011. – № 3. – С. 100-103.

5. Т.В. Смолкина, Влияние пефлоксацина на люминолзависимую хемилюминесценцию и адгезию лейкоцитов / Т.В. Смолкина, А.И. Йорданова, С.М. Юдин, А.В. Никитин // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – Т. 40. – № 2. – С. 32-35.

6. C.W. Eva, A novel technique for localized drug delivery / C.W. Eva, T. Ryan, A. Norma // BioPhys. J. – 2009. – Vol. 96. – P. 681-687.

7. W.N. Patton, Idyosyncratic drug-induced haematological abnormalities. Incidence, pathogensis, management and abnormalities / W.N. Patton, S.B. Duffull // Drug Saf. – 1994. – Vol. 11 (6). – P. 147-150.

ПОКАЗАТЕЛИ РЕДОКС-ЛАНДШАФТА БАЗАЛЬНЫХ ЯДЕР БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА ПРИ АЛЮМИНИЕВОМ НЕЙРОТОКСИКОЗЕ И МОДУЛИРОВАНИИ БИОСИНТЕЗА КОФЕРМЕНТА А

Мойсеёнок Андрей Георгиевич
д.б.н., член-корреспондент НАН Беларуси, профессор, заведующий отделом государственного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», г. Гродно
andrey.moiseenok@tut.by
Семенович Дмитрий Сергеевич
к.б.н., старший научный сотрудник государственного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», г. Гродно
7emenovich@gmail.com
Лукиенко Елена Петровна
к.м.н., старший научный сотрудник государственного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», г. Гродно
Lukgrodno@mail.ru
Канунникова Нина Павловна
д.б.н., профессор, главный научный сотрудник государственного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», г. Гродно
n.kanunnikova@grsu.by

Цель исследования – оценка редокс-фармакологической активности модуляторов биосинтеза кофермента А (КоА) при окислительном стрессе (ОС), развивающимся при алюминиевом нейротоксикозе. Представлены показатели системы глутатиона в базальных ядрах больших полушарий мозга крыс-самок, получавших в течение 15 дней внутрибрюшинно хлористый алюминий в дозе 200 мг/кг в течение 6 недель и с 5-й недели эксперимента модуляторы биосинтеза КоА (D-изомеры) – пантенол (ПЛ), пантетин (ПТ) или гомопантотенат кальция (ГПК). Нарушение редокс-статуса глутатиона, активности глутатион-зависимых ферментов и развитие ОС предупреждалось предшественниками биосинтеза КоА и, в меньшей мере, ингибитором биосинтеза кофермента (ГПК). Механизм влияния редокс-модуляторов связывается с ролью КоА в стабилизации нейромембран, уровня GSH и участием в функционировании холинэргических нейронов.

Ключевые слова: *система глутатиона; редокс-статус; алюминиевый нейротоксикоз; базальные ядра больших полушарий мозга; биосинтез КоА; пантотеновая кислота*

PARAMETERS OF THE REDOX LANDSCAPE OF THE BASAL NUCLEI OF THE BRAIN HEMISPHERES IN ALUMINUM NEUROTOXICOSIS AND MODULATION OF COENZYME A BIOSYNTHESIS

Moiseenok Andrey Georgievich
Dr.B.Sc., Correspondent Member of the NAS of Belarus, Professor, Head of the Department, State Institution "Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus", Grodno
andrey.moiseenok@tut.by
Semenovich Dmitry Sergeivich,
C.B.Sc., Researcher, State Institution "Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus", Grodno
7emenovich@gmail.com
Lukiyenko Elena Petrovna,
C.M.Sc., Senior Researcher, State Institution "Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus", Grodno
Lukgrodno@mail.ru
Kanunnikova Nina Pavlovna,
Dr.B.Sc., Professor, Chief Researcher, State Institution "Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus", Grodno
n.kanunnikova@grsu.by

The redox-pharmacological activity of coenzyme A (CoA) biosynthesis modulators under oxidative stress (OS) developing in aluminum neurotoxicosis was studied. The parameters of the glutathione system in the basal nuclei of the brain hemispheres of female rats are presented, which received intraperitoneal aluminum chloride at a dose of 200 mg/kg for 15 days for 6 weeks and from the 5th week of the experiment modulators of CoA biosynthesis (D-isomers) - panthenol (PL), pantethine (PT) or calcium homopantothenate (HPA). Violation of the redox status of glutathione, the activity of glutathione-dependent enzymes, and the development of OS were prevented by precursors of CoA biosynthesis and, to a lesser extent, by an inhibitor of coenzyme biosynthesis (HPA). The mechanism of redox modulators influence is associated with the role of CoA in the stabilization of neuromembranes, the level of GSH, and participation in the functioning of cholinergic neurons.

Key words: *glutathione system; redox status; aluminum neurotoxicosis; basal nuclei of the brain hemispheres; biosynthesis of CoA; pantothenic acid*

Универсальным проявлением начальных стадий нейродегенеративных процессов является окислительный стресс (ОС), проявляющийся последующим патологическим процессом в коре и базальных ядрах больших полушарий, гиппокампе, продолговатом мозге, гипоталамусе и других нейроструктурах, порождающим полиморфную симптоматику и разнообразие лечебно-профилактических подходов для устранения последствий ОС и восстановления

нейрональной функции. В связи с поражением холинергических нейронов и открытием генетически-детерминированных нейродегенеративных синдромов, обусловленных поражением системы биосинтеза КоА, поиск нейромодуляторов в ряду предшественников биосинтеза КоА становится актуальным. При этом учитывается антиоксидантный потенциал этой группы соединений, высокая метаболическая активность и, в последние годы, их редокс-модулирующие свойства [1-5]. Это неоднократно было продемонстрировано на альцгеймер-подобной модели алюминиевого нейротоксикоза (АНТ), в частности, на их влиянии на проявления ОС и дисбаланса редокс-статуса и всей системы глутатиона [6]. Однако роль биосинтеза КоА в развитии нейродегенерации далеко не изучена, особенно в плане ее потенциала в посттрансляционной модификации белков (КоА-илирование, фосфопантетеинилирование, дисульфидообразование) и особенностей функционирования в отдельных нейроструктурах [7].

В настоящей работе впервые оценивается редокс-модулирующий потенциал системы биосинтеза КоА в базальных ядрах больших полушарий мозга.

В эксперименте использовали белых крысах-самок линии Wistar CRL: (WI) WUBR массой 150-200 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария, разделенных на 5 экспериментальных групп (n=7), первой из которых была контрольная группа, получавшая внутрижелудочно физиологический раствор. Крысам 2-5 групп внутрижелудочно вводили раствор хлорида алюминия ($AlCl_3$) ежедневно в дозе 200 мг/кг в течение 6 недель. С 5 недели до окончания эксперимента крысам 3, 4 и 5 экспериментальных групп внутрижелудочно вводили D-пантенол (ПЛ), D-пантетин (ПТ) или гомопантотенат кальция (ГПК) в дозах 200 мг/кг.

Для оценки тиол-дисульфидного редокс-баланса измеряли содержание общих белковых тиолов (PSH) и дисульфидов (PSSP) спектрофотометрическим методом и рассчитывали их соотношение (PSH/PSSP). Для измерения потенциала главной редокс-образующей системы клеток – системы глутатиона (GSH) определяли уровнь GSH и GSSG и их соотношение, используя сочетание спектрофотометрии с реактивом Эллмана и ферментативного метода с глутатионредуктазой, а также исследовали уровень S-глутатионилированных белков, как это описано в предыдущей публикации [6].

Изучены следующие показатели GSH в базальных ганглиях мозга: активность глутатионтрансферазы (GST) глутатионредуктазы (GR) глутатионпероксидазы (GPx) с субстратом терт-бутилпероксидом (tBHP), как это описано ранее [6].

Определение общего белка осуществляли методом Брэдфорда. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 6.0. Результаты представлены в виде

M±SEM, где M – среднее значение, SEM – стандартная ошибка среднего с проверкой на нормальность распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Достоверность межгрупповых различий оценивали, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением теста Тьюки. Статистически значимыми считали различия при значении $p<0,05$.

Таблица 1 – Изменения редокс-статуса белков и системы глутатиона в базальных ядрах больших полушарий мозга при алюминиевом нейротоксикозе

Показатель	Группа				
	Контроль	АНТ	АНТ+ПЛ	АНТ+ПТ	АНТ+ГПК
PSH (мкмоль/г ткани)	9,94±0,78	8,42±1,01	10,59±0,89*	10,20±0,79*	11,11±0,64*
PSSP (мкмоль/г ткани)	5,07±0,22	3,16±0,27*	3,49±1,37*	3,94±0,27*#	4,19±0,48*#
PSH/PSSP	1,95±0,12	2,72±0,24*	3,05±0,21*#	2,61±0,35*	2,67±0,28*
GSH (нмоль/мг белка)	29,3±1,1	19,4±0,9*	35,5±1,4*	24,8±1,6#	23,3±0,8#
GSSG (нмоль/мг белка)	0,109±0,003	0,115±0,003	0,111±0,005	0,108±0,005	0,112±0,001
GSH/GSSG	268,8±11,3	168,9±13,1*	221,2±10,5#	229,7±10,3#	208,1±12,2*
GR (нмоль/мин/мг белка)	12,7±0,9	16,9±0,8*	12,5±0,8	13,9±1,1	13,2±1,0
GPx (tBHP) (нмоль/мин/мг белка)	28,4±0,9	48,3±1,0*	29,9±1,0#	32,4±1,1#	33,3±1,0#
GST (нмоль/мин/мг белка)	77,2±1,0	87,7±1,2*	79,6±1,0#	80,4±1,1#	84,9±1,2
PSSG (нмоль/мг белка)	0,522±0,04	0,583±0,020*	0,480±0,050#	0,400±0,061*#	0,511±0,06#

Примечание – * – $p<0,05$ по отношению к контрольной группе, # – $p<0,05$ по отношению к группе с алюминиевым нейротоксикозом (АНТ).

Полученные результаты (таблица 1) указывают, что развитие нейротоксикоза приводит к падению восстановительного потенциала системы глутатиона в базальных ганглиях при определенном увеличении активности глутатионредуктазы и процесса S-глутатионилирования белков. Происходящее увеличение активности ферментов GPx и GST отражает нарастающий ОС и процессы детоксикации при нейротоксикозе. При этом тиоловый статус белков

характеризуется определенным ростом тиоловых групп (соотношение PSH/PSSP).

Введение предшественников биосинтеза КоА (ПЛ и ПТ) приводит к росту как белковых тиолов, так и восстановленного глутатиона, предупреждая нарушение восстановительного потенциала и нормализует активность изученных глутатион-метаболизирующих ферментов. Равным образом предупреждается рост процесса S-глутатионилирования белков (в случае ПТ – ниже значений контроля). Введение на фоне АНТ гомопантотената кальция, являющегося структурным ингибитором биосинтеза КоА на уровне пантотенаткиназы [7] также модулирует тиол-дисульфидный статус белков и глутатиона хотя восстановительный потенциал действия ГПК очевидно меньше или не проявляется. Обращает на себя внимание способность этого соединения стабилизировать процесс S-глутатионилирования белков, что было подтверждено в других исследованиях, несмотря на отсутствие эффекта на уровень КоА в нейроструктурах. При этом алюминиевый нейротоксикоз характеризуется снижением биосинтеза КоА в нейроструктурах, например, в больших полушариях мозга и гиппокампе [6].

Известно, что в базальных ядрах, обеспечивающих регуляцию тонкой произвольной двигательной активности и характеризующиеся выраженными морфологическими изменениями при нейродегенеративной патологии, важную роль играют холинергические нейроны. В настоящей работе мы не исследовали систему биосинтеза КоА в этой структуре, хотя падение уровня кофермента показано в больших полушариях мозга и гиппокампе при алюминиевом нейротоксикозе [8]. В объяснении полученных результатов могут иметь значение процессы КоА-илирования ферментов основных метаболических циклов [7, 8] так и участия КоА (ацетил-КоА) в биосинтезе ацетилхолина. Равным образом можно рассматривать стабилизирующую роль предшественников КоА – производных пантотеновой кислоты на структуру и функцию нейромембран [10, 11] на препаратах которых было продемонстрировано свойство стабилизации системы глутатиона и их антиоксидантная активность.

Очевидно, можно интегрировать антиоксидантное и редокс-модулирующее действие предшественников биосинтеза КоА как один из ключевых элементов нейропротекции [5, 9].

Список литературы

1. V. Kumar, Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects / V. Kumar, K. D. Gill // Arch. Toxicol. – 2009. – Vol. 83, № 11. – P. 965–978.

2. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration / V. Bharathi [et al.] // Indian J. Med. Res. – 2008. – Vol. 128, № 4. – P. 545–556.

3. Н.П. Канунникова, Основные редокс-пары поддерживания тиол-дисульфидного баланса в нервной ткани / Н.П. Канунникова, Д.С. Семенович, А.Г. Мойсеёнок // Обзорные и проблемные статьи. Новости медико-биол. наук; редкол.: В.С. Улащик (гл. ред.) [и др.]. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 84–89.

4. А.Г. Мойсеёнок, Редокс-механизмы нейродегенерации / А.Г. Мойсеёнок, Н.П. Канунникова // Кислород и свободные радикалы: сборник материалов международной научно-практической конференции, 15-16 мая 2018 года [Электронный ресурс] / под ред. проф. В. В. Зинчука. - Электрон. текст. дан. и прогр. (объем 3,5 Мб). - Гродно: ГрГМУ, 2018. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – С. 140–142.

5. А.Г. Мойсеёнок, Опосредованный коферментом А универсальный механизм реализации редокс-модулирующего и антиоксидантного потенциала клетки / А.Г. Мойсеёнок // Кислород и свободные радикалы: сборник материалов международной научно-практической конференции, 15-16 мая 2018 года [Электронный ресурс] / под ред. проф. В. В. Зинчука. - Электрон. текст. дан. и прогр. (объем 3,5 Мб). - Гродно: ГрГМУ, 2018. - 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – С. 137–140.

6. Д.С. Семенович, Окислительный стресс в митохондриях мозга при алюминиевом нейротоксикозе и введении модуляторов биосинтеза глутатиона и кофермента А / Д.С. Семенович, Н.П. Канунникова, А.Г. Мойсеёнок // Доклады НАН Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 1. – С. 78-85.

7. Coenzyme A biochemistry: from neurodevelopment to neurodegeneration / L. Mignani [et al.] // Brain Sci. – 2021. – Vol. 11, № 8. – P.1031.

8. CoA-dependent activation of mitochondrial acyl carrier protein links four neurodegenerative diseases / R.A. Lambrechts [et al.] // EMBO Mol. Med. – 2019, № 11. – P. 10488.

9. Coenzyme A levels influence protein acetylation, CoAlation and 4'-phosphopantetheinylation: Expanding the impact of a metabolic nexus molecule / Y. Yu [et al.] // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. – 2021. – Vol. 1868, № 4. – P. 118965. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.118965. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33450307.

10. Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation / V. Slyshenkov [et al.] // Free Radicals. Biol. Med. – 1995. – Vol. 19. – № 6. – С. 767–772.

11. В.С. Слышенков, Предупреждение пантотенатом нарушений системы глутатиона и показателей состояния синаптосомальной мембраны при моделировании окислительного стресса / В.С. Слышенков, А.А. Шевалье, А.Г. Мойсеёнок // Нейрохимия. – 2006. – Т. 23. – № 3. – С. 1–5.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ КОМБИНИРОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ РЕЦЕПТОРОВ CXCR1, CXCR2 И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО

Мурашко Дарья Игоревна
аспирант кафедры биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск,
dashamurashka@mail.ru
Таганович Анатолий Дмитриевич
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
ataganovich@gmail.com
Ковганко Николай Николаевич
к.х.н, доцент кафедры биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
mikalai44@tut.by

Цель: оценить результаты комбинированного определения показателей опухолевого метаболизма (гиалуроновой кислоты, рецепторов CXCR1, CXCR2) в крови пациентов с целью уточнения распространенности опухоли при этом заболевании. Материалы и методы: определение концентрации гиалуроновой кислоты в крови 98 пациентов с аденокарциномой легкого (АК) и 42 здоровых людей проводилось методом иммуноферментного анализа, измерение в крови уровня CYFRA 21-1 – методом иммунохемилюминесцентного анализа. Определение рецепторов CXCR1, CXCR2 осуществляли методом проточной цитометрии. Результаты. Созданы многофакторные (регрессионные) модели для отличия I-II стадий АК от здоровых людей и III-IV стадий, а также различия I и II стадий заболевания, позволяющие существенно повысить диагностическую ценность определения с этой целью лабораторных показателей в отдельности.

Ключевые слова: *гиалуроновая кислота; CXCR1; CXCR2; аденокарцинома легкого; кровь.*

DIAGNOSTIC VALUE OF COMBINED DETERMINATION OF CXCR1, CXCR2 AND HYALURONIC ACID BLOOD LEVELS IN PATIENTS WITH LUNG ADENOCARCINOMA

Murashka Darya Iharayna,
Aspirant of the department of biological chemistry, Belarusian state medical university, Minsk
dashamurashka@mail.ru
Tahanovich Anatoly Dmitrievich

Dr.M.Sc., professor, head of the department of biological chemistry,
Belorusian state medical university, Minsk
ataganovich@gmail.com
Kauhanka Nicolai Nicolayevich,
C.Ch.Sc., associate professor of the department of biological chemistry,
Belarusian state medical university, Minsk
mikalai44@tut.by

Objective: to evaluate the results of the combined determination of tumor metabolism parameters (hyaluronic acid, CXCR1, CXCR2 receptors) in the blood of patients in order to clarify the prevalence of the tumor in this disease. Materials and methods: determination of the concentration of hyaluronic acid in the blood of 98 patients with lung adenocarcinoma (AC) and 42 healthy people was carried out by enzyme immunoassay, measurement of CYFRA 21-1 in the blood by immunochemiluminescence analysis. The determination of the CXCR1 and CXCR2 receptors was carried out by flow cytometry. Results. Multifactorial (regression) models have been created to distinguish stages I-II of AC from healthy people and stages III-IV, as well as differences in stages I and II of the disease, which significantly increase the diagnostic value of determining laboratory parameters separately for this purpose.

Keywords: *hyaluronic acid; CXCR1; CXCR2; lung adenocarcinoma; blood.*

В настоящее время не существует информативных биомаркеров, которые позволяют судить о распространенности аденокарциномы легкого (АК) на дооперационном этапе. Ранее нами были получены результаты, свидетельствующие о существенном подъеме уровня ГК в сыворотке крови, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, и плотности расположения (MFI) CXCR1 в гранулоцитах пациентов с АК [1, 2]. Диагностическая эффективность их измерения в крови пациентов с этим заболеванием превосходила таковую «классического» опухолеассоциированного антигена CYFRA 21-1. Однако ни один из показателей не обладал одновременно высокой диагностической чувствительностью и специфичностью при этом заболевании. Распространенным подходом к решению этой проблемы является создание многофакторных диагностических моделей, включающих несколько независимых предикторов.

Целью настоящего исследования явилась оценка диагностических параметров комбинированного определения рецепторов CXCR1, CXCR2, ГК и CYFRA 21-1 при АК.

Материалы и методы: Обследовано 98 пациентов с АК при поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период 2019-2022 гг. В качестве группы контроля обследовано 42 человека без проявлений заболевания.

Определение концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови проводили методом иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА). Измерение уровня ГК в сыворотке крови пациентов и здоровых людей осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием ИФА-наборов Fine Test (КНР) на автоматическом анализаторе Brio (Seac, Италия) и планшетном фотометре Sirio (Seac, Италия). Относительное количество лимфоцитов, снабженных рецептором CXCR2, и плотность расположения рецептора CXCR1 в них (MFI) определяли методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25% - 75%). Для оценки различий уровня определяемых показателей в нескольких независимых группах применяли Н-критерий Краскелла-Уоллиса. Критическое значение уровня значимости критерия принимали равным 5% ($p < 0,05$). Последующие сравнения осуществлялись с применением U-критерия Манна-Уитни в соответствии с поправкой Холма-Бонферрони на множественные сравнения. О характере и силе взаимосвязи между уровнем показателей и степенью распространенности опухолевого процесса судили на основании расчета коэффициента корреляции Спирмена (R). Оценку диагностической информативности биохимических тестов проводили ROC–анализа.

Для построения многофакторной математической модели использовали бинарную логистическую регрессию. Переменные отбирались в соответствующие регрессионные уравнения методом пошагового включения переменных.

Результаты. Уровень ГК, MFI CXCR1 в гранулоцитах, доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, и CYFRA 21-1 в крови пациентов с АК существенно выше, чем в группе контроля, уже при I стадии заболевания ($p<0,008$, таблица 1). При II ее стадии концентрация Уровень ГК, MFI CXCR1 в гранулоцитах, доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, но не CYFRA 21-1, возрастает по сравнению с I. При III-IV стадиях АК уровень всех вышеназванных показателей максимален и существенно превышает таковой у пациентов с I и II стадиями АК. Корреляционный анализ подтвердил наличие связи средней силы уровня этих показателей со стадиями АК (таблица 1).

Полученные результаты дали основания для оценки диагностических параметров определения показателей в крови пациентов с АК. Чувствительность (ДЧ), специфичность (ДС) и эффективность (ДЭ) их измерения в сыворотке крови с целью отличия I-II стадии АК от здоровых людей и от III-IV стадий, а также различия I и II стадии заболевания при оптимальных пороговых значениях (ПЗ), представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Уровень ГК, MFI CXCR1 (гранулоциты), CXCR2, лимфоциты, % и CYFRA 21-1 в крови пациентов с АК

Показатель	Контроль	АК			R
		Ст. I	Ст. II	Ст. III-IV	
ГК, нг/мл	9,0 [7,7; 18,0]	22,4[1,2] [15,1; 24,6]	27,9[1,2,3] [23,8; 28,7]	30,2[1,2,3,4] [27,1; 33,2]	0,692
MFI CXCR1, гранулоциты	20,1 [9,9; 27,6	32,1[1,2] [23,9; 44,2]	47,2[1,2,3] [37,3; 65,1]	54,4[1,2,3,4] [47,8;63,9]	0,565
CXCR2, лимфоциты, %	9,5 [6,6; 12,6]	16,5[1,2] [10,3; 19,1]	20,9[1,2,3] [20,0; 34,3]	32,5[1,2,3,4] [30,7;34,3]	0,661
CYFRA 21-1, нг/мл	1,4 [1,3; 2,0]	2,7[1,2] [2,0; 3,7]	2,9[1,2] [2,2; 4,1]	4,4[1,2,3,4] [3,5;7,3]	0,477

Примечание. [1] – достоверные отличия по сравнению со здоровыми людьми; [2] - достоверные отличия уровня показателей с гамартомой; [3] - достоверные отличия по сравнению с I стадией; [4] - достоверные отличия по сравнению со II стадией.

Таблица 2 – Диагностические параметры определения рецепторов CXCR1, 2, ГК и CYFRA 21-1 в крови пациентов с АК

Показатель	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	ДЭ, %
I-II стадия АК / здоровые люди				
MFI CXCR1, гранулоциты	30,5	77,8	97,6	86,5
CXCR2, лимфоциты, %	14,4	76,9	85,7	80,8
ГК, нг/мл	13,6	98,2	71,1	87,2
CYFRA 21-1, нг/мл	1,6	88,9	66,7	79,2
I-II стадия АК / III-IV стадия АК				
MFI CXCR1, гранулоциты	47,5	77,5	74,1	75,5
CXCR2 лимфоциты, %	22,8	95,0	78,8	84,8
ГК, нг/мл	26,7	88,1	73,2	79,6
CYFRA 21-1, нг/мл	3,1	87,2	70,4	77,4
I стадия АК / II стадия АК				
MFI CXCR1, гранулоциты	36,6	86,2	72,0	79,6
CXCR2 лимфоциты, %	18,4	77,8	76,0	76,9
ГК, нг/мл	25,6	72,4	92,6	82,1

Для построения математических моделей использовалась бинарная логистическая регрессия. В уравнение 1, созданное с целью отличия пациентов с I и II стадиями АК от здоровых людей, были включены концентрация ГК в сыворотке крови пациентов и MFI CXCR1 в гранулоцитах периферической крови (уравнение 1):

$$Y1=\frac{\exp(-10{,}04+0{,}128*[\text{ MFI CXCR1 гран.}]+0{,}391*[\text{ГК}])}{1+(-10{,}04+0{,}128*[\text{ MFI CXCR1 гран.}]+0{,}391*[\text{ГК}])},$$

где здесь и далее: exp – основание натурального логарифма (≈ 2,718); Y1 – результат регрессионного уравнения 1, характеризующий вероятность наличия

у обследуемого ранних (I или II) стадий АК; –10,04; - – константа регрессионного уравнения 1 (точка пересечения регрессионной кривой с осью OY).

Уравнение 1 – Регрессионная модель, созданная для отличия пациентов с I и II стадиями АК от здоровых людей.

У 96,3% пациентов с I и II стадиями АК результат регрессионного уравнения 1 превышает пороговое значение 0,37. 86,8% обследуемых с результатом уравнение меньше 0,37 верно отнесены к здоровым людям. Диагностическая эффективность теста составляет 92,4%.

В регрессионное уравнение 2, созданное с целью отличия пациентов с I и II стадиями АК от III и IV ее стадий, вошла концентрация CYFRA 21-1 в сыворотке крови, доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, и MFI CXCR1 в гранулоцитах.

$$Y2=\frac{\exp(-13{,}70+0{,}542*[\text{CYFRA 21-1}]+0{,}233*[\text{CXCR2, лимф., \%}]+0.096*[\text{ MFI CXCR1, гран.}]}{1+\exp(-13{,}70+0{,}542*[\text{CYFRA 21-1}]+0{,}233*[\text{CXCR2, лимф., \%}]+0.096*[\text{ MFI CXCR1, гран.}]}$$

Уравнение 2 – Регрессионная модель, созданная для отличия пациентов с I-II стадиями АК от III-IV стадий.

92,1% пациентов с III и IV стадиями АК имели результат уравнения 2 выше порогового значения 0,5 (специфичность – 92%). Эффективность использования уравнения для отличия I-II стадий АК от III-IV стадий составляет 92.

MFI CXCR1 в гранулоцитах и концентрация ГК в крови были включены в уравнение 3, позволяющее с высокой эффективностью отличить II стадию АК от I ее стадии (формула 3;)

$$Y3=\frac{\exp(-23{,}66+0{,}795*[\text{ГК}]+0{,}104*[\text{ MFI CXCR1, гран.}])}{1+\exp(-0{,}23{,}66+0{,}795*[\text{ГК}]+0{,}104*[\text{ MFI CXCR1, гран.}])}$$

Уравнение 3 – Регрессионная модель, созданная для отличия пациентов с I стадией АК со II стадией.

Среди пациентов со II стадией АК у 93,1% результат уравнения 3 был выше порогового значения (0,53), а 92% пациентов с Y3 меньше порогового имели I стадию заболевания. Эффективность применения уравнения 3 у пациентов с I и II стадиями АК – 92,6%.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о сравнительно высокой диагностической эффективности определения уровня ГК в крови, доли лимфоцитов с рецептором CXCR2, MFI CXCR1 в гранулоцитах в крови пациентов с I, II и III-IV стадиями АК, превосходившей таковую измерения «классического» опухолеассоциированного антигена CYFRA 21-1. Вместе с тем, ни один из показателей не обладал достаточно высокой чувствительностью и специфичностью определения при гистологических АК.

Созданы многофакторные диагностические модели. Первая позволяет отличить пациентов с I и II стадиями АК от здоровых людей (эффективность – 92,4%). Вторая позволяет отличить пациентов с I и II стадиями АК от III и IV ее

стадий (эффективность – 92,0%). Третья позволяет различить пациентов с I и II стадиями АК (эффективность – 92,6%. Полученные результаты позволяют рассмотреть соответствующие модели в качестве дополнительных критериев для уточнения распространенности опухолевого процесса при АК.

Список литературы

1. Диагностическая значимость определения уровня хемокина CXCL8 и его рецептора CXCR1 в крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого / Д. И Мурашко., А. Д. Таганович, Н. Н. Ковганко // Евразийский онкологический журнал, 2021, т. 9(2), с. 127 – 137.

2. Уровень CXCL5 и его рецептора CXCR2 в крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Диагностическая эффективность определения / Д. И Мурашко., А. Д. Таганович, Н. Н. Ковганко // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики. – 2021. – Т.11. – с. 508 – 516.

БИОКОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И СЕРЕБРА

Мусская Ольга Николаевна
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник, Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск
musskaja@igic.bas-net.by
Крутько Евгений Николаевич
научный сотрудник, Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск
ev_krutsko@igic.bas-net.by
Крутько Валентина Константиновна
к.х.н., доцент, заведующий лабораторией, Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск
tsuber@igic.bas-net.by
Кулак Анатолий Иосифович
д.х.н., академик, директор, Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск
kulak@igic.bas-net.by

Цель: получение биокомпозитов на основе фосфатов кальция и серебра; исследование их физико-химических свойств при создании материалов медицинского назначения с бактерицидными свойствами. Методы исследования: рентгенофазовый анализ, ИК-спектроскопия, спектрофотометрия. Основные результаты работы: получены биокомпозиты, содержащие фосфаты кальция (брушит, тетракальцийфосфат, трикальцийфосфат, аморфный фосфат кальция либо аморфизированный гидроксиапатит в зависимости от pH среды) и соединения серебра (наночастицы металла либо сереброзамещенный фосфат кальция). Показана возможность модифицирования волоконных целлюлозных материалов наночастицами серебра и биокомпозитами на основе фосфатов кальция и серебра. Полученные материалы перспективны для использования в качестве картриджей для противомикробной защиты.

Ключевые слова: *фосфаты кальция; наночастицы серебра; целлюлоза; бактерицидные свойства.*

BIOCOMPOSITE BASED ON CALCIUM AND SILVER PHOSPHATES

Musskaya Olga Nikolaevna
C.Ch.S., Assistant Professor, Leading Researcher, Institute of General and Inorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
musskaja@igic.bas-net.by
Krutsko Evgeny Nikolaevich
Researcher, Institute of General and Inorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk

ev_krutsko@igic.bas-net.by
Krut'ko Valentina Konstantinovna
C.Ch.Sc., Assistant Professor, Head of the Laboratory, Institute of General and Inorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
tsuber@igic.bas-net.by
Kulak Anatoly Iosifovich
Dr.Ch.Sc., academician, director Institute of General and Inorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
kulak@igic.bas-net.by

To obtain biocomposites based on calcium and silver phosphates; to study their physico-chemical properties at creating of materials for medical purposes with bactericidal properties. Research methods: X-ray phase analysis, IR spectroscopy, spectrophotometry. The main results of the work: biocomposites containing calcium phosphates (brushite, tetracalcium phosphate, tricalcium phosphate, amorphous calcium phosphate or amorphized hydroxyapatite depending on the pH of the medium) and silver compounds (metal nanoparticles or silver-substituted calcium phosphate) were obtained. The possibility of modifying of fiber cellulose materials with silver nanoparticles and biocomposites based on calcium and silver phosphates is shown. The obtained materials are promising for use as cartridges for antimicrobial protection.

Key words: *calcium phosphates; silver nanoparticles; cellulose; bactericidal properties.*

Природные и синтетические полимеры находят практическое применение при создании волоконных материалов медицинского назначения, в том числе средств индивидуальной защиты. Механическая и химическая обработка таких материалов приводит к появлению новых свойств [1]. В частности, в последнее время особенно актуальным является защита от микроорганизмов. В качестве модифицирующих агентов с антимикробными и антивирусными свойствами часто используют соединения металлов подгруппы меди [2]. Известно, что основные и средние фосфаты кальция характеризуются биосовместимостью и являются хорошими адсорбентами, что позволяет их применять в качестве носителей для активных компонентов [3, 4]. В связи с этим интерес вызывает создание кальцийфосфатных композитов, содержащих антимикробные добавки. Целью работы являлось получение биокомпозитов на основе фосфатов кальция и серебра; исследование их физико-химических свойств при создании материалов медицинского назначения с бактерицидными свойствами.

Получение коллоидных растворов серебра проводили боргидридным методом: к раствору нитрата серебра ($AgNO_3$) приливали шестикратный избыток раствора боргидрида натрия ($NaBH_4$) при интенсивном перемешивании. Концентрации растворов исходных реагентов рассчитывали с учетом

содержания наночастиц серебра в коллоидном растворе 0,1–0,5 ммоль/л (соответствует концентрации 11–54 мг/л).

Биокомпозиты на основе фосфатов кальция и серебра получали двумя способами путем взаимодействия нитратов кальция ($Ca(NO_3)_2$) и серебра в щелочной среде без и в присутствии $NaBH_4$. Первым способом в раствор, содержащий $AgNO_3$ концентрацией 1,5 ммоль/л и $Ca(NO_3)_2$ концентрацией 15 ммоль/л, добавляли раствор, содержащий 0,12 моль/л гидроксида натрия (NaOH) и 0,02 моль/л двузамещенного фосфата аммония ($(NH_4)_2HPO_4$), затем приливали 2 мМ раствор $NaBH_4$ и перемешивали полученную суспензию. Вторым способом синтез биокомпозита проводили путем одновременного прикапывания раствора, содержащего 0,7 моль/л $Ca(NO_3)_2$ и 0,01–0,05 моль/л $AgNO_3$, и 0,3 М раствора двузамещенного фосфата натрия (Na_2HPO_4) либо $(NH_4)_2HPO_4$ в среде близкой к нейтральной (pH 6–7; 0,01 М раствор NaOH) либо щелочной (pH 10–11; 2 М раствор NaOH) при мольных соотношениях Ca/P 1,67 и Ag/Ca 0,005. Суспензию выдерживали 2–5 сут с последующим промыванием дистиллированной водой до величины pH 7 и значений электропроводности промывных вод 15–60 мкСм/см.

Модифицирование волоконных целлюлозных материалов проводили иммерсионным методом двумя способами: 1) погружением волоконных носителей в готовый коллоидный раствор наночастиц серебра либо раствор биокомпозита на 2–5 минут; 2) синтезом наночастиц серебра либо биокомпозитов на их основе с фосфатами кальция в присутствии целлюлозных носителей.

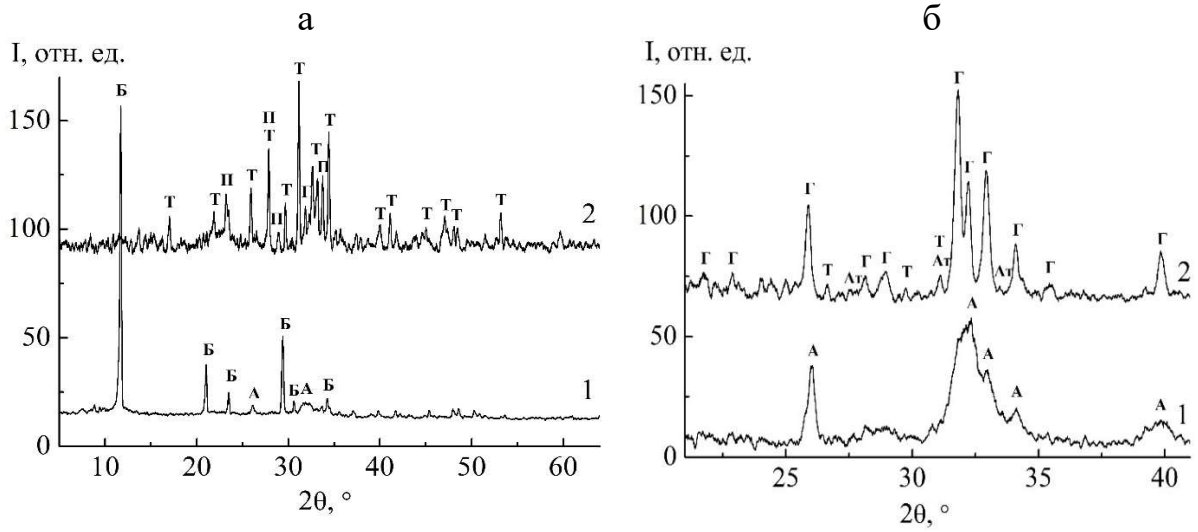
Величину pH растворов измеряли на pH-метре HI 221; электропроводность оценивали с использованием TDS-метра. Рентгенофазовый анализ (РФА) образцов проводили на дифрактометре ДРОН-3 с излучением CuK=1,5405Å. ИК-спектроскопический анализ проводили на приборе Tenzor-27, запрессовывая образцы в таблетки с KBr. Оптические спектры пропускания коллоидных растворов регистрировали на спектрофотометре Agilent 8453. Кристаллическое отношение и индекс асимметрии полосы валентных колебаний гидроксильных групп, включенных в водородную связь, волоконных целлюлозных материалов рассчитывали по данным РФА и ИК-спектроскопии согласно методикам [5].

Полученные коллоидные растворы серебра имеют окраску от желтой до коричневой в зависимости от концентрации наночастиц металла, наличие которых было подтверждено спектрофотометрическим методом по максимумам поглощения в области 400 нм, что связано с явлением поверхностного плазмонного резонанса [6]. Коллоидные растворы серебра при концентрации наночастиц металла 0,1–0,3 ммоль/л остаются стабильными в течение 3 месяцев, а более концентрированный коллоид (0,5 ммоль/л) – до 10–14 суток.

При получении биокомпозита на основе фосфатов кальция и наночастиц серебра первым способом образуется суспензия, содержащая гидроксиапатит –

ГА, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (в щелочной среде) либо тетракальцийфосфат – ТеКФ, $Ca_4P_2O_9$ (в нейтральной либо слабо щелочной среде) и наночастицы серебра. Коллоидная устойчивость полученного композита сохраняется до 3 месяцев.

Вторым способом при величине pH 6–7 осаждается белый осадок, фазовый состав которого представлен преимущественно дикальцийфосфатом дигидратом со структурой брушита $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ (рис. 1 а). Синтезированный продукт содержит также до 13% аморфного фосфата кальция (АФК, $Ca_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$). После прогрева при 800°С образуется трикальцийфосфат β-модификации (β-ТКФ, β-$Ca_3(PO_4)_2$), ГА и пирофосфат кальция (ПФК, $Ca_2P_2O_7$). В данных условиях синтеза соединения серебра в составе осадка не обнаруживаются; ионы данного металла находятся в надосадочном растворе. Повышение величины pH до 10–11 приводит к выпадению осадка коричневого цвета. По данным РФА после высушивания образца при 60°С образуется АФК, кристаллизующийся при 800°С преимущественно до ГА (рис. 1 б). В щелочной среде появляются β-ТКФ и сереброзамещенный фосфат кальция (Ag-ТКФ, $AgCa_{10}(PO_4)_7$).



А – АФК; Ат – Ag-ТКФ; Б – брушит; Г – ГА; П – ПФК; Т – β-ТКФ

Рисунок 1 – Рентгенограммы фосфатов кальция, синтезированных в присутствии ионов серебра при pH 6–7 (а) и pH 10–11 (б), 2 способ: 1 – 60°С; 2 – 800°С

Модифицирование волоконных целлюлозных материалов серебросодержащими компонентами приводит к получению образцов, имеющих светло-желтое окрашивание (рис. 2). По данным РФА обработка волоконных носителей коллоидными растворами серебра либо биокомпозитами, содержащими фосфаты кальция и серебросодержащие компоненты, способствует снижению кристаллического отношения целлюлозы, что свидетельствует о ее частичной аморфизации. Изменение положения максимума поглощения и индекса симметрии полосы валентных колебаний гидроксильных групп на ИК-спектрах в результате обработки волоконного носителя

компонентами с антибактериальными свойствами свидетельствует о перераспределении меж- и внутримолекулярных водородных связей и изменении надмолекулярной структуры целлюлозы.

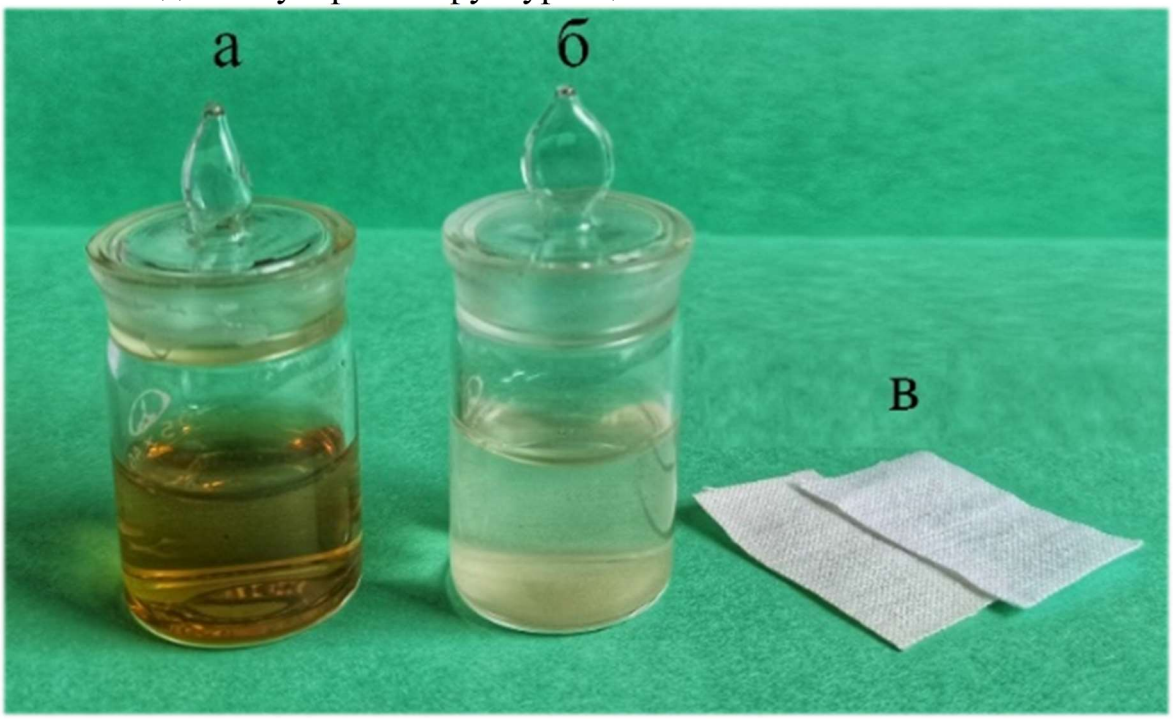


Рисунок 2 – Коллоидные растворы серебра (а), биокомпозита на основе фосфатов кальция и серебра (б) и волоконные целлюлозные материалы, модифицированные серебросодержащими компонентами (в)

Таким образом, боргидридным методом получены устойчивые коллоиды серебра с концентрацией наночастиц металла 11–54 мг/л. На основе фосфатов кальция синтезированы биокомпозиты, содержащие антибактериальные компоненты в виде наночастиц серебра либо сереброзамещенного фосфата кальция. Показано, что модифицирование волоконных целлюлозных материалов наночастицами серебра и биокомпозитами на основе фосфатов кальция и серебра приводит к изменению упорядоченности структуры полимера. Полученные материалы перспективны для использования в качестве картриджей для противомикробной защиты.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ № Х21КОВИД-008.

Список литературы

1. О. В. Ершова, Способы химической модификации целлюлозы с целью создания новых композиционных материалов / О. В. Ершова, Л. В. Чупрова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 10. – С. 359–362.

2. Е. Н. Петрицкая, Сравнительная характеристика антибактериального действия препаратов серебра и наносеребра in vitro / Е. Н. Петрицкая, Д. А. Рогаткин, Е. В. Русанова // Альманах клинической медицины. – 2016. – Т. 44, № 2. – С. 221–226.

3. О. Н. Мусская, Получение биоактивных мезопористых кальцийфосфатных гранул / О. Н. Мусская, А. И. Кулак, В.К. Крутько, Ю. А. Лесникович, В. В. Казбанов, Н. С. Житкова // Неорганические материалы. – 2018. – Т. 88, № 2. – С. 130−137.

4. W. Lemlikchi, Reaction of calcium phosphate with textile dyes for purification of wastewaters / W. Lemlikchia, P. Sharrock, M. O. O Mecherri, M. Fiallo, A. Nzihou // Desalination and Water Treatment. – 2014. – V. 52, № 7–9. – P. 1669–1673.

5. W. S. D. Solomon, Synthesis and study of silver nanoparticles / W. S. D. Solomon, M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, C. Boritz // Journal of Chemical Education. – 2007. – Vol. 84, № 2. – P. 322–325.

6. Г.А. Петропавловский, Гидрофильные частично замещенные эфиры целлюлозы и их модификация / Г.А. Петропавловский. – Л.: Наука. 1988. – 155 с.

РОЛЬ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОБУЧЕНИИ И ПАМЯТИ У ДРОЗОФИЛЫ ПРИ СТРЕССОРНОЙ РЕАКЦИИ НА ОСЛАБЛЕНИЕ ГЕОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

Никитина Екатерина Александровна
д.б.н., доцент, заведующий кафедрой анатомии и физиологии человека и животных РГПУ им. А.И. Герцена, главный научный сотрудник Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург
21074@mail.ru
Яковлева Раиса Владимировна
студент РГПУ им. А.И. Герцена, г. Санкт-Петербург
21074@mail.ru
Щеголев Борис Федорович
к.х.н., старший научный сотрудник Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург
shcheg@mail.ru

Влияние слабых магнитных полей на живые объекты, в том числе на биохимические реакции, протекание нервных процессов, что может приводить к развитию различных патологий, недостаточно изучено. Цель работы - изучение роли кинуреновой кислоты в процессах обучения и формирования памяти у дрозофилы при ослаблении геомагнитного поля. Характер обучения и формирования памяти у дрозофилы изучали при помощи метода условно-рефлекторного подавления ухаживания. Ослабление геомагнитного поля не влияло на процессы обучения как у линии дикого типа Canton S, так и у мутанта cn с накоплением нейропротектанта кинуреновой кислоты. Однако данное воздействие приводило к ухудшению процессов формирования среднесрочной памяти у обеих исследуемых линий.

Ключевые слова: *дрозофила; обучение; память; нейрокинуренины; кинуреновая кислота; геомагнитное поле*

ROLE OF KYNURENIC ACID IN *DROSOPHILA* LEARNING AND MEMORY IN STRESS RESPONSE TO GEOMAGNETIC FIELD ATTENUATION

Nikitina Ekaterina Alexandrovna
Dr.B. Sc, Associate Professor, Head of the Department of Anatomy and Physiology of Humans and Animals, Herzen University, Chief Researcher, Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg
21074@mail.ru
Yakovleva Raisa Vladimirovna
student of Herzen University, St. Petersburg
21074@mail.ru
Shchegolev Boris Fedorovich

C. Ch. Sc., Senior Researcher, Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg
shcheg@mail.ru

The influence of weak magnetic fields on living objects, including biochemical reactions, the implementation of nervous processes, which can lead to various pathologies, has not been sufficiently studied. The work purpose is to study the role of kynurenic acid in learning and memory formation processes in Drosophila when the geomagnetic field weakens. The learning and memory formation was studied using the conditioned courtship suppression method. Geomagnetic field attenuation did not affect learning processes in wild-type Canton S strain and cn mutant with accumulation of the neuroprotectant kynurenic acid. However, this effect led to medium-term memory formation disturbance in both strains.

Keywords: *Drosophila; learning; memory; neurokynurenines; kynurenic acid; geomagnetic field*

Непрерывно меняющееся магнитное поле Земли и его постоянное воздействие на жизнедеятельность всех живых организмов обусловливает важность и востребованность исследования магнитобиологических эффектов. Незаслуженно малоизученным остается влияние слабых магнитных полей на живые объекты. Наиболее пагубное влияние слабые магнитные поля в первую очередь способны оказывать на нервную систему, воздействуя на общие биохимические реакции организма, потенциал действия и проводимость нейронов, что может приводить к развитию различных патологий. Для современной нейрофизиологии и медицины крайне насущным и востребованным является изучение предпосылок возникновения социально-значимых болезней, в том числе нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) и геномных болезней, зачастую возникающих спорадически и являющихся полигенными синдромами [5]. Эти заболевания являются результатом сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов и индивидуальных особенностей генома, предрасполагающих к развитию болезни. Среди факторов, провоцирующих возникновение подобных заболеваний, большое значение имеют различные внешние стрессорные воздействия [4].

С биохимической точки зрения все НДЗ характеризуются нарушением содержания метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана (КПОТ) – нейрокинуренинов [3]. В последнее время в нейробиологии наметился возврат интереса к кинуренинам, обусловленный их вовлеченностью в целый ряд заболеваний (болезни Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона, боковой амиотрофический склероз), а также процессы старения [2]. Спонтанные мутации, приводящие к потере активности специфических ферментов КПОТ у дрозофилы приводят к накоплению соответствующего субстрата и уменьшению количества продукта. Такие «естественные нокауты» ферментов КПОТ позволяют оценивать роль специфических нейрокинуренинов. Единственным известным

среди нейрокинуренинов универсальным и эндогенным протектором, т.е. веществом, защищающим как от опухолеобразования, так и от нейродегенерации, является кинуреновая кислота. Поэтому в экспериментальной клинической медицине ведут направленный поиск и создание терапевтических средств, способствующих увеличению содержания кинуреновой кислоты. Кроме того, крайне важно проследить взаимосвязь между накоплением кинуреновой кислоты и реакцией организма на стресс. В этой связи целью работы являлось изучение роли кинуреновой кислоты в процессах обучения и формирования памяти у *Drosophila melanogaster* при ослаблении геомагнитного поля.

В качестве материала исследования использовали мух мутантной линии *cinnabar (cn)*, а также линии дикого типа *Canton-S D. melanogaster*. *cinnabar* – мутантная линия *D. melanogaster* (*cn*, 2R:43E16), характеризуется инактивацией фермента кинуренин-3-гидроксилазы (ЕС 1.14.13.9), что блокирует превращение кинуреновой кислоты в 3-гидроксикинуренин и, соответственно, приводит к ее накоплению. Для ослабления магнитного поля Земли была изготовлена закрытая экранирующая цилиндрическая камера с крышкой, представляющая собой трубу длиной L = 40 см и диаметром D = 10 см, на которую в одну сторону намотаны несколько слоев аморфного магнитомягкого материала АМАГ-172. Внутри камеры предусмотрена подставка из немагнитного материала, позволяющая устанавливать биологические объекты в центре экранирующей камеры. Измерение величины индукции магнитного поля в «рабочем объёме» камеры проводили при помощи 3-х компонентного магнитометра НВ0302.1А (0.1 – 100 мкТл). Геомагнитное поле в месте проведения экспериментов в камере было ослаблено в 35 раз. Характер обучения и формирования памяти у дрозофилы изучали при помощи метода условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) [1]. Обучение и память тестировали через разные интервалы времени: сразу после тренировки и через 3 часа. В каждой группе (контрольной, сразу после тренировки и через 3 часа после тренировки) тестировали не менее 20 пар мух. Статистическую обработку результатов проводили при помощи рандомизационного анализа ($p<0.05$).

У обеих исследуемых линий – линии дикого типа *Canton S* и мутантной линии *cinnabar* – в интактном контроле наблюдали условно-рефлекторное подавление ухаживания, индекс обучения (ИО) в течение 3-х часов сохранялся на высоком уровне (межлинейных отличий не наблюдали), что подтверждает нормальное протекание процессов обучения и памяти.

При ослаблении геомагнитного поля у линии дикого типа *Canton S* наблюдали снижение активности ухаживания. Сразу после тренировки отмечено условно-рефлекторное подавление ухаживания, что свидетельствует о нормальном протекании процессов обучения. Однако через 3 часа ИО достоверно снижался, что позволяет говорить о нарушении процессов формирования среднесрочной памяти.

После воздействия ослабленного геомагнитного поля у мутантной линии *cinnabar* активность ухаживания была достоверно выше, чем у линии дикого типа *Canton-S*. Это может быть связано с накоплением у данного мутанта нейропротективного вещества – кинуреновой кислоты. ИО при тестировании через 3 часа после тренировки достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки, что позволяет говорить об ухудшении процессов формирования среднесрочной (3-х часовой) памяти, как и у линии дикого типа.

На сегодняшний день, несмотря на то, что магнитобиологические эффекты воздействия различных магнитных полей описаны для многих живых организмов от бактерий до человека, понимание механизмов взаимодействия магнитных полей с биологическими объектами все ещё отсутствует, они достаточно плохо изучены. В силу известных трудностей экспериментальных исследований влияния гипомагнитного поля на человека, изучение механизмов данных воздействий с привлечением животных моделей представляет существенный интерес и важность для современной биологии и медицины. Одним из основных и часто используемых модельных организмов в генетических экспериментах является *Drosophila melanogaster*, использование которой позволяет изучать механизмы функциональных нарушений, лежащих в основе заболеваний человека, и помогает в разработке терапевтических подходов, в частности, с применением кинуреновой кислоты.

Работа выполнена при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030) (тема 63.1) и гранта РФФИ (№ 20-015-00300 А).

Список литературы

1. А.В. Журавлев, Е.А. Никитина, Е.В. Савватеева-Попова. Обучение и память у дрозофилы: физиолого-генетические основы. Успехи физиологических наук. Т. 46, № 1, 2015 г. – Минск: БГУ, 2015. – стр. 76-92.

2. А.В. Журавлев, Е.А. Никитина, Е.В. Савватеева-Попова. Роль кинуренинов в регуляции поведения и процессов памяти у дрозофилы. Интегративная физиология. Т. 1, № 1, 2020 г. – Минск: БГУ, 2020. – стр . 40–50.

3. И.П. Лапин, Стресс. Тревоги. Алкоголизм. Депрессия. СПб.: ДЕАН, 224 с.

4. Ослабленное магнитное поле Земли: влияние на транскрипционную активность генома, обучение и память у *Dr. melanogaster*. / Е.А. Никитина [и др.] //, Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. Т. 67, № 2, с. 246–256.

5. Е.В. Савватеева-Попова, Е.А. Никитина, А.В. Медведева. От нейрогенетики к нейроэпигенетике. Генетика. Т. 51, № 5, 2015 г. – Минск: БГУ, 2015. – стр 1–12.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЕРМЕНТА CATHEPSIN A ЧЕЛОВЕКА И МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Пинчук Полина Юрьевна
Магистрант кафедры химии и естественнонаучного образования учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова», г. Витебск
polina_mileeva@mail.ru
Чиркин Александр Александрович
д. б. н., профессор кафедры химии и естественнонаучного образования учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова», г. Витебск
chir@tut.by

Цель данной работы заключается в сравнении аминокислотных последовательностей и поиске сайтов связывания в третичной структуре фермента Cathepsin A (CTSA) у мыши (Mus musculus), свиньи (Sus scrofa), курицы (Gallus gallus domesticus), данио-рерио (Danio rerio) и моллюска (Biomphalaria glabrata) по отношению к человеку (Homo sapiens). Результаты работы позволяют рекомендовать изученных животных в качестве модельных организмов для изучения фермента Cathepsin A в биофармацевтических и биомедицинских исследованиях протеолиза.

Ключевые слова: *катепсин А; модельные организмы; биоинформатика; ранг; clustalX.*

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE CATHEPSIN A ENZYME OF HUMAN AND MODEL ORGANISMS

Pinchuk Polina Yurievna
Master student of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the educational establishment "Vitebsk State University named after P.M. Masherov", Vitebsk
polina_mileeva@mail.ru
Chirkin Alexandr Alexandrovich
Dr.B.Sc., Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the Educational Institution "Vitebsk State University named after P.M. Masherov", Vitebsk
chir@tut.by

The purpose of this work is to compare amino acid sequences and search for binding sites in the tertiary structure of the Cathepsin A (CTSA) enzyme in mice (Mus musculus), pigs (Sus scrofa), chickens (Gallus gallus domesticus), zebrafish (Danio rerio) and shellfish. (Biomphalaria glabrata) in relation to humans (Homo sapiens). The results of the work allow us to recommend the studied animals as model organisms

for studying the Cathepsin A enzyme in biopharmaceutical and biomedical studies of proteolysis.

Keywords: *cathepsin A; model organisms; bioinformatics; rank; ClustalX.*

Введение. Катепсины являются наиболее распространенными лизосомальными протеазами. Современные исследования раскрыли многие разносторонние функции катепсинов в лизосомах. Тем не менее, внеклеточные катепсины в основном активируются при патологических состояниях и вовлечены в широкий спектр заболеваний, включая рак и сердечно-сосудистые заболевания. Воспользовавшись дифференциальной экспрессией катепсинов при патологических состояниях многие исследования сосредоточены на использовании катепсинов в качестве диагностических маркеров и терапевтических мишеней.

Катепсин А представляет собой многофункциональный лизосомальный белок, который действует как карбоксипептидаза и образует комплексы с гликозидазами при pH от 4,5 до 5,5. Он проявляет амидазную и эстеразную активность при pH 7,0 [1]. Одна молекула катепсина А состоит из 438 аминокислотных остатков, собранных в две субъединицы – кортикальную и апикальную с молекулярными массами 32 кДа (Ala1-Arg284) и 20 кДа (Met285-Tyr438), соответственно.

Наследственный дефицит или точечные мутации в аминокислотной последовательности катепсина А (Q21R, S23Y, W37R, S61L, V104M, L208P, Y221N, Y351C, M365T, G389S, F398V) ингибируют образование димерных форм и комплексов с гликозидазами [2]. Деградация и инактивация β-галактозидазы и нейраминидазы отражаются вторичным дефицитом этих ферментов, что приводит к накоплению галактозаминогликанов и сиалогликосахаридов и, как следствие, к болезням накопления – мукополисахаридозу IV типа и галактосиалидозу [3].

Для изучения активности лизосомального фермента используют модельные организмы (мыши, свиньи, обезьяны). Однако из-за этических причин и дороговизны их применение сокращается. В то же время эксперименты на клеточных культурах не решают многие проблемы межклеточного взаимодействия в тканях организма, требуют специального оборудования, реагентов и специалистов морфологов.

Для достижения поставленной цели используется следующий алгоритм: поиск аминокислотных последовательностей → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур → расчёт коэффицента схожести двух последовательностей → расчёт ранга для каждого параметра → поиск 3D-модели белка человека → сравнение 3D-моделей фермента модельных организмов → поиск активного сайта и лагиндов.

Поиск аминокислотных последовательностей осуществлялся на сервере UniProt (https://www.uniprot.org/). Парное выравнивание первичных структур осуществлялась в программе ClustalX. Расчёт коэффициента схожести осуществлялся в этой же программе. Оценка степени гомологии первичных структур производилась на сайте BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cg). Для этого загружали аминокислотную последовательность в FASTA-формате человека и исследуемого животного. Полученные данные заносили в таблицу документа Microsoft Excel и рассчитали ранги для каждого параметра. Поиск 3D-модели белка человека осуществлялась на сайте RCSB PDB (https://www.rcsb.org). Сравнение 3D-моделей фермента катепсин А модельных организмов осуществлялся с помощью ресурса SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/). Поиск активного сайта и лигандов был выполнен с помощью этого же ресурса.

Результаты и их обсуждение

Полученные материалы позволяют положительно решить вопрос об использовании тканей мыши, свиньи, курицы, данио-рерио и легочных пресноводных моллюсков для моделирования патологических процессов человека, связанных с нарушениями системы протеолиза. Кроме того, из тканей высших млекопитающих и моллюсков доступно выделение фермента катепсин А, который может найти применение в фармакодинамических исследованиях регуляторов протеолиза и заместительной терапии.

Таблица 1 – Оценка гомологии первичных аминокислотных последовательностей фермента Cathepsin A с использованием ресурса BLAST

Организмы	BLAST					**Clustal**
	Score	Query cover	Expected value	Identities	Positives	
Mus musculus	2208	95%	0.0	88%	93%	0,12447
Sus scrofa	2261	95%	0.0	90%	95%	0,10692
Gallus gallus domesticus	1690	93%	0.0	68%	80%	0,32692
Danio rerio	1606	94%	0.0	64%	78%	0,36966
Biomphalaria glabrata	1315	98%	0.0	53%	69%	0,42685

Результат биоинформатического анализа первичных аминокислотных последовательностей фермента Cathepsin A человека и других модельных организмов с использованием ресурса BLAST представлен в таблице 1.

В результате биоинформатического анализа оказалось, что наиболее высокий процент гомологии характерен для мыши и свиньи – 88% и 90%, соответственно. Для курицы, рыбы и моллюска характерен средний уровень гомологии – 68%, 64% и 53%, соответственно. Данные можно считать

достоверными, так как процент покрытия запроса колеблется в промежутке 93-98%, что является достаточно высоким показателем.

Таблица 2 – Оценка рангов данных параметров

Организмы	Ранги				
	Score	Query cover	Expected value	Identities	Positives
1	2	3	4	5	6
Mus musculus	2	2	1	2	2
Sus scrofa	1	2	1	1	1
Gallus gallus domesticus	3	5	1	3	3
Danio rerio	4	4	1	4	4
Biomphalaria glabrata	5	1	1	5	5

Результат статистического анализа с расчётом ранга каждого параметра отображён в таблице 2. По результатам статистического анализа организмом с самым низким рангом и тем самым с наибольшей степенью гомологии оказалась свинья (ранг равен 1). Организм, имеющий наименьшую степень гомологии – *Biomphalaria glabrata* (ранг равен 5).

Результаты поиска сайтов связывания и лигандов приведены в таблице 3.

В результате поиска активных сайтов у модельных организмов большое количество совпадений было найдено у курицы и данио-рерио: Glu166, Asn72, Gly73, Gly74, Gys77, Ser167, His448 и Met449. У человека и моллюска 2 сайта связывания находятся рядом: у человека Asp462 и Met458, у моллюска Asp463 и Met459.

Заключение. Полученные данные доказывают, что мышь и свинья являются адекватными модельными организмами для человека. Однако близкое нахождение активных центров было найдено только с моллюском *Biomphalaria glabrata,* который является близким родственником с катушкой роговой *Planorbarius corneus*, обитающей в пресных водоёмах Беларуси. Сравнительный анализ первичных аминокислотных последовательностей фермента Cathepsin A у человека и *Biomphalaria glabrata* показал средний процент гомологии – 57,91%, с высоким процентом покрытия – 95%, также совпало и 2 связывающих лиганда – ацетат-ион (ACT) и глицерол (GOL). Следовательно, моллюск *Biomphalaria glabrata* может быть использован для изучения фермента Cathepsin A: анализ действия ингибиторов, активаторов, антиметаболитов, а также роли в системе протеолиза при фармакодинамических и биомедицинских исследованиях.

Таблица 3 – Активные сайты и лиганды модельных организмов

Вид	Активные сайты	Лиганды
Homo sapiens	Tyr211; Arg372; Arg375 Asn83; Gly84; Glu177	2×ACT
	Pro114; Leu465; Phe468	1×DMS
	Asn273; Tyr275; Asn276; Gly456; His457; Met458; Asp462 Ser210; Glu212; Gln213; Ser376; Asn378; Phe411; Ser414	2×GOL
	Pro105; Asp106; Thr339	1×NAG
	Gln422; Arg423; Lys442	1×SO_4
Mus musculus	Asn96; Gly97; Gly98; Cys101; Glu190; Ser191	1×ACT
	Asn286; Tyr288; Asn289; His469; Met470; Asp474	1×GOL
	Ser223; Glu.225; Cln226; Ser388; Asn390; Phe423; Ser426	1×SO_4
Sus scrofa	Asn98; Gly.99; Gly100; Cys103; Glu192; Ser193; His472	1×ACT
	Asn288; Tyr290; Asn291; Gly471, His472; Met473; Asp477	1×GOL
	Pro120; Asp121; Thr354	1×NAG
Gallus gallus domesticus	Asn72; Gly73; Gly74; Cys77; Glu166; Ser167; His448	1×SO_4
	Asn262; Tyr264; Asn265; Gly447; His448; Met449; Asp453	1×GOL
Danio rerio	Asn72; Gly73; Gly74; Cys77; Glu166; Ser167; His448.	1×ACT
	Asn262; Tyr264; Asn265; Gly447; His448; Met449; Asp453	1×GOL
	Cln414; Arg415; Lys433	1×SO_4
Biomphalaria glabrata	Asn75; Gly76; Gly77; Cys80; Glu169; Ser170; His458	1×ACT
	Asn270; Tyr272; Asn273; Gly457; His458; Met459; Asp463	1×GOL

Список литературы

1. A.V. Pshezhetsky, Lysosomal carboxypeptiodase A / A.V. Pshezhetsky [et al.] // Hand-book of Proteolytic Enzymes. – 1998. – №2. – P. 1923–1929.

2. M. Shimoyo, Protective protein gene mutations in galactosialidosis / M. Shimoyo [et al.] // J Clin Invest. – 1993. - №91. – P.2393–2398.

3. J. Tranchemontagne, lysosomal carboxypeptidase activity in galactosialidosis / J. Tranchemontagne [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 1990. - №168. – P. 22–29.

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ M21R И K48R УВЕЛИЧИВАЮТ СРОДСТВО ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА К ЕГО РЕЦЕПТОРУ

Побойнев Виктор Витольдович
ассистент кафедры общей химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь
dremozzew@mail.ru
Козел Владислав Александрович
студент лечебного факультета учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь
vladislavk200302@gmail.com
Козел Александр Ромуальдович
старший преподаватель кафедры общей химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь
arkozel1977@gmail.com

В данной статье проанализирована стабильность вторичной структуры эпидермального фактора роста человека. Определены амилоидогенные фрагменты и аминокислотные остатки, склонные к структурным переходам. Установлено, что аминокислотные замены M21R и K48R повышают внутреннюю нестабильность белка и увеличивают его аффинность к рецептору.

Ключевые слова: *эпидермальный фактор роста человека; бета-тяж; бета-амилоид; аминокислотная замена; аффинность; синдром диабетической стопы*

AMINO ACID SUBSTITUTIONS M21R AND K48R INCREASE THE AFFINITY OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR TO ITS RECEPTOR

Victor Vitoldovich Poboinev
assistant professor of the Department of General chemistry ofthe Educational Institution «Belarusian State Medical University», Minsk, Belarus
dremozzew@mail.ru;
Vladislav Alexandrovich Kozel
student of the faculty of General medicine of the Educational Institution «Belarusian State Medical University», Minsk, Belarus
vladislavk200302@gmail.com
Aleksander Romualdovich Kozel

senior teacher of the Department of General chemistry
ofthe Educational Institution «Belarusian State Medical University»,
Minsk, Belarus
arkozel1977@gmail.com

In this article stability of the secondary structure of the human epidermal growth factor has been analyzed. Amyloidogenic fragments and amino acid residues prone to structural shifts have been identified. It has been established that amino acid substitutions M21R and K48R increase the intrinsically disorder of the protein and increase its affinity to the receptor.

Key words: *human epidermal growth factor; beta-sheet; beta-amyloid; amino acid substitution; affinity; diabetic foot syndrome*

По оценкам ВОЗ количество людей, страдающих сахарным диабетом (СД) на 2014 год составило 422 млн человек [1]. Преждевременная смертность от диабета возросла на 5% за период с 2000 по 2016 год [1]. В Республике Беларусь, распространенность основных типов СД возросла с 110,55 до 188,37 на 100000 человек (для СД I типа) и с 995,65 до 3331,9 на 100000 человек (для СД II типа) в период с 2009 до 2019 год [2]. На начало 2020 года под наблюдением состояло 352538 пациентов с СД, из них 18110 с СД I типа, в т.ч. 2438 детей [2].

Одним из основных осложнений сахарного диабета является синдром диабетической стопы, который представляет собой комплекс анатомо-функциональных изменений, развивающихся на фоне диабетической нейропатии, микро- и макроангиопатии, остеоартропатии, способствующих повышенной травматизации и инфицированию мягких тканей стопы, развитию гнойно-некротического процесса и в запущенных случаях ведущий к ампутации. У пациентов с СД снижается концентрация эпидермального фактора роста в тканях [3], нехватка которого ухудшает заживление ран, что приводит к хроническим незаживающим ранам, а иногда и к возможной ампутации. Ишемическая язва диабетической стопы является наиболее трудной для лечения и сопряжена с наибольшим риском ампутации. Введение эпидермального фактора роста глубоко в дно и контуры раны способствует более эффективному росту грануляционной ткани и закрытию раны. В эксперименте было также показано, что введение эпидермального фактора роста как мышам, страдающим сахарным диабетом, так и контрольной группе вызывает снижение уровня глюкозы и увеличение секреции инсулина [3].

Цель работы является проведение анализа стабильности структуры эпидермального фактора роста человека и определение влияния аминокислотных замен на его аффинность к рецептору.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования в данной работе использовали аминокислотную последовательность эпидермального фактора роста человека (ЭФРЧ) (PDB ID: 1IVO, цепь C).

Амилоидогенные фрагменты в ЭФРЧ определяли с помощью программы FoldAmyloid [4]. Стабильность структуры ЭФРЧ, так же, как и влияние аминокислотных замен на неё оценивали с помощью оригинальных алгоритмов PentUnFOLD [5] и PentaFold 3.0 [6]. Влияние аминокислотных замен на возможность осуществления структурных переходов определяли с помощью алгоритма PentUnFOLD. 3D модели ЭФРЧ, содержащие аминокислотную замену, строили при помощи программы Swiss-Model, в качестве шаблона использовав 3D модель ЭФРЧ с PDB ID: 1IVO (цепь C). С помощью программы HEX 8.0.0 проводили докинг ЭФРЧ, содержащего аминокислотную замену, с его рецептором. Изменение свободной энергии Гиббса при 37°C рассчитывали с помощью программы Prodigy [7]. Изменение аффинности мутантного эпидермального фактора роста к его рецептору также оценивали на основании ΔΔG и при помощи программы mCsM-PPI2 [8]. Значение ΔΔG должно быть максимальным (положительным), так как данный рассчитывается как разность $\Delta G_{нативного}$ и $\Delta G_{мутантного}$ эпидермального фактора роста.

Результаты исследования и их обсуждение. Эпидермальный фактор роста человека состоит из 53 аминокислотных остатков. Данный белок относится к группе нефолдируемых белков, т. е. для приобретения пространственной структуры данному белку необходимы «ассистенты» фолдинга. Действительно, согласно алгоритму PentaFold 3.0, лишь 5 аминокислотных остатков признаны стабильными: Cys20, Met21, Tyr22, Cys33, Tyr37. Ещё 6 аминокислотных остатков являются метастабильными: Ile23, Ala30, Cys31, Asn32, Ile38, Arg41 (Рисунок). N- и C-концы белка являются нестабильными, так же, как и койл между первым и вторым и между третьим и четвёртым бета-тяжами.

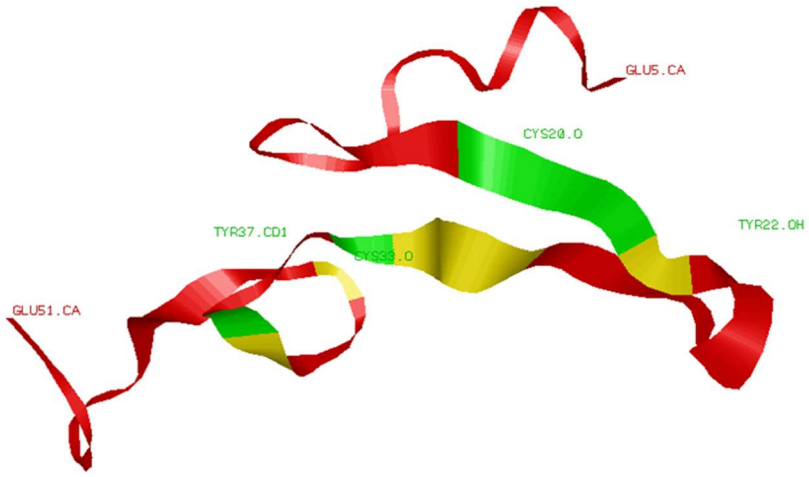


Рисунок 1 – Стабильность структуры эпидермального фактора роста человека (PDB ID: 1IVO, цепь C). Зелёным обозначены стабильные элементы вторичной структуры, красным – нестабильные, жёлтым – метастабильные

Таблица 1 – Стабильность структуры эпидермального фактора роста человека

№ АК	DSSP	1D	2D	№ АК	DSSP	1D	2D	№ АК	DSSP	1D	2D
1 N				19 V	E	EN	EN	37 Y	E	ES	ES
2 S				20 C	E	ES	ES	38 I	E	ES	ES
3 D				21 M	E	ES	ES	39 G	C		
4 S				22 Y	E	ES	ES	40 E	C		
5 E	C			23 I	E		ES/D	41 R	C		
6 C	C			24 E	C			42 C	C	ES/D	CE
7 P	C			25 A	C			43 Q	C	EN/D	CE
8 L	C			26 L	C	HS	CH	44 Y	E	EN/D	ES/D
9 S	C			27 D	C	HS	CH	45 R	E		ES
10 H	C			28 K	E	HS	ES/D	46 D	C	CH	CH
11 D	C			29 Y	E	HS	EN/D	47 L	C		
12 G	C			30 A	E		EN	48 K	C	CE	CE
13 Y	C	EN	CE	31 C	E		ES	49 W	C		
14 C	C	ES	CE	32 N	E	ES	ES	50 W	C		
15 L	C			33 C	E	ES		51 E	C		
16 H	C			34 V	C	ES	CE	52 L			
17 D	C			35 V	C	ES	CE	53 R			
18 G	C			36 G	C	ES	CE				

Согласно DSSP в эпидермальном факторе росте человека находятся четыре коротких бета-тяжа: Val19-Tyr23, Lys28-Cys33, Tyr37-Ile38, Tyr44-Arg45, остальные аминокислотные остатки входят в состав койла. Согласно алгоритму PentUnFOLD первый бета-тяж является стабильным, однако способен к укорочению на один аминокислотный остаток с N-конца, так как Val19 по двум версиям алгоритма PentUnFOLD (таблица 1) и по алгоритму PentaFOLD 3.0 является нестабильным. N-конец второго бета-тяжа является нестабильным по двум алгоритмам. Структура данного бета-тяжа поддерживается благодаря первому «активному» бета-тяжу. Третий бета-тяж является стабильным, а четвёртый – способен к переходу в полностью неструктурированное состояние.

Ряд аминокислотных остатков способны к структурному переходу от койла в бета-тяж: Val34, Val35, Gly36, Cys42, Gln43, Lys48 (таблица 1).

Согласно алгоритму, FoldAmyloid в ЭФРЧ выделяют два амилоидогенных фрагмента: Cys20-Glu24 и Cys42-Leu52. Наличие амилоидогенных фрагментов, а также аминокислотных остатков, склонных к структурным переходам от койла в бета-тяжи может способствовать снижению терапевтического эффекта препарата, действующим компонентом которого является ЭФРЧ. Поэтому проведение *in silico* мутагенеза должно быть направлено в том числе и на снижение вероятности образования бета-амилоида. Аминокислотные остатки, выбранные для проведения *in silico* мутагенеза, меняли на 19 возможных вариантов. Следовательно, общее количество проведённых замен составило 437.

Таблица 2 – Стабильность структуры эпидермального фактора роста человека

Аминокислотная замена	ΔΔG mCsM-PPI2	ΔΔG PRODIGY	Аминокислотная замена	ΔΔG mCsM-PPI2	ΔΔG PRODIGY
L15E	-1,365	0,2	Y29D	-0,949	0
L15S	-0,978	0,1	Y29E	-0,839	0
M21K	0,244	-0,1	Y29K	-0,768	0,1
M21R	**0,515**	**0,3**	Y29M	-0,762	-0,1
M21H	-0,389	-0,2	Y29T	-0,776	0
M21D	-0,212	-0,4	Y29A	-0,759	-0,1
M21T	-0,067	-0,1	Y29G	-1,124	-0,1
M21E	-0,075	-0,3	Y29Q	-0,767	0
M21Q	0,02	-0,3	Y29R	-0,827	0,2
L26P	-1,993	-0,3	Y44A	-1,001	0,6
L26A	-1,149	-0,2	Y44G	-1,331	0,9
L26G	-1,485	-0,2	R45D	-1,294	-0,1
L26T	-0,812	0,5	L47S	-2,191	0,2
L26D	-1,300	0	L47D	-2,959	0,2
L26S	-1,082	0,4	**K48R**	**1,386**	**0,2**
K28D	-0,215	0			

Используя оригинальный алгоритм PentUnFOLD выявлено 31 аминокислотная замена, повышающая внутреннюю нестабильность ЭФРЧ, что может повышать его сродство к рецептору. Для оценки влияния данных аминокислотных замен на аффинность ЭФРЧ к его рецептору были построены модели нативного ЭФРЧ и модели ЭФРЧ с аминокислотной заменой и определены значения ΔΔG. Наибольшие положительные значения по двум

алгоритмам характерны для аминокислотных замен M21R и K48R (таблица 2). При этом данные аминокислотные замены не увеличивают амилоидогенный потенциал ЭФРЧ согласно алгоритму FoldAmyloid.

Заключение. В результате проведенных in-silico экспериментов установлено, что ЭФРЧ отличается нестабильной вторичной структурой. Шесть аминокислотных остатков способны к структурному переходу от койла в бета-тяжи. Удлинение активных бета-тяжей может способствовать формированию бета-амилоида, так как установлено, что в ЭФРЧ имеются два амилоидогенных фрагмента: Cys20-Glu24 и Cys42-Leu52. Аминокислотные замены M21R и K48R увеличивают внутреннюю нестабильность ЭФРЧ и повышают его аффинность к рецептору, не увеличивая при этом амилоидогенный потенциал ЭФРЧ.

Список литературы

1. Диабет [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – Режим доступа: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/diabetes. – Дата обращения: 07.09.22.

2. Т. В. Мохорт, Сахарный диабет: обновление классификации и особенности диагностики различных типов: учебно-методическое пособие / Т. В. Мохорт, А. П. Шепелькевич, Е. И. Шишко. – Минск: БГМУ, 2021. – 39 с.

3. Epidermal growth factor increases insulin secretion and lowers blood glucose in diabetic mice // H. Y. Lee [et al.] // J. Cell Mol. Med. – 2008. – Vol. 12. – P. 1593–1604.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ В КОНТАКТАХ, ФОРМИРУЕМЫХ СТРУКТУРНО НЕУПОРЯДОЧЕННЫМ ФРАГМЕНТОМ БОЛЬШОГО ПРИОННОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА

Побойнев Виктор Витольдович
ассистент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
dremozzew@mail.ru
Хрусталёв Владислав Викторович
д.б.н., доцент, заведующий кафедрой общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
vvkhrustalev@mail.ru
Ачинович Ольга Владимировна
к.б.н., доцент, доцент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
achinovichov@yandex.by
Петрушенко Людмила Григорьевна
к.х.н., доцент, доцент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
petrushenkolg@mail.ru

В работе изучена конформация 20 наиболее вероятных моделей трёхмерного строения большого прионного белка человека из файла 2LSB. Установлено, что, несмотря на существенные различия в конформации 20 моделей, неструктурированная часть каждой из них взаимодействует с определёнными фрагментами структурированной части (остатками Tyr128, Met129, Tyr162, Ile182), по всей видимости, стабилизируя конформацию второй альфа-спирали.

Ключевые слова: *большой прионный белок человека, неструктурированное состояние; альфа-спираль; бета-структура; конформация.*

REGULARITIES IN CONTACTS FORMED BY THE INTRINSICALLY DISORDERED FRAGMENT OF HUMAN MAJOR PRION PROTEIN

Poboinev Victor Vitoldovich
Assistant Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
dremozzew@mail.ru
Khrustalev Vladislav Victorovich
Dr.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
vvkhrustalev@mail.ru
Achinovich Olga Vladimirovna

C.B.Sc., Associate Professor, Associate Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
achinovichov@yandex.by
Petrushenko Ludmila Grigorievna
C.Ch.Sc., Associate Professor, Associate Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
petrushenkolg@mail.ru

In this work we have studied conformation of 20 most probable models of three-dimensional structure of human major prion protein from the file 2LSB. We have found out that, even though there are significant differences in conformation of those 20 models, intrinsically disordered part of each of them interacts with certain fragments from the ordered part (residues Tyr128, Met129, Tyr162, Ile182), most likely providing stabilization to the conformation of the second alpha helix.

Key words: *human major prion protein; disordered state; alpha helix; beta structure; conformation.*

Прионный белок человека интересен не только тем, что способен в определённых условиях переходить из преимущественно альфа-спиральной конформации в преимущественно бета-структурную, но и тем, что его N-концевая половина является структурно неупорядоченной (IDPR). Как правило, по результатам рентгеноструктурного анализа удаётся определить расположение в пространстве аминокислотных остатков начиная с Leu125 (нумерация включает сигнальный пептид). Таким образом, 103 из 208 остатков этого белка являются «неуловимыми» для кристаллографического анализа (аминокислотные остатки 1-22 входят в состав сигнального пептида). Результаты ядерно-магнитного резонанса в водном растворе также дают совпадение для 20 наилучших моделей лишь в структурированной С-концевой половине прионного белка, а для N-концевого фрагмента эти модели имеют совершенно разные координаты атомов (рисунок 1а). Именно так можно себе представить поведение IDPRs в растворе: они имеют множество существенно отличающихся конформаций с примерно одинаковым уровнем свободной энергии.

Причины потери, определённой конформации фрагментом полипептидной цепи, могут быть найдены с помощью оригинального алгоритма PentUnFOLD. Основной идеей этого алгоритма является разделение структурно неустойчивых фрагментов белков на две группы: на те, которые могут существовать во множестве конформаций, и на те, которые могут формировать два разных типа вторичной структуры [1]. Помимо расчёта вероятности структурных переходов алгоритм находит контакты между аминокислотными остатками (водородные связи, ионные контакты, гидрофобные контакты, катион-пи взаимодействия, ароматические взаимодействия, взаимодействия между серой и ароматической системой, дисульфидные связи). С помощью алгоритма PentUnFOLD мы

попытались найти некоторые закономерности в контактах, которые образует неструктурированная часть прионного белка с его структурированной частью.

Цель настоящего исследования – анализ контактов между аминокислотными остатками из N-конца большого прионного белка человека с его структурированным фрагментом.

В качестве материала использован файл PDB с идентификатором 2LSB, включающий 20 наиболее вероятных трёхмерных моделей прионного белка человека, полученных по результатам ядерно-магнитного резонанса в водном растворе фрагмента этого белка (остатки 90 – 231) в 1,5 мМ ацетатном буфере с pH=5,5 при температуре 25°C [2]. Каждая из 20 моделей отдельно обрабатывалась алгоритмами PentUnFOLD 3D [1] и PIC [3]. Далее подсчитывали количество контактов между каждым из остатков неструктурированной части (остатки 90 – 127) и структурированной части белка (остатки 128 – 231) для всех 20 моделей. Фрагменты из неструктурированной части прионного белка, склонные к структурным переходам, находили с помощью PentUnFOLD 2D.

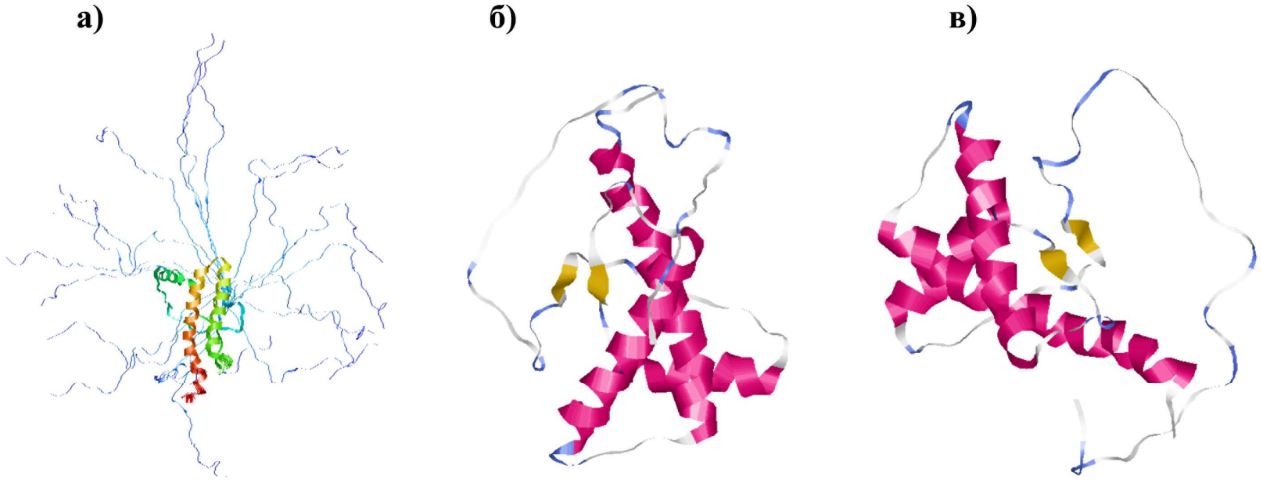


Рисунок 1 – Трёхмерная структура прионного белка человека из файла 2LSB: все 20 наилучших моделей (а); первая модель, на которой продемонстрированы контакты неструктурированной части белка со второй альфа-спиралью (б); четвёртая модель, на которой продемонстрированы контакты неструктурированной части белка с третьей альфа-спиралью

Наиболее часто (рисунок 2) с неструктурированной частью взаимодействуют такие остатки прионного белка человека, как Tyr162 (из второго бета-тяжа), Tyr128 и Met129 (из первого бета-тяжа), Ile182 (из второй альфа-спирали). С этими аминокислотными остатками контактируют Val122, Leu125, Gly126 и Gly127 из гидрофобного фрагмента (112-MAGAAAAGAVVGGLGG-127), расположенного непосредственно перед началом структурированной части белка. Как видно на рисунке 1б, упомянутый выше гидрофобный фрагмент сближен с двумя короткими гидрофобными бета-

тяжами и с гидрофобной стороной второй альфа-спирали. Известно, что вторая альфа-спираль является склонной к переходу в бета-структурное состояние [4]. По всей вероятности, именно контакты с неструктурированным гидрофобным фрагментом, который, кстати, является весьма консервативным, стабилизируют вторую альфа-спираль в полноразмерном белке. Такие контакты, тем не менее, имеют несколько возможных вариантов, что делает упомянутый фрагмент структурно неустойчивым.

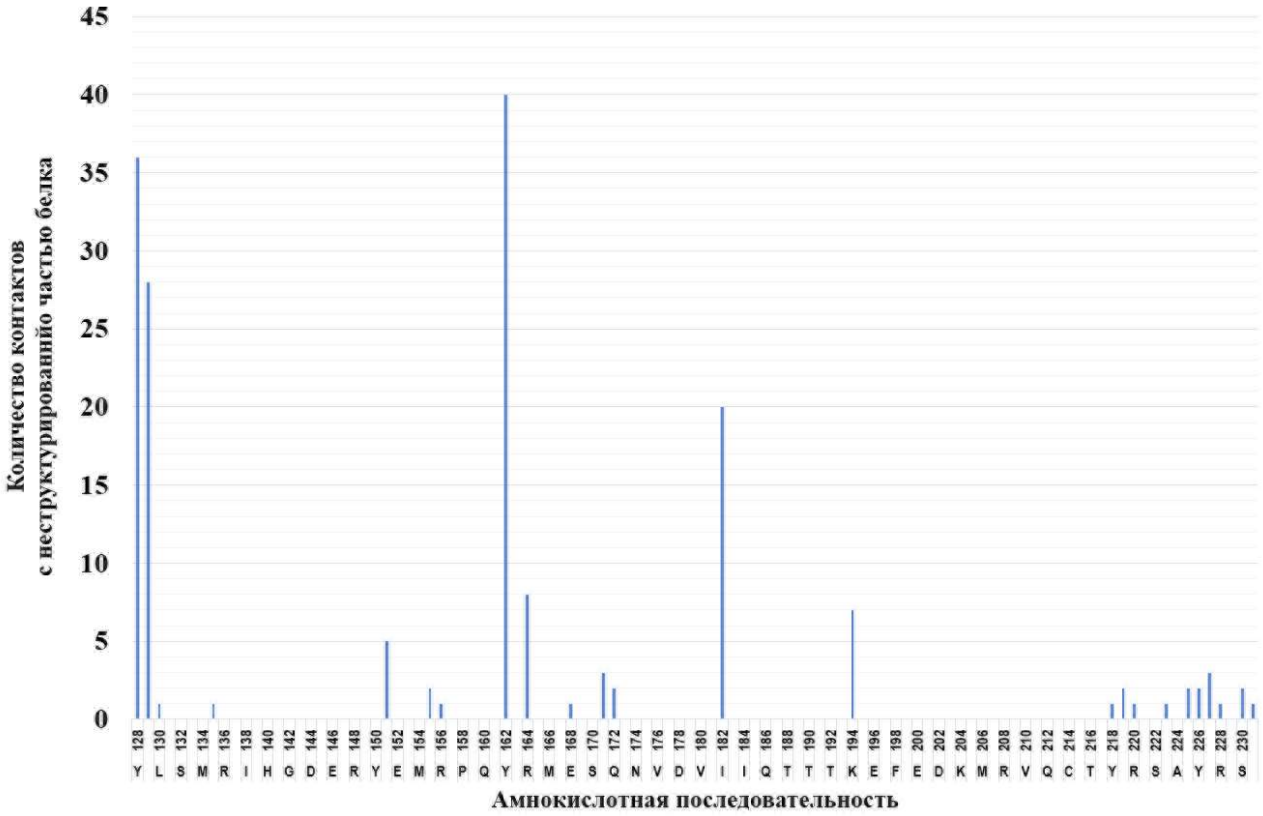


Рисунок 2 – Количество контактов, образуемых каждым аминокислотным остатком из структурированной части большого прионного белка человека (в сумме для 20 моделей) с его неструктурированной частью

Помимо гидрофобных контактов неструктурированная часть большого прионного белка может давать водородные связи, формируемые боковыми цепями, и ионные контакты с третьей альфа-спиралью (рисунок 1в). Такие контакты также могут стабилизировать конформацию прионного белка. Полученные в данной работе результаты могут объяснить, почему пептид CC36, соответствующий аминокислотной последовательности С-концевой половины второй альфа-спирали и N-концевой половины третьей альфа-спирали, а также петли между ними, приобретает в водном растворе преимущественно бета-структурную конформацию [4]. В отсутствии контактов с неструктурированной частью дестабилизируется конформация структурированной. Такая

дестабилизация может происходить, в том числе, после связывания катионов металлов с остатками гистидина из пяти тандемных повторов (остатки 51 – 91) в неструктурированной части большого прионного белка человека.

Внутри неструктурированной части прионного белка на каждой из 20 моделей присутствуют некоторые контакты между аминокислотными остатками, включая водородные связи. Таким образом, утверждать, что неструктурированный фрагмент прионного белка полностью лишён вторичной и третичной структуры, нельзя. По результатам работы PentUnFOLD 2D во фрагменте 90 – 127 есть только один «абсолютно неструктурированный» пентапептид: 101-KPSKP-105. Второй пентапептид, склонный к переходу в неструктурированное состояние: 94-GTHSQ-98. Есть и участки, способные к переходу в альфа-спиральное состояние из петли: пентапептиды с центром на Trp99, Met109, His111, Met112. Один из участков (120-AVVG-123) гидрофобного фрагмента, упомянутого выше, склонен к формированию бета-тяжа.

Согласно структурному классификатору SCOP большой прионный белок человека относится к классу A+B (альфа+бета). Ранее нами было показано, что данный класс белков содержит больше фрагментов, склонных как к структурным переходам, так и к переходу в полностью неупорядоченное состояние по сравнению с белками других структурных классов [5]. Также нами продемонстрировано, что именно в данном классе белков частота встречаемости гидрофобных остатков в нестабильных фрагментах белков выше, чем в таких же фрагментах белков других структурных классов [5]. Не является и исключением большой прионный белок человека, в котором гидрофобный фрагмент 112-MAGAAAAGAVVGGLGG-127 из неструктурированной части белка взаимодействует со второй альфа-спиралью Asn171-Thr193, склонной к структурному переходу в бетя-тяж. Таким образом, хочется ещё раз подчеркнуть мысль о том, что структурированное состояние белка определено его упорядоченной неструктурированностью. Потеря взаимодействия между ключевыми аминокислотными остатками из обеих частей белка способствует структурным переходам с изменением как конформации белка, так и его функции.

Вывод

Фрагменты неструктурированной части большого прионного белка человека взаимодействуют с аминокислотными остатками из его структурно неустойчивых второй и третьей альфа-спиралей, стабилизируя их конформацию.

Список литературы

5. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins / V. V. Poboinev [et al.] // Amino Acids. – 2022. – Vol. 54. – P. 1155–1171.

6. Structural basis for the protective effect of the human prion protein carrying the dominant-negative E219K polymorphism / I. Biljan [et al.] // Biochem J. – 2012. – Vol. 446. – P. 243–251.

7. Tina, K. G. PIC: Protein Interactions Calculator / K. G. Tina, R. Bhadra, N. Srinivasan // Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35. – P. 473–476.

8. The part of a long beta hairpin from the scrapie form of the human prion protein is reconstructed in the synthetic CC36 protein / V. V. Khrustalev [et al.] // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2016. – Vol. 84. – P. 1462–1479.

9. Побойнев, В. В. Стабильность древних белков заключается в их упорядоченной нестабильности / В. В. Побойнев, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Биологически активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности», посвящённой 50-летию Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси. – 2021. – С. 392–397.

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА IN SILICO БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО АЛКИН-ХОЛЕСТЕРИН КОНЪЮГАТА

Позняк Глеб Игоревич
Магистрант химического факультета Белорусского государственного университета, г. Минск
hlebpozniak@gmail.com
Фалетров Ярослав Вячеславович
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов НИИ ФХП БГУ, г. Минск
yaroslav82@tut.by
Шкуматов Владимир Макарович
д.б.н., профессор, член-кореспондент НАН Беларуси, заведующий лабораторией биохимии лекарственных препаратов НИИ ФХП БГУ, г.Минск
biopharm@bsu.by

Поскольку холестерин и гидроксихолестеролы играют множество важных ролей в организме, их содержание необходимо контролировать. Отслеживание транспортных путей холестерина является на сегодняшний день значимой проблемой ученого сообщества. Алкиновые производные стали популярными инструментами благодаря возможности обнаружения внутри клеток с использованием либо клик-химии CuAAC [1], либо подходов рамановской спектроскопии [2]. Меченые аналоги холестерина используются в качестве молекулярных инструментов для понимания поглощения, распределения и метаболизма молекул [3, 4, 1].

Ключевые слова: *холестерин, транспорт холестерина, клик-химия, рамановская спектроскопия*

SYNTHESIS AND IN SILICO EVALUATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF A NEW ALKYNE-CHOLESTEROL CONJUGATE

Poznyak Gleb Igorevich
Master student of the Faculty of Chemistry, Belarusian State University, Minsk
hlebpozniak@gmail.com
Faletrov Yaroslav Vycheslavovich
C.Ch.Sc., Associate Professor, Leading Researcher laboratory of biochemistry of drugs Research Institute of FHP BSU, Minsk
yaroslav82@tut.by
Shkumatov Vladimir Makarovich
Dr.B.Sc., Professor, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Head of the Laboratory of Biochemistry of Medicinal Products of the Scientific Research Institute of Physical Chemistry of Belarusian State University, Minsk
biopharm@bsu.by

Since cholesterol and hydroxycholesterols play many important roles in the body, their content must be controlled. Tracking cholesterol transport pathways is a significant problem in the scientific community today. Alkyne derivatives have become popular tools due to the ability to detect within cells using either CuAAC click chemistry [1] or Raman spectroscopy approaches [2]. Labeled cholesterol analogues are used as molecular tools to understand the uptake, distribution, and metabolism of molecules [3, 4, 1].

Keywords: *cholesterol, cholesterol transport, click chemistry, Raman spectroscopy*

Материалы и методы.

Путем конъюгации холестеролхлорформиата с 3-этиниланилином было получено производное стерола (CCF-EtAn) (Рисунок 1.).

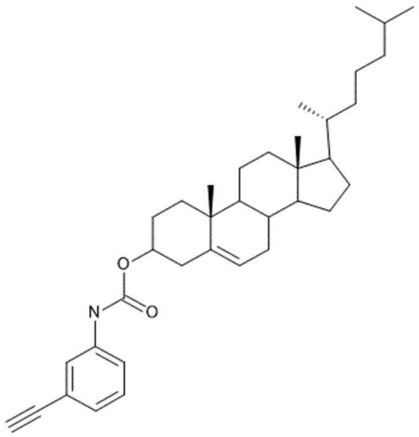


Рисунок 1 – Конъюгант холестеролхлорформиата и 3-этиниланилина (CCF-EtAn)

Чистоту и идентичность CCF-EtAn подтверждали с помощью ТСХ (Rf=0.7, SiO2, элюент бензол:этанол 4:1) и ^{1}H-ЯМР (500 МГц, CDCl3, δ = 6.59 (c, 1H), 5.46 (дд, J = 4.9, 2.4 Гц, 1H) (B-кольцо =CH-), 4.65 (tt, J = 11.5, 4.8 Гц, 1H) (алкин). Структура признана новой из-за отрицательных результатов поиска идентичной структуры. в базе данных Pubchem, но структура алкин-холестерина CID102257532 является его п-этинильным аналогом, а CID102080258 является его надстройкой.

Результаты и обсуждение. Биологические свойства CCF-EtAn оценивали in silico с использованием сервера PerMM (для проницаемости фосфолипидной мембраны) [5] и обратного высокопроизводительного виртуального скрининга потенциальных мишеней среди 1000 случайно выбранных структур PDB стеролсвязывающих белков с использованием Autodock Vina [6] и вспомогательного инструмента FYTdock [7]. Результаты расчетов PerMM

(параметры: pH 7.35, T = 37 °C): свободная энергия связывания -10 ккал/моль, логарифм коэффициентов проницаемости для плазматической мембраны, моделей ГЭБ и Caco-2 составил +3, -1.84 и -2.71 соответсвенно. Результаты докинга выявили много совпадений, и в топ-5 вошли структуры PDB цитохромов P450, а именно 5frb и 6q2t (CYP51) с энергией связывания (Ebind) -14.6 и -13.9 соответственно, 3mzs и 3na0 (CYP11A1) с Ebind -14.3 и -14.0 соответственно, а также 6bd6 (CYP3A4) с Ebind -13.8.

Выводы. Получено холестероилированное производное 3-этиниланилина, произведена очистка и подтверждена структура. Проведено компьютерное моделирование и расчет проницаемости через мембрану. Полученные данные говорят в пользу хорошей проницаемости фосфолипидных мембран для CCFEtAn. Планируются дальнейшие разработки в данном направлении.

Финансирование работы. Работа проведена при поддержке грантов ГПНИ № г.р. 20210560 (Я.В.Фалетров, В.М. Шкуматов).

Список литературы

1. Walking pathways with positive feedback loops reveal DNA methylation biomarkers of colorectal cancer / Alexander Kel [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2019. – Vol. 20, N 119. doi:10.1186/s12859-019-2687-7.

2. Tracking intracellular uptake and localisation of alkyne tagged fatty acids using Raman spectroscopy / Lauren E. Jamieson [et al.] // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2018. – Vol. 197. – P. 30–36. https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.01.064

3. Взаимодействие нитробензоксадиазольных производных пиперазина и анилина с бычьим сывороточным альбумином in silico и in vitro / Я. В. Фалетров [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Химия. 2021. – №2. – С. 25-35.

4. Новые липофильные конъюгаты флуоресцирующего NBD-пиперазина: синтез, in silico взаимодействие с липидным бислоем и цитохромами P450 / Я. В. Фалетров [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2022. – Т. 58, № 1. – С. 62–67. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-1-62-67

5. A. L. Lomize, Anisotropic Solvent Model of the Lipid Bilayer. 2. Energetics of Insrtio of Small Molecules, Peptides, and Proteins in Membranes / A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, H. I. Mosberg // J. Chem. Inf. Model. – 2011. – Vol. 51, N 4. – P. 930–946. https://doi.org/10.1021/ci200020k

6. O. Trott, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / O. Trott, A. J. Olson // J. of Computational Chemistry. – 2009. – Vol. 31, N 2. – P. 455–461.

7. PREPRINT /Y.V., Faletrov, V.A., Staravoitava, A.R. Dudko [et al]//. – (2022) (Version 1) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1456627/v1].

ПОИСК ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 – АССОЦИИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ, ПОЛУЧАВШИХ ЛЕЧЕНИЕ ПЛАЗМОЙ ИММУННОЙ, АНТИ-COVID-19

Потапнев Михаил Петрович
д.м.н., профессор, зав. отделом клеточных биотехнологий государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологии», г. Минск
mpotapnev@yandex.by
Карпенко Федор Николаевич
к.м.н., директор государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологии», г. Минск
fedor-doc@tut.by
Дунаев Игорь Анатольевич
к.м.н., врач-трансфузиолог государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологии», г. Минск
dunaev05@mail.ru
Гущина Лариса Михайловна
зам. директора по трансфузиологии, государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологии», г. Минск
gushchina73@mail.ru
Максимович Алексей Владимирович
млад. научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологии», г. Минск
alem.wrd@gmail.com
Лицкевич Павел Владимирович
млад. научный сотрудник лаборатории биологии и генетики стволовых клеток государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологии», г. Минск
pavlentiy.litskevich25@gmail.com
Ваганова Татьяна Владимировна
врач-трансфузиолог государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологии», г. Минск
vaganova@blood.by

Вищеня Людмила Болеславовна
врач-трансфузиолог учреждения здравоохранения «Солигорская центральная районная больница», г. Солигорск
mila.vishenya@mail.ru
Ковалева Татьяна Анатольевна
главный врач учреждения здравоохранения «Витебская областная клиническая больница», г. Витебск
tania_kov@mail.ru
Стычневская Елена Владимировна
зав. отделением учреждения здравоохранения «Витебская областная клиническая больница», г. Витебск
luna269@yandex.by

В статье проведен анализ роль лабораторных показателей в оценке эффективности применения плазмы иммунной, анти-COVID-19 для лечения пациентов с COVID-19 - ассоциированной пнемонией. Сравнение групп пациентов с выздоровлением (n = 36) или со смертельным исходом (n=27) показало, что нормализация после применения плазмы иммунной, анти-COVID-19 показателей содержания лимфоцитов, значения показателей нейтрофильно-лимфоцитарного индекса, скорости оседания эритроцитов, С-реактивного белка обладает важным прогностическим значением, отражающим благоприятной исход заболевания пациентов. Отсутствие динамики к нормализации показателей после применения плазмы иммунной, анти-COVID-19 характерна для пациентов со смертельным исходом заболевания.

Ключевые слова: *пациенты, гематологические показатели; плазма иммунная, анти-COVID-19*

SEARCH FOR LABORATORY INDICATORS FOR EFFECTIVE THERAPY OF PATIENTS WITH COVID-19–ASSOCIATED PNEUMONIA TREATED WITH COVID-19 CONVALESCENT PLASMA

Potapnev Mihail Petrovich
Dr.M.Sc., Professor, Head the Department of Cellular Biotechnologies, Scientific-Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk
mpotapnev@yandex.by
Karpenko Fedor Nikolaevich
C.M.Sc., Director of Scientific-Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk
fedor-doc@tut.by
Dunayeu Igor Anatolievich
C.M.Sc., Transfusiologist, Republican Scientific-Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk
dunaev05@mail.ru

Hushchina Larisa Mihailovna
Deputy Director for Transfusiology, Scientific-Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk
gushchina73@mail.ru
Maximovich Alexei Vladimirovich
junior researcher, The laboratory of biology and genetics of stem cells Scientific-Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk
alem.wrd@gmail.com
Litskevich Pavel Vladimirovich
junior researcher, The laboratory of biology and genetics of stem cells Scientific-Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk
pavlentiy.litskevich25@gmail.com
Vahanova Tatiana Vladimirovna
Transfusiologist, State Institution «Republican Clinical Medical Center» of the Office of the President of the Republic of Belarus, Minsk
vaganova@blood.by
Vishchenia Lydmila Bolelavovna
Transfusiologist , Head of Departament of Transfusiology, Soligorsk,Central District Hospital,Minsk Region
mila.vishenya@mail.ru
Kavaliova Tatiana Anatolievna
Chief Physician, Vitebsk Regional Clinic Diseases Hospital, Vitebsk
tania_kov@mail.ru
Stychneuskaya Alena Vladimirovna
Head the Department, Vitebsk Regional Clinic Diseases Hospital, Vitebsk
luna269@yandex.by

The article analyzes the role of laboratory parameters in evaluating the effectiveness of the use of plasma immune, anti-COVID-19 for the treatment of patients with COVID-19-associated pneumonia. Comparison of groups of patients with recovery (n = 36) or fatal (n=27) outcome showed that normalization after the use of immune plasma, anti-COVID-19 indicators of lymphocyte content, the values of the neutrophil-lymphocyte index, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein possess an important prognostic value and reflects a favorable outcome of the disease patients. The lack of dynamics towards normalization of indicators after the use of immune plasma, anti-COVID-19 is typical for patients with fatal disease outcome.

Keywords: *patients, hematological indicators, COVID-19 convalescent plasma*

Эпидемия, вызванная вирусом SARS-Cov2, охватила большинство стран мира и сохраняет актуальность до настоящего времени. Вопросы терапии заболевания обсуждались неоднократно, тем не менее разнообразие используемых подходов указывает на то, что существующие национальные

рекомендации не обеспечивают выздоровление всех пациентов [1,2]. Плазма крови лиц, переболевших COVID-19, рассматривается как одно из средств лечения, в то же время ее клиническая эффективность, показанная в ряде исследований, остается вопросом дискуссий [3-5]. В качестве основного критерия оценки эффективности применения плазмы крови лиц, переболевших COVID-19, рассматривается показатель смертности пациентов, получавших лечение [2]. В качестве объективных показателей ответа на введение плазмы лиц, переболевших COVID-19, выделяют лабораторные показатели крови (гематологические, биохимические, уровни цитокинов), потребность в дополнительной кислородной поддержке (в том числе искусственная вентиляция легких), сроки пребывания в реанимационном отделении [6-8]. Изменение этих показателей к нормальному уровню свидетельствует о снижении тяжести заболевания и улучшения общего состояния пациента.

Целью нашего исследования было оценка лабораторных показателей периферической крови пациентов с COVID-19 – ассоциированной пневмонией в качестве биомаркеров ответа на терапию с использованием плазмы иммунной, анти-COVID-19.

Материалы и методы. Нами проанализированы истории болезней пациентов Солигорской центральной районной больницы, Витебской областной клинической инфекционной больницы, Лиозненской центральной районной больницы, РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии, получавших «плазму, иммунную, анти-COVID-19», выпускаемую государственным учреждением «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Выделено 2 группы пациентов с COVID-ассоциированной пневмонией, имевших различные клинические исходы. Пациенты группы 1 (n= 36) хорошим клиническим ответом на применение плазмы иммунной, анти- COVID-19 (выздоровлением). Группу 2 (n=27) составили пациенты, которые, несмотря на проводимую терапию, включающую применение плазмы иммунной, анти-COVID-19, умерли. Пациенты 1 группы имели средний возраст 59 лет (32; 72) при соотношении мужчин и женщин как 14/22, процент пораженной легочной ткани – 50% (10; 80). Потребность в кислородной поддержке имели 32 из 36 пациентов, в искусственной вентиляции легких- 1 из 36 пациентов. Состояние оценивалось как тяжелое у 7 из 29 пациентов группы 1 и у 13 из 27 пациентов группы 2. Пациенты обычно имели 1-3 сопутствующие коморбидных состояний.

Пациенты 2 группы имели средний возраст 68 лет (38; 91) при соотношении мужчин и женщин как 14/12. Процент пораженной легочной ткани – 50% (10; 95), потребность в кислородной поддержке имели 27 из 27 пациентов, в том числе в искусственной вентиляции легких – 10 из 27 пациентов. Пациенты обычно имели 2-4 коморбидных состояний.

Все пациенты получали терапию, включающую длительное пребывание в прон –позиции 15-24-36 часов подряд, гидратационно-инфузионная терапия, препараты ремдесивира, ингибиторов ИЛ-6 по показаниям, профилактика и лечение тромбозов, коагулопатий и ДВС синдрома включая антиагрегантную терапию, антикоагуляционную терапию препаратами низкомолекулярного или нефракционированного гепаринов по показаниям, препараты системных глюкокортикоидных гормонов. Пациентам, нуждающимся в респираторной поддержке, проводилась интенсивная терапия острой дыхательной недостаточности. Антибактериальная терапия проводилась строго по показаниям, исключительно для лечения бактериальных осложнений. Плазма иммунная, анти- COVID-19, переливалась по утвержденным показаниям в дозе 1-3 гемоконтейнера (190-200-300 мл), в том числе пациентам группы 1 – 1 доза - 4 человека, 2 дозы - 19 человек, 3 дозы – 7 человек, 4 дозы -3 человека, 5 доз – 1 человек, 6 доз – 1 человек; пациентам 2 группы – 1 доза – 9 человек, 2 дозы - 13 человек, 3 дозы – 4 человека, 4 дозы – 1 человек. Лабораторные показатели периферической крови оценивали при поступлении в больницу, за 2-3 дня до и через 5-7 дней после использования плазмы иммунной, анти-COVID-19 в комплексе терапевтических средств для лечения COVID-19-ассоциированной терапии. Данные представляли, как отношение пациентов с нормальными значениями исследованных показателей крови до и после проведения терапии с использованием плазмы иммунной анти-COVID-19.

Результаты. Данные по нормализации лабораторных показателей крови до и после применения плазмы иммунной, анти-COVID-19 представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, при применении плазмы, иммунной, анти-COVID-19 у пациентов группы 1 в 2,08 раза возросло количество пациентов с нормальным уровнем лимфоцитов (p=0,0009), в 2,33 раза – с нормальными значениями нейтрофильно-лимфоцитарного индекса (p = 0,035), в 3 раза - с нормальными значения скорости оседания эритроцитов (СОЭ) (p=0,05). Нормальные (практически – отсутствие) уровни С-реактивного белка определено у 22,6% пациентов (p=0,005). Показатели содержания лейкоцитов и D - димеров в периферической крови были неинформативны. В группе 2 применение плазмы, иммунной, анти-COVID-19 количество пациентов с нормальными значениями исследованных показателей оставалось практически неизменным (показатели D – димеры, СОЭ, значение нейтрофильно-лимфоцитарного индекса) или снижалось (нейтрофилы, лейкоциты, в меньшей степени – лимфоциты). В большей степени это было связана с продолжающимся системным воспалением и нарастанием полиорганной недостаточности.

Таблица 1 – Влияние применения плазмы иммунной, анти-COVID-19 на показатели периферической крови пациентов

Показатель	Использованные уровни нормальных значений показателей [источники]	Количество пациентов с нормальными лабораторными показателями до и после применения плазмы иммунной, анти-COVID-19			
		в группы выздоровевших (n=36)		в группе умерших (n= 27)	
		до	после	до	после
Лейкоциты	4-9 x10^9/л	17/36	14/36	8/27	3/25
Лимфоциты	1,1-3,2 x10^9/л [8]	13/36	27/36	11/26	8/24
Нейтрофилы	1,8-6,3 x10^9/л [8]	19/36	22/36	7/27	1/25
Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс	0,78-3,53 [9]	6/36	14/36	3/27	2/26
Скорость оседания эритроцитов	2-10 мм/час (м) 2-15 мм/час (ж)	3/36	9/35	2/26	1/23
С-реактивный белок	0- 5 мг/л	0/31	7/31	2/27	2/20
D – димеры	отриц.	0/25	0/20	0/21	0/17

Обсуждение. Проведенное исследование связано с поиском адекватных методов мониторинга терапии пациентов с COVID-19 – ассоциированной пневмонией, связанной с применением плазмы иммунной, анти-COVID-19. Полученные данные свидетельствуют прежде всего о том, что при сравнении группы 1 и 2 пациентов с различным клиническим исходом выздоровление часто ассоциируется с нормальным уровнем нейтрофилов и лимфоцитов как ответ на терапевтическое использованием плазмы иммунной, анти-COVID-19. В группе 1 (выздоровевших) увеличено число пациентов с нормальным содержанием лимфоцитов по сравнению с исходным количеством и в сравнении с пациентами группы 2. Также у части пациентов группы, выздоровевших отмечалась нормализация уровня С-реактивного белка в крови. Другие проанализированные показатели: пол, возраст, общее содержание лейкоцитов, уровень прокальцитонина и Д-димеров не влияли на ответ пациентов на терапию плазмой иммунной, анти -COVID-19.

У пациентов группы 2 с негативным исходом заболевания применение плазмы иммунной, анти-COVID-19 было ассоциировано не с увеличением, а с уменьшение числа пациентов с нормальными значениями лабораторных показателей. В большей степени это касалось показателей содержания лейкоцитов и нейтрофилов, уровни которых возрастали у 16 из 25 и 19 из 25 пациентов этой группы соответственно. У этих пациентов возрастал уровень С-реактивного белка у 10 из 20 пациентов этой группы., поддерживался повышенный уровень D димеров и/или отмечалось их быстрое нарастание, отмечалось нарастание уровня прокальцитонина в динамике.

Заключение. Таким образом, к лабораторным показателям эффективного применения плазмы иммунной, анти-COVID-19 относятся нормализация показателей содержания лимфоцитов, значения нейтрофильно-лимфоцитарного индекса, СОЭ, С-реактивного белка в течение 3-7 суток после переливания плазмы иммунной, анти- COVID-19.

Авторы не имеют конфликта интересов, связанного с опубликованием настоящей статьи.

Благодарности. Работа выполнена при содействии гранта 20220295 Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Список литературы

1. COVID-19: a review of therapeutics under investigation. JACEP / J.C. Crosby, [et al]//. Open. 2020;1-7. Doi: 10.1002/emp2.12081

2. A living WHO guideline on drugs for covid-19. BMJ./ A. Agarwal, [et al]//. 2020; 370:m3379 Doi:101136/bmj.m3379

3. H. Cao, Y. Shi, Convalescent plasma: possible therapy for novel coronavirus disease 2019. Transfusion. 2020; 60(5):1078-1083.oi:10.1111/trf.15797

4. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. PNAS. / K. Duan, [et al]//. 2020; 117 (17): 9490-9496 doi:10.1073/pnas.2004168117

5. Иммунная плазма против COVID-19. Наука и инновации /Ф. Карпенко, [и др]//. 2020, №7: 43-47. https://doi.org/10.29235/1818-9857-2020-7-43-47.

6. Selection of an optimal combination panel to better triage COVID-19 hospitalized patients. J. Inflam / Y. Tang, [et. al.]// –Res. 2020;13:773-787 http://doi.org/10.2147/JIR.S273193

7. Value of clinical laboratory test for early prediction of mortality in patients with COVID-19: the BGM score./L. Macias-Munoz, [et al]// –.J.Circ. Biomark. 2021; 10: 1-8. Doi: 10.33393/jcb.2021.2194

8. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. /D. Wang [et al.]// –JAMA, 2020; 323(11): 1061-1069 doi: 10.1001/jama.2020.1585

9. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? /P. P. Forget, [et al.]// –BMC Research Notes. 2017; 10 (12). Doi:10.1186/s13104-016-2335-5

АКТИВАЦИЯ РЕПАРАЦИИ ДНК И ПОДАВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИИ КВЕРЦЕТИНОМ И ЕГО НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМИ ФОРМАМИ ПОСЛЕ УФ-С ВОЗДЕЙСТВИЯ

Потапович Алла Ивановна
к.б.н., вед. научный сотрудник, Белорусский государственный университет, Минск
pot-alla@rambler.ru
Костюк Татьяна Владимировна
мл. научный сотрудник, Белорусский государственный университет, Минск
1011@tut.by
Шутова Татьяна Геннадьевна
к.х.н., вед. научный сотрудник, Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск
shutova@ichnm.basnet.by
Ишутина Ольга Владимировна
аспирант, Белорусский государственный университет, Минск
ovi-87@mail.ru
Костюк Владимир Андреевич
д.х.н., профессор, заведующий НИЛ, Белорусский государственный университет, Минск
kostyuk@bsu.by

Цель: Изучение влияния нативного и нано-кверцетина на повреждение ДНК и жизнеспособность клеток после воздействия УФ-излучения.

Методы: В работе использовали культивируемые кератиноциты человека HaCaT. Микрокристаллы кверцетина, покрытые оболочкой $(PAH/PSS)_4$ или $(CH/DexS)_4$ получали методом послойной сборки. Повреждение ДНК оценивали с помощью метода ДНК комет, жизнеспособность - используя реагент PrestoBlueTM и по выходу лактатдегидрогеназы.

Результаты: Установлено, что как нативный, так и нано-кверцетин, добавленные сразу после воздействия УФ-С, повышали жизнеспособность клеток, однако, эффективность нано-кверцетина была более выраженной. Кверцетин, покрытый оболочкой $(PAH/PSS)_4$ или $(CH/DexS)_4$, более эффективно, чем исходное соединение снижал количество одноцепочечных повреждений ДНК в ядрах кератиноцитов, подвергшихся воздействию УФ-С излучения.

Ключевые слова: *природные полифенольные соединения; наночастицы; ультрафиолетовая радиация; повреждение ДНК; кератиноциты.*

ACTIVATION OF DNA REPAIR AND SUPPRESSION OF CELL DEATH BY QUERCETIN AND ITS NANOSTRUCTURED FORMS AFTER UV-C EXPOSURE

Potapovich Alla Ivanovna

C.B.Scю, Leading Researcher, Belarusian State University, Minsk
pot-alla@rambler.ru
Kostyuk Tatyana Vladimirovna
Junior Researcher, Belarusian State University, Minsk
1011@tut.by
Shutova Tatyana Gennadievna
C.Ch.Sc, Leading Researcher, Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
shutova@ichnm.basnet.by
Ishutina Olga Vladimirovna
postgraduate student, Belarusian State University, Minsk
ovi-87@mail.ru
Kostyuk Vladimir Andreevich
Dr.Ch.Sc, Professor, Head of Research Laboratory Belarusian State University, Minsk
kostyuk@bsu.by

The aim of this study was to investigate effects native and nano- quercetin on DNA damage and cell viability after UV exposure.

Methods: Cultured human keratinocytes HaCaT were used. Quercetin microcrystals coated with $(PAH/PSS)_4$ or $(CH/DexS)_4$ shells were obtained by layer-by-layer assembly. DNA damage was assessed using comet DNA assay, cell viability was estimated using the PrestoBlueTM reagent and lactate dehydrogenase leakage test.

Results: It was found that: both native and nano-quercetin, added immediately after exposure to UV-C, increased cell viability, however, the effectiveness of nano-quercetin was more pronounced. Quercetin coated with (PAH/PSS)4 or (CH/DexS)4 was more effective than the parent compound at reducing single-stranded DNA damage in the nuclei of keratinocytes exposed to UV-C radiation.

Key words: *plant polyphenolic compounds; nanoparticles; ultraviolet radiation; DNA damage; keratinocytes*

Сегодня возрастает интерес к системному и местному применению природных полифенольных соединений (ППС) для защиты кожи от солнца. В большом количестве публикаций доказано, что эти соединения способны поглощать УФ-излучение (экранирующее действие); ингибировать УФ-индуцированные свободнорадикальные реакции в клетках кожи и внеклеточном матриксе (прямое и непрямое антиоксидантное действие); уменьшать воспалительные реакции (противовоспалительный эффект). Значительно меньше внимания уделялось оценке влияния ППС на УФ-индуцированное повреждение ДНК и последующие процессы репарации. Известно, что воздействие УФ облучения на клеточную ДНК приводит к одноцепочечному

повреждению ДНК в результате быстрых фотохимических процессов. В результате поглощения молекулами ДНК высокоэнергетического коротковолнового излучения, в основном УФ-С, между соседними остатками тимидина или цитозина образуются циклобутан-пиримидиновые димеры (ЦПД), а также пиримидин-пиримидоновые (6-4) фотопродукты. Клеточный ответ на одноцепочечное повреждение ДНК заключается в инициации остановки клеточного цикла и репарации ДНК с использованием интактной комплементарной цепи в качестве матрицы. Однако, если полной репарации не происходит, нерепарированные повреждения ДНК могут приводить к нестабильности генома и индуцировать сигнальные каскады, приводящие к апоптотической гибели клеток. В данной работе мы исследовали влияние нативного и нано-кверцетина на процессы репарации и гибели, культивируемых кератиноцитов человека, подвергнутых воздействию УФ-С.

Материалы и методы исследования

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования использовали культивируемые кератиноциты человека линии HaCaT. Клетки растили в полной среде ДМЕМ.

Наноструктурированный кверцетин. Наноструктуры $(PAH/PPS)_4$ на основе гидрохлорида полиаллиламина/сульфата полистирола и наноструктуры $(CH/DexS)_4$ на основе сульфата хитозана/декстрана, формировали путем послойной сборки в водных растворах. Оба типа наноструктур, содержащих 10 мг/мл кверцетина, растворялись в 0,9 % NaCl.

УФ облучение. Использовали бактерицидную лампу (G 30W, Sylvania), 95 % излучения которой приходится на УФ-С с длиной волны 253,7 нм. Перед облучением среду ДМЕМ заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ, заменяли на DMEM без сыворотки, содержащий исследуемые соединения.

Определение жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток определяли в 96-луночных планшетах, используя реактив PrestoBlue™ (*Invitrogen*, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Оценка повреждения клеточных мембран. Повреждение клеточных мембран оценивали по выходу цитоплазматического фермента лактатдегидрогеназа (ЛДГ) в 24-луночных планшетах. Активность ЛДГ определяли в культуральной среде и лизатах, полученных путем добавления к адгезированным клеткам 1 %-го раствора тритона X 100.

Анализ повреждений ДНК с помощью метода ДНК-комет проводили через 2 ч после УФ-облучения.

Результаты и обсуждение

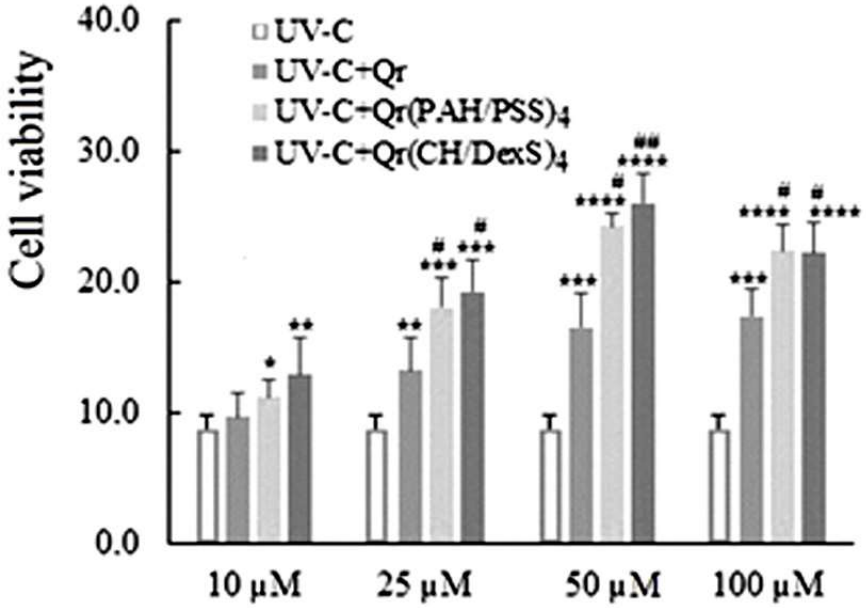
Общеизвестно, что основными УФ-компонентами земного излучения Солнца являются УФ-А (95 %) и УФ-В (5 %), тогда как УФ-С полностью поглощаются земной атмосферой. Поэтому для изучения биологических эффектов солнечного УФ-излучения обычно используют средне- и

длинноволновый УФ-свет (от 280 до 400 нм). Тем не менее, воздействие на клетки УФ-С излучения может быть полезным для тестирования эффектов фармакологических препаратов на процесс репарации ДНК. В связи с тем, что воздействие УФ-С излучения приводит к прямому фотоповреждению ДНК, такой подход позволяет исключить образование значительного количества ЦПД и 6-4 фотопродуктов в результате окислительного повреждения ДНК и, следовательно, не учитывать антиоксидантную активность тестируемых соединений.

Таблица 1 – Влияние кверцетина и его наноразмерных форм (50 мкмоль/л по кверцетину) на выход ЛДГ из культивируемых кератиноцитов через 20 ч после воздействия УФ-излучения 0,06 Дж/см^2

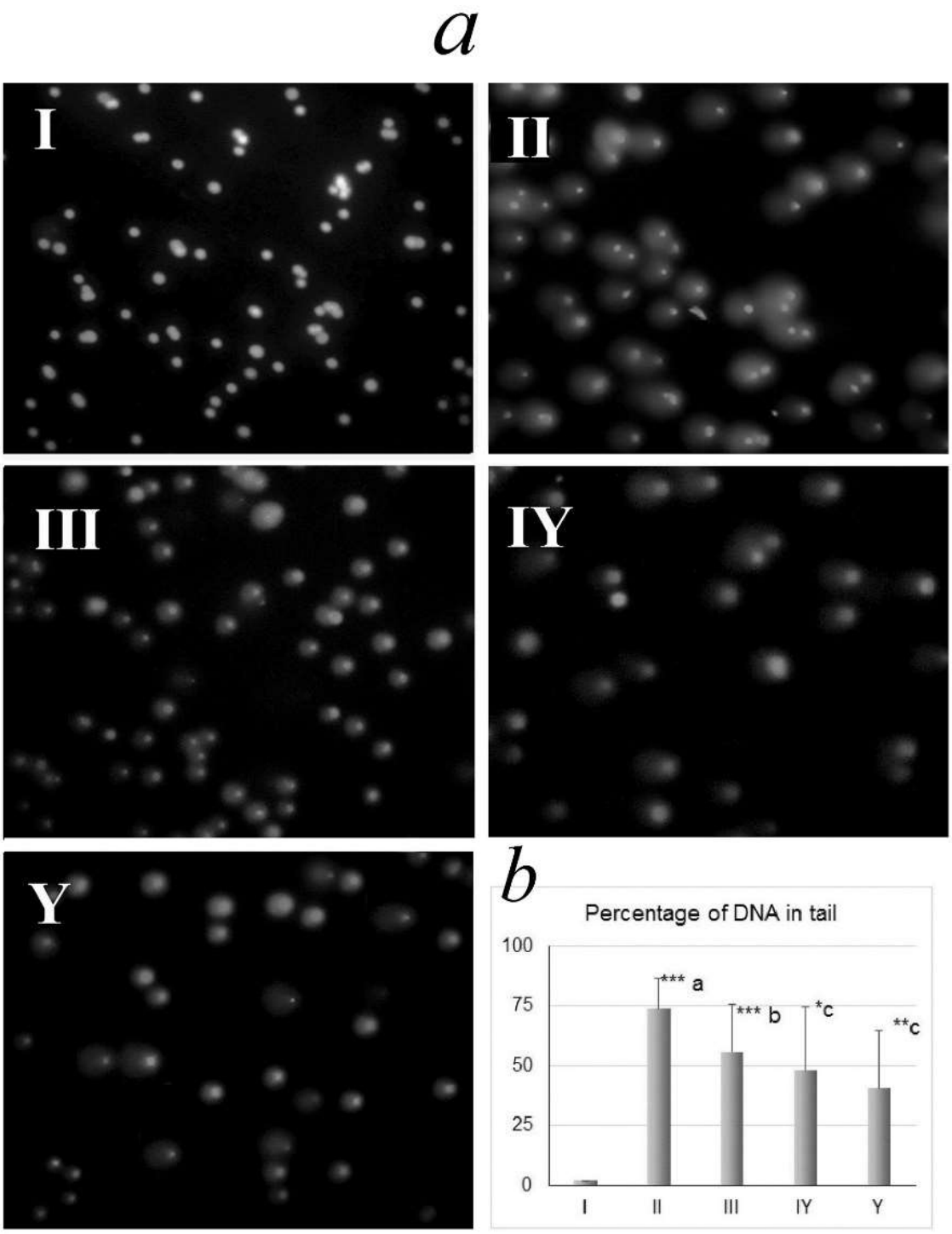
Экспериментальные условия	Выход ЛДГ в процентах
Контроль	8,0 ± 1,5
UV-C	79,6 ± 2,7^{***a}
UV-C и кверцетин	8,0 ± 4,2^{***b}
UV-C и кверцетин $(PAH/PSS)_4$	15,5± 4,2^{***b}
UV-и кверцетин $(CH/DexS)_4$	7,0 ± 2,7^{***b}

^{***a} - P < 0,001 *vs* контроль; ^{***b} - P < 0,001 *vs* UV-C



* - P < 0,05; ** - P <0,01; *** - P <0,001, **** - P <0,0001 *vs* UV-C; $^{\#}$ - P <0,05; $^{\#\#}$ - P <0,01 *vs* UV-C и кверцетин)

Рисунок 1 – Влияние кверцетина и его наноразмерных форм на жизнеспособность клеток через 20 ч после воздействия УФ-С (0,06 Дж/см^2) на культивируемые кератиноциты



***a - P < 0,0000001 по сравнению с ложным облучением; ***b - P<0,001 по сравнению с УФ-С; *c – P <0,05; **c - P<0,01 по сравнению с УФ-С и кверцетином

Рисунок 2 – Влияние нативного и наноструктурированного кверцетина (50 мкмоль/л) на повреждение ДНК в культуре кератиноцитов через 2 ч после воздействия УФ-С в дозе 0,06 Дж/см^2

В результате исследования процесса гибели культивируемых кератиноцитов человека, подвергнутых воздействию УФ-С, установлено, что кверцетин его наноразмерные формы: кверцетин $(PAH/PPS)_4$ и кверцетин $(CH/DexS)_4$, добавленные в культуральную среду сразу после облучения, полностью предотвращают повреждение плазматических мембран облученных клеток, оцениваемое по выходу цитоплазматического фермента ЛДГ (Табл. 1), и достоверно повышают жизнеспособность кератиноцитов, оцениваемую с помощью метаболизм-зависимого теста (Рис. 1).

Следует отметить, что наноструктурированный кверцетин более эффективно влияет на жизнеспособность УФ-облученных клеток, чем исходное соединение (Рис. 1).

При исследовании УФ-индуцированного повреждения хроматина методом ДНК-комет установлено, что нативный и наноструктурированный кверцетин, добавленные в культуральную среду сразу после УФ-воздействия, существенно увеличивают процентное содержание ДНК в голове кометы (неповрежденная ДНК) и снижают в хвостовой части (поврежденная ДНК), при этом заключение кверцетина в $(PAH/PSS)_4$ или $(CH/DexS)_4$ наноструктуры заметно усиливало его воздействие на репарацию ДНК, вероятно, за счет облегчения его транспорта в ядро (Рис. 2).

Данные представлены в виде репрезентативных флуоресцентных микрофотографий ДНК-комет (a) и соответствующей диаграммы, показывающей процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» (b). I - ложное облучение; II - УФ-С; III - УФ-С и нативный кверцетин, IY - УФ-С и кверцетин $(PAH/PPS)_4$; Y - УФ-С и кверцетин $(CH/DexS)_4$.

Заключение. Ингибирование гибели клеток без защиты ДНК может быть причиной увеличения числа случаев опухолей кожи после УФ-облучения, тогда как активация путей репарации ДНК приводит к уменьшению мутаций, связанных с УФ-излучением. Таким образом, нативный и наноструктурированный кверцетин, обеспечивающие как подавление клеточной гибели, так и усиление репарации ДНК, могут быть предложены в качестве перспективных средств фармацевтического применения, и, в частности, как возможные ингредиенты для солнцезащитных косметических продуктов.

Список литературы

1. Secondary Plant Metabolites for Sun Protective Cosmetics: From Pre-Selection to Product Formulation. /L. Korkina, [et al]// – (2018) Cosmetics. 5, 32–52. doi.org/10.3390/cosmetics5020032.

2. A.W. Farrell, G.M. Halliday, J.G. Lyons (2011) Chromatin structure following UV-induced DNA damage - Repair or death? Int J Mol Sc. 12, 8063–8085. doi: 10.3390/ijms12118063.

3. R.B. Setlow (1966) Cyclobutane-Type Pyrimidine Dimers in Polynucleotide. Science. 153, 379–386. doi: 10.1126/science.153.3734.379.

4. Decreased DNA Repair but Normal Apoptosis in Ultraviolet-Irradiated Skin of p53-Transgenic Mice. /G. Li, [et al]// – (1996) Am J Pathol. 148, 1113–1123. PMCID: PMC1861540.

5. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. R.R. Tice, [et al]// – (2000) Environ Mol Mutagen. 35, 206–221. doi: 10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206:aid-em8>3.0.co;2-j.

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ОКИСЛЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПОЛИМЕРОВ-НОСИТЕЛЕЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Пристромова Юлия Игоревна
аспирант, младший научный сотрудник, лаборатория химии полисахаридов, Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», г. Минск
prystromyi@gmail.com
Юркштович Татьяна Лукинична
заведующая лабораторией химии полисахаридов, Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», г. Минск
yurk@bsu.by
Голуб Наталья Васильевна
старший научный сотрудник, лаборатория химии полисахаридов, Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», г. Минск
natali.golub@tut.by
Костерова Раиса Ивановна
научный сотрудник, лаборатория химии полисахаридов, Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» г. Минск
yurk@bsu.by

Цель настоящего исследования состояла в получении наноразмерных частиц на основе альдегидсодержащих полисахаридов, которые могут быть использованы для создания новых пролонгированных форм известных лекарственных веществ. В качестве объектов исследования были выбраны декстран, картофельный крахмал, гидроксиэтилкрахмал. Введение альдегидных групп в состав полисахаридов осуществляли путем окисления водным раствором периодата натрия. На основе синтезированных окисленных полисахаридов были получены наночастицы путем введения в их состав аминосодержащих соединений. Формирование наночастиц подтверждали методами динамического светорассеяния, сканирующей электронной микроскопии, ИК-спектроскопии. Впервые получены наночастицы на основе конъюгата диальдегиддекстран-ε-аминокапроновая кислота с размером 104-254 нм. Экспериментальные данные являются основанием для получения наносомальных форм биологически активных веществ.

Ключевые слова: *наночастицы; диальдегиддекстран; диальдегидкрахмал; диальдегидгидроксиэтилкрахмал.*

PREPARATION OF NANOPARTICLES BASED ON OXIDIZED POLYSACCHARIDES AS CARRIER POLYMERS OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Pristromova Yulia Igorevna
the postgraduate student, Belarusian State University, junior researcher of the laboratory of polysaccharide chemistry, Research Institute of Physicochemical Problems, Belarusian Stare University, Minsk
prystromyi@gmail.com
Yurkshtovich Tatiana Lykinichna
Ph.D. (chemistry), head of the laboratory of polysaccharide chemistry, Research Institute of Physicochemical Problems, Belarusian Stare University, Minsk
yurk@bsu.by
Holub Natallia Vasilievna
Ph.D. (chemistry), senior research of the laboratory of polysaccharide chemistry, Research Institute of Physicochemical Problems, Belarusian Stare University, Minsk
natali.golub@tut.by
Kosterova Raisa Ivanovna
researcher of the laboratory of polysaccharide chemistry, Research Institute of Physicochemical Problems, Belarusian Stare University, Minsk
yurk@bsu.by

The purpose of this study was to obtain nanosized particles based on aldehyde-containing polysaccharides, which can be used to create new prolonged forms of known drugs. The objects of study were dextran, starch starch, hydroxyethyl starch. The introduction of aldehyde groups into the composition of polysaccharides was carried out by oxidation with an aqueous solution of sodium periodate. Based on the synthesized oxidized polysaccharides, nanoparticles were obtained by introducing amine-containing compounds into their composition. The formation of nanoparticles was confirmed by dynamic light scattering, scanning electron microscopy, and IR spectroscopy. Nanoparticles based on dialdehyde dextran-ε-aminocaproic acid conjugate with a size of 104-254 nm were obtained for the first time. Experimental data are the basis for obtaining nanosomal forms of biologically active substances.

Keywords: *nanoparticles; dialdehyde dextran; dialdehyde starch; dialdehyde hydroxyethyl starch.*

Цель настоящего исследования – получение наноразмерных частиц на основе альдегидсодержащих полисахаридов, которые могут быть использованы для создания новых пролонгированных форм известных биологически активных веществ. Альдегидсодержащие полисахариды являются перспективными биополимерами для создания таких систем, поскольку нетоксичны, совместимы с тканями живого организма, обладают способностью к биодеградации и ковалентному связыванию биологически активных веществ, имеющих в структуре первичную аминогруппу или иминогруппу, пролонгировать их высвобождение. В настоящее время диальдегиддекстран (ДАД) нашел применение медицине для получения водорастворимых макромолекулярных

терапевтичеких систем, однако сведения о получении на основе окисленных полисахаридов наносомальных пролонгированных форм лекарственных веществ ограничены.

В качестве объектов исследования были использованы декстран (среднемассовая молекулярная масса (M_w) 60 кДа), картофельный крахмал, гидроксиэтилкрахмал (степень замещения по гидроксиэтильным группам - 0,4; M_w 200 кДа).

Введение альдегидных групп в состав полисахаридов осуществляли путем окисления водным раствором периодата натрия при различных мольных соотношениях реагентов и времени реакции. Из рис. 1 видно, что при фиксированных условиях окисления картофельного и модифицированного крахмала, в макромолекулах которых остатки D-глюкозы соединены α(1→4)-глюкозидными связями, степень окисления увеличивается пропорционально количеству окислителя. Видно, что характерной особенностью кривой зависимости СО – мольное соотношение $NaJO_4$: глюкопиранозное звено (ГПЗ) является наличие перегиба.

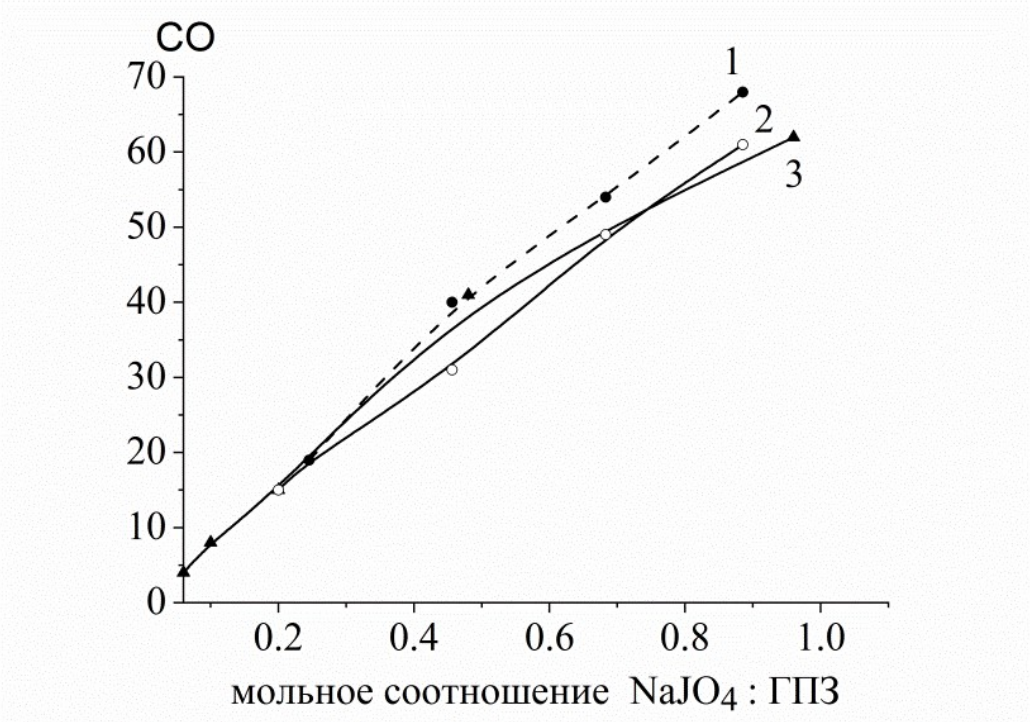
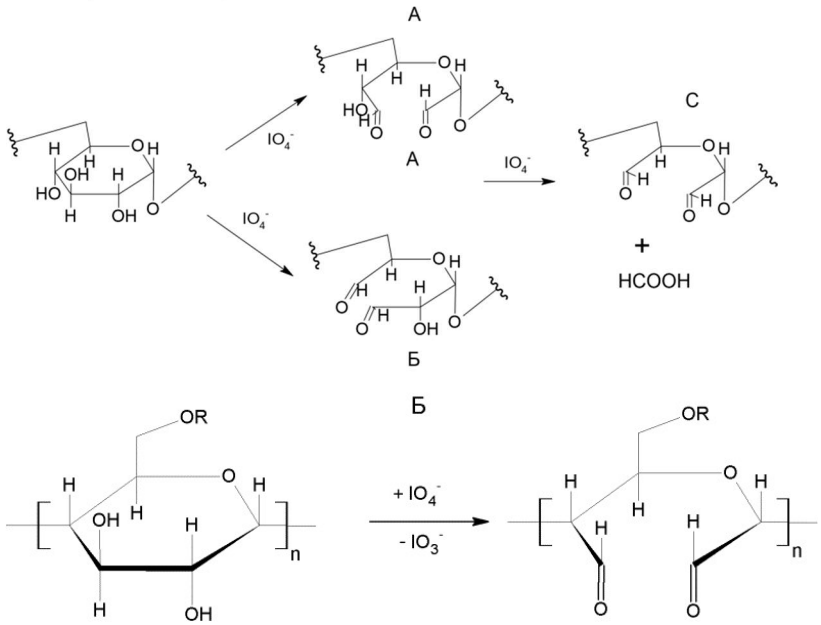


Рисунок 1 – Зависимость степени окисления гидроксиэтилкрахмала (1), крахмала (2), декстрана (3) от мольного соотношения $NaJO_4$: ГПЗ (T = 20°C, t = 1,0 ч). Степень окисления (СО) равна числу окисленных звеньев на 100 D-глюкопиранозных циклов макромолекулы полисахарида

Эффективность реакции окисления ГЭК выше по сравнению с картофельным крахмалом. Этот факт отражает влияние надмолекулярной структуры полисахаридов в реакции окисления и свидетельствует о том, что

макромолекулы исходного крахмала, имеющего глобулярную структуру, подвергаются воздействию окислителя в меньшей степени, чем его водорастворимое производное. В отличие от крахмала и ГЭК макромолекулы декстрана состоят из α-D-глюкопиранозных звеньев, соединенных между собой преимущественно 1-6 глюкозидными связями. Это обуславливает различия в протекании реакции периодатного окисления декстрана по сравнению с крахмалом (рис. 2), которое может протекать в две стадии с образованием продуктов трех типов (A, B и C):



где R – H (для крахмала) и CH_2CH_2OH для ГЭК

Рисунок 2 – Схема окисления декстрана(а) и крахмала(б) периодатом натрия

Из представленной схемы следует, что если для окисления одного D-глюкопиранозного звена крахмала и ГЭС требуется одна молекула окислителя, то для декстрана – одна или две молекулы периодата натрия.

Согласно экспериментальным данным процесс окисления декстрана, крахмала, гидроксиэтилкрахмала завершается за 1 час. Получены и охарактеризованы опытные партии альдегидсодержащих полисахаридов в интервале степени окисления 10-65%.

На основе окисленных полисахаридов были сформированы наночастицы путем введения в их состав аминосодержащих соединений: валин, лейцин, ε-аминокапроновая кислота октадециламин, додециламин. Синтез осуществляли в гомогенных условиях с использованием аминов и аминокислот при разной концентрации в растворах и pH 9,0 [1].

Существование конъюгатов подтверждается данными ИК-спектроскопии. Аминогруппа нанобразующего агента взаимодействует с альдегидными группами окисленных молекул полимера с образование основания Шиффа. В ИК-спектрах продуктов реакции были обнаружены полосы поглощения

азометиновой (–C=N-) группы 1690-1640 $см^{-1,}$ а также полосы в области 2900 $см^{-1}$, которые соответствуют колебаниям CH- и CH_2- групп в алифатической цепи аминосоединений.

С целью изучения влияния степени окисления на размер наночастиц были использованы окисленные полисахариды с СО 10-40%. В ходе исследования установлено, что при использовании в качестве аминосоединений валина и лейцина для формирования наночастиц на основе конъюгатов преобладала доля частиц микронного размера, и эти данные в таблице не приведены.

Из представленных в табл. 1 данных следует, что для всех полученных конъюгатов размер частиц, их полидисперсность зависят от природы полисахарида, их степени окисления.

Таблица 1 – Физико-химические параметры наночастиц на основе конъюгатов диальдегидполисахарид–аминосоединение

полисахарид	СО	Конъюгаты с	размер, нм	ДСР, %	ξ-потенциал, мВ
Декстран	10	октадециламин	188	100	0,8
		додециламин	125	100	1,4
		ε-аминокапроновая кислота	231	100	-25,0
	20	октадециламин	194/684	60/40	2,9
		додециламином	293/12	90/10	0,9
		ε-аминокапроновая кислота	231/47	70/30	-21,0
	40	октадециламин	297/44	70/30	0,7
		додециламин	190	100	1,3
		ε-аминокапроновая кислота	104/394	50/50	-17,0
Крахмал	20	додециламин	165/4890	99/1	14,5
	40		2850/171	64/36	9,6
гидроксиэтил-крахмал	40		210/570	64/36	13,9

* и **Размер частиц и доля частиц (ДСР) с разным размером в 1 и во 2 фракциях

Оптимальной степенью окисления ДАД для формирования наночастиц на основе конъюгата ДАД-октадециламин с наименьшими размерами (121 нм) является значение 10%; для конъюгата ДАД-додециламин (134-300 нм) – 10-40%. Установлено, что при фиксированных условиях введения додециламина в состав окисленных полисахаридов средний размер наночастиц в зависимости от природы полисахарида уменьшается в следующей последовательности: декстран ≤ гидроксиэтилкрахмал < картофельный крахмал, что может быть связано с ухудшением растворимости полимера.

В работе впервые получены наночастицы на основе ДАД-ε-аминокапроновая кислота. Такие частицы отличаются высоким содержание карбоксильных групп, имеют отрицательный потенциал 17-25 мВ и размер 104-254 нм. Тенденция к понижению размера частиц на основе конъюгатов ДАД-ε-аминокислота по мере увеличения степени окисления полисахарида объясняется усилением электростатического отталкивания частиц, препятствующего образованию агрегатов.

Таким образом, физико-химические свойства синтезированных наночастиц на основе альдегидсодержащих полисахаридов являются основанием для получения новых наносомальных систем доставки биологически активных веществ, в частности, противоопухолевых веществ.

Список литературы

1. Dextran Nanoparticle Synthesis and Properties / A. Wasiak [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, iss .1. – P. 1–18.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ЗАЩИТНОЙ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ АМИТРИПТИЛИНОМ

Приступа Викентий Чеславович
к.м.н., доцент, УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск
pristupa.56@mail.ru
Сперанская Елена Чеславовна
к.б.н., доцент, доцент, УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск,
sergey@alfa-chip.com
Сперанская Ирина Сергеевна
Заведующая отделением, УЗ «10 городская поликлиника», Минск
dilsaics@gmail.com

Целью работы явилось количественное изучение динамики изменения показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у больных с острым отравлением амитриптилином в зависимости от методов интенсивной терапии.

Ключевые слова: *свободно-радикальное окисление липидов; амитриптилин.*

FREE RADICAL OXIDATION OF LIPID AND PROTECTIVE ANTIOXIDANT SYSTEM IN VARIOUS METHODS OF INTENSIVE THERAPY OF ACUTE AMITRIPTYLINE POISONING STUDY

Pristupa Vikentiy Cheslavovich
Ph.D. in Medical Science, docent, Belarusian State Medical University, Minsk
pristupa.56@mail.ru
Speranskaya Elenf Cheslavovna
Ph.D. in Biological Science, docent, Belarusian State Medical University, Minsk
sergey@alfa-chip.com
Speranskaya Irirna Sergeevna
Head of Department, 10th city polyclinic, Minsk
dilsaics@gmail.com

The dynamics of changes in lipid peroxidation and antioxidant system of patients with acute poisoning with amitriptyline, depending on the methods of intensive therapy is quantitative studied.

Keywords: *Free radical lipid oxidation; amitriptyline*

В настоящее время интоксикация амитриптилином (АМТ) занимает одно из ведущих мест среди острых лекарственных отравлений. Токсическое действие

обусловлено главным образом гипоксическими повреждениями, среди которых особое место отводится процессам перекисного окисления липидов (ПОЛ) и системе антиоксидантной защиты (АСЗ)[1-2]. Повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов приводит к накоплению токсических продуктов, которые ослабляют барьерную функцию биомембран, нарушают нормальную жизнедеятельность клетки, а также всего организма в целом. Процесс ПОЛ является универсальным неспецифическим патогенетическим звеном в развитии многих заболеваний, поэтому данные о содержании его продуктов в биологических объектах может нести в себе информацию о глубине и степени выраженности патологического процесса. При этом, в настоящее время, хирургические методы детоксикации получили широкое распространение в интенсивной терапии острых отравлений кардиотоксическими препаратами. Одним из важнейших компонентов эффективности применения сорбционных методов у пациентов с острыми отравлениями является состояние реакций ПОЛ и АСЗ. Последнее явилось основанием для изучения показателей свободно-радикального окисления липидов и антиоксидантной системы в динамике при проведении гемосорбции (ГС), плазмасорбции (ПлС) или гемодиализа (ГД).

Цель исследования Целью работы явилось количественное изучение динамики изменения показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у больных с острым отравлением амитриптилином в зависимости от методов интенсивной терапии.

Материал и методы Исследование проводилось в условиях отделения токсикологии БСМП г. Минска в процессе лечения 65 пациентов (от 18 до 65 лет) с острым отравлением амитриптилином. У всех больных диагноз острого отравления амитриптилином был верифицирован после качественного и количественного определения препарата в биологических средах (кровь, моча) при токсико-химических исследованиях. Среднее пребывание пациентов с острым отравлением амитриптилином в палатах интенсивной терапии составляет 2 - 4 суток. Экспозиция препарата от приема до оказания медицинской помощи была в пределах 6-12 часов.

Для количественной характеристики процессов перекисного окисления липидов использовали показатели Уф-поглощения липидных экстрактов при длине волны 233 и 278 нм, соответствующие поглощению соединениями с конъюгированным (ДК - 233) типом связи и диен кетоновой (ДК - 278) конфигурацией. Расчет проводили в единицах оптической плотности на 1 мл плазмы. Содержание малонового диальдегида (МДА) в плазме крови определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты.

Уровень альфа-токоферола (α-ТФ) и ретинола (Р) в плазме крови исследовали в одной пробе методом спектрофлюориметрии .

Первое определение продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы проводили при поступлении больного в стационар, в

последующем забор крови для исследований осуществлялся после проведения экстракорпоральных методов детоксикации и на 2-3 сутки заболевания.

В зависимости от проводимой интенсивной терапии всех обследованных пациентов разделили на 4 клинические группы:

1-я группа: 30 больных, которым проводилась консервативная интенсивная терапия: промывание желудка, стимуляция кишечника, энтеросорбция, инфузионная терапия, антикоагулянтная, кардиопротекторная и антибактериальная терапии (принятая схема лечения в клинике);

2-я группа: 16 пациентов, у которых интенсивная терапия включала консервативное лечение и гемосорбцию;

3-я группа: 12 человек, которым проводилась консервативная терапия и плазмасорбция;

4-я группа: 7 больных, терапия которых состояла из консервативных методов лечения и гемодиализа.

Контролем служили соответствующие показатели крови 20 здоровых доноров в возрасте 22-43 года.

Результаты исследования. Характер выявленных метаболических нарушений гомеостаза в исследуемых клинических группах больных с острым отравлением амитриптилином представлен в таблице 1.

Во всех исследуемых 4 группах больных с острым отравлением амитриптилином при поступлении отмечено статистически достоверное увеличение показателей перекисного окисления липидов, как первичных ДК-233, ДК –278 (в 2-2,2, 2,4-2,9 раза), так и вторичных МДА (в 1,4-1,5 раза) и снижение содержания α-ТФ (в2,5-2,7раза) и Р (в1,5-1,6 раза) по сравнению с показателями в контрольной группе см. табл. 1. В последующие сутки исследования сохранялась такая же тенденция изменений параметров перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы по сравнению с контрольной группой.

Как видно из представленных данных, у больных 1 группы и пациентов 2-4 группах, где в комплекс интенсивной терапии были включены хирургические методы детоксикации, направленные на удаление яда из организма, в динамике показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы наблюдались неоднозначные изменения. Так, у пациентов 1 группы, где проводилась консервативная терапия по принятой в клинике схеме, наблюдается значительное достоверное повышение содержания ДК –233, ДК-278 на 2 сутки заболевания, по отношению к контрольной группе (в 3,6 и 3,7 раза) и при поступлении (1,3 –1,8 раза). А также максимальный дефицит основных антиоксидантов в организме витаминов α-ТФ и Р по сравнению с контрольной группой (в 2,8; 1,8 раза соответственно).

Таблица 1 – Изменение показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в сыворотке крови больных с острым отравлением амитриптилином.

Показатели	**Контроль**	**Группа больных**	**Дни исследования, сутки**			
			До	**после**	**2**	**3**
ДК – 233 ед/мл	1,17±0,06	1 2 3 4	2,42±0,23 * 2,59±0,19 * 2,34±0,18 * 2,51±0,21 *	2,42±0,23 2,23±0,14 1,96±0,16 2,16±0,2	4,24±0,36** 2,48±0,24 2,22±0,17 2,30±0,21	3,82±0,22** 2,21±0,19 1,86±0,2 2,14±0,16
ДК – 278 ед/мл	0,09±0,01	1 2 3 4	0,26±0,03 * 0,22±0,024 * 0,24±0,024* 0,26±0,014*	0,26±0,03 0,24±0,017 0,24±0,016 0,22±0,017	0,34±0,023** 0,21±0,011 0,22±0,019 0,25±0,016	0,31±0,019 0,21±0,02 0,19±0,021 0,20±0,017
МДА мк моль/л	6,07±023	1 2 3 4	8,99±0,85* 8,83±0,72* 8,79±0,62* 8,8±0,65*	8,99±0,85 8,85±0,93 8,05±0,64 7,64±0,49	8,71±0,78 7,15±0,68 7,21±0,7 7,53±0,56	11,79±0,57 6,47±0,71 6,11±0,58 7,21±0,62
ТФ мк моль/л	20,23±1,7	1 2 3 4	7,91±0,51* 7,37±0,53* 7,61±0,39* 8,01±0,38*	7,91±0,51 9,78±0,56 11,8±0,62 8,97±0,46	7,25±0,38** 9,64±0,43 10,67±0,61 9,64±0,52	9,8±0,44 11,32±0,29 13,42±0,52 11,14±0,34
А мк моль/л	2,9±0,39	1 2 3 4	1,88±0,09* 1,76±0,063* 1,93±0,04* 1,87±0,041*	1,88±0,09 1,73±0,07 1,71±0,042 1,79±0,054	1,64±0,053** 1,9±0,07 2,11±0,052 1,92±0,043	1,86±0,067 2,13±0,039 2,14±0,049 1,98±0,053

Примечание

** - достоверность отличий (p < 0,001) по сравнению с контролем;*

*** - достоверность(P < 0,001) по сравнению с исходными данными.*

У пациентов 2-4 групп в этот период наблюдается недостоверное снижение ДК – 233 (на1,04 – 1,09 раза), ДК – 278 (на1,04 – 1,09 раза) и повышение α-ТФ (в 1,2-1,3 раза), Р (в 1,04 – 1,1 раза) по отношению к исходному уровню этих показателей в крови больных. В последующем, на 3 сутки проводимой интенсивной терапии у больных 1 группы сохранялось достоверное увеличение ДК-233 (в 1,6 раза) и повышение ДК – 278 (в 1,2 раза) по отношению к исходным величинам, а у пациентов 2-4 группы эти параметры оставались прежние.

Начиная с 3 суток заболевания, антиоксидантная система - ее показатели α-ТФ и Р повышались, особенно у больных с применением экстракорпоральных методов детоксикации.

Выводы. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что у всех больных с острым отравлением амитриптилином наблюдается активация процессов перекисного окисления липидов, за счет увеличения содержания первичных ДК-233; ДК-278 и вторичных МДА

продуктов переоксидации во все сроки исследований. При этом, наиболее превалируют процессы перекисного окисления липидов у пациентов 1 группы на 2,3 сутки заболевания, где проводилась только консервативная терапия. Это свидетельствует о том, что в эти сроки заболевания ингибирование процессов перекисного окисления липидов максимально снижено, в результате уменьшения мобилизации антиоксидантной системы и как следствие этого, может возникать опасность развития различных осложнений со стороны органов и систем организма. Использование ГС, ПлС или ГД в комплексе интенсивной терапии острых отравлений амитриптилином приводит к уменьшению уровня ДК-233, ДК-278, МДА и снижает вероятность повышения этих показателей в процессе лечения, а также более быстрому повышению концентрации витаминов – антиоксидантов в организме больного.

Полученные результаты служат патогенетическим обоснованием для включения витаминов - антиоксидантов и хирургических методов детоксикации в комплексную интенсивную терапию острых отравлений амитриптилином, которые способствуют снижению перекисного окисления липидов клеточных мембран.

Список литературы

1. Б.В. Давыдов, В.Ю. Полумисков, П.П. Голиков, А.П. Голиков, Интегральная оценка баланса перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы. // Клиническая лабораторная диагностика. //Тез. док. 4-го Всесоюзного съезда специалистов по лабораторной диагностике-М.,1991, С. 48-49

2. И.А. Зборовская, М.В. Банникова, Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты. //Вестник РАМН, 1995. -С. 53-60

ДИНАМИКА УСПЕВАЕМОСТИ СТУДЕНТОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ НА КАФЕДРЕ ОБЩЕЙ ХИМИИ БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Прохорова Татьяна Владимировна
к.т.н., доцент, доцент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
tprochorova343@gmail.com
Побойнев Виктор Витольдович
ассистент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
dremozzew@mail.ru
Хрусталёв Владислав Викторович
д.б.н., доцент, заведующий кафедрой общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
vvkhrustalev@mail.ru
Латушко Татьяна Викторовна
к.м.н., доцент, доцент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
smer444@mail.ru

В работе проанализирована динамика успеваемости студентов лечебного, стоматологического, педиатрического и медико-профилактического факультетов по общей и по медицинской химии с 2018 года на кафедре общей химии. Установлено, что с 2019-2020 учебного года наблюдается тенденция к снижению успеваемости.

Ключевые слова: *успеваемость, средний балл, медицинская химия, кафедра общей химии.*

TRENDS OF ACADEMIC PROGRESS IN THE STUDY OF MEDICAL CHEMISTRY AT THE DEPARTMENT OF GENERAL CHEMISTRY AT BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Prokhorova Tatyana Vladimirovna
C.T.Sc., Associate Professor, Associate Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
tprochorova343@gmail.com
Poboinev Victor Vitoldovich
Assistant Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
dremozzew@mail.ru
Khrustalev Vladislav Victorovich

Dr.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
vvkhrustalev@mail.ru
Latushko Tatyana Victorovna
C.M.Sc., Associate Professor, Associate Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
smer444@mail.ru

In this work we have analyzed trends of the students' academic progress from faculties of general medicine, dentistry, pediatric and preventive medicine since 2018-2019 academic year at the Department of General Chemistry. It was established that from the 2019-2020 academic year there is a tendency to decrease academic progress of students.

Key words: *academic progress; average score; medical chemistry; department of general chemistry.*

Постоянно развивающаяся и изменяющаяся наука обусловливает возникновение новых областей и отраслей исследований и вместе с ними новых дисциплин со своими задачами и тенденциями [1]. Качественное образование должно своевременно откликаться на происходящие перемены в фундаментальной и прикладной науке. В связи с этим на кафедре общей химии также произошли изменения. На кафедре до 2020-2021 учебного года студенты всех факультетов, кроме фармацевтического, изучали специальность «Общая химия» с итоговой формой аттестации в виде недифференцированного зачёта (лечебный, педиатрический и медико-профилактический факультет) и в виде дифференцированного зачёта (стоматологический факультет). В 2021-2022 учебном году кафедра перешла на преподавание дисциплины «Медицинская химия» с итоговой формой аттестации в виде недифференцированного зачёта для студентов всех факультетов. Переход на преподавание новой дисциплины продиктован необходимостью ещё более плотного контакта фундаментальной науки и практической медицины.

Согласно всероссийской аттестационной комиссии, медицинская химия представляет область науки на стыке органической, биоорганической, биологической, математической химии, фармакологии и молекулярной генетики. В соответствии с классификацией ИЮПАК, медицинскую химию в настоящее время определяют как область химической науки, «связанную с выявлением, развитием, идентификацией и исследованием механизма действия биологически активных соединений на молекулярном уровне». Курс «Медицинская химия» имеет чёткую направленность на подготовку студентов к решению медицинских проблем с помощью химических и физико-химических методов анализа. Медицинская химия изучает химические основы процессов жизнедеятельности живого организма, которые подчиняются основным

химическим закономерностям. Новая дисциплина также направлена на изучение новейших научных данных по использованию современных достижений физической, коллоидной и аналитической химии для решения задач современной медицины, а именно, для создания новых лекарственных веществ, определения молекулярного механизма их действия, применения физических и физико-химических методов исследования для анализа состава биологических жидкостей и лекарственных веществ [2].

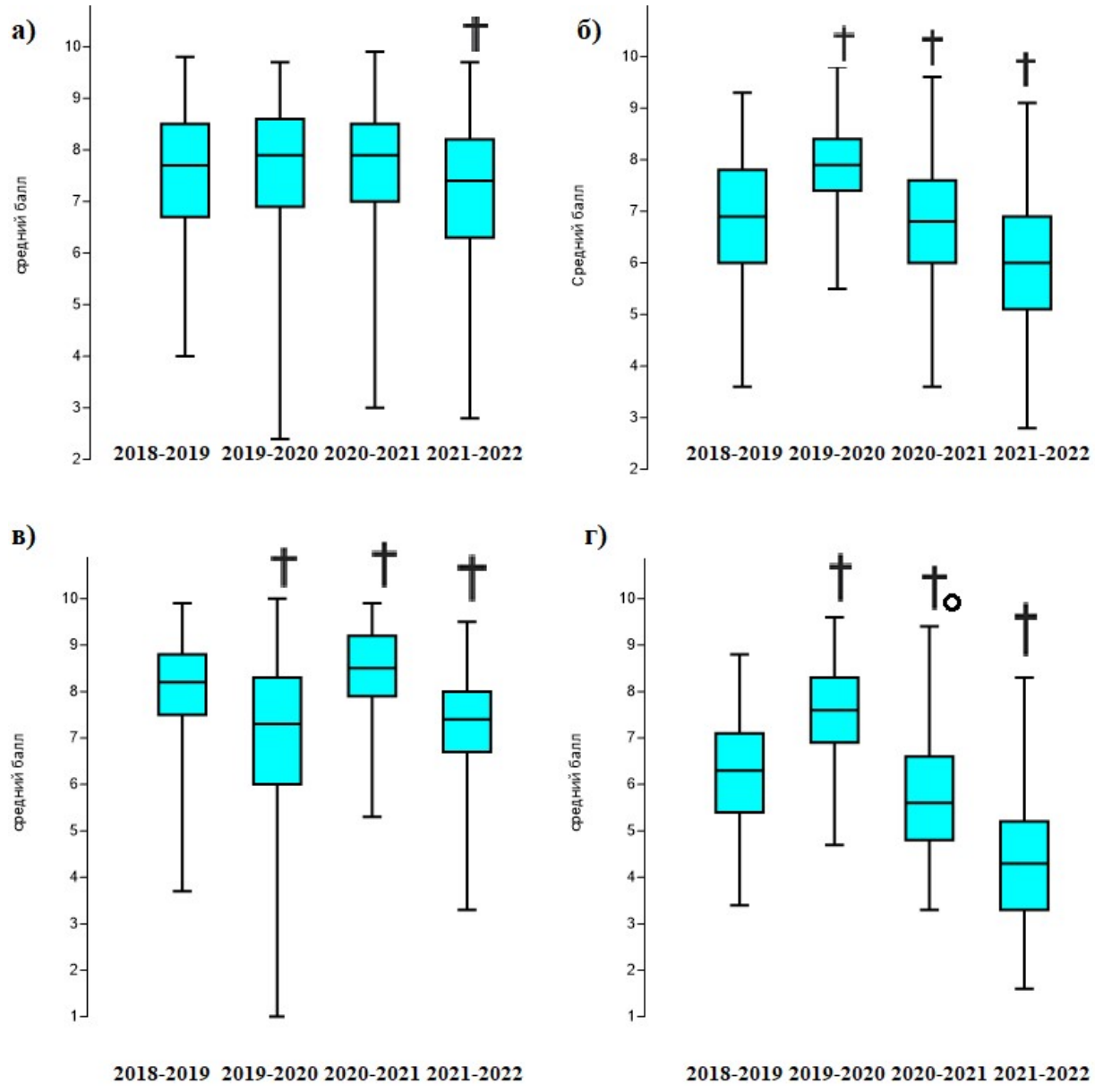


Рисунок – Средний балл студентов лечебного (а), педиатрического (б), стоматологического (в), медико-профилактического (г) факультетов за период с 2018-2019 по 2021-2022 учебный год по учебным дисциплинам «Общая химия» и «Медицинская химия». Достоверные различия отмечены крестом.

Медицинская химия играет важнейшую роль в формировании критического мышления, умения принимать оптимальные решения на основе фактических данных, навыков решения проблем, так необходимые студентам в их дальнейшем образовательном процессе, а также в профессиональной и научной работе.

Однако, средний балл за весь период изучения дисциплины «Медицинская химия» с учётом оценки за итоговый тест на всех факультетах с 2020-2021 учебного года достоверно снижается (рисунок).

Средний балл студентов лечебного факультета за 2018-2019 учебный год составил 7,57 (размах от 4,8 до 9,8), за 2019-2020 учебный год – 7,68 (размах от 2,4 до 9,7), за 2020-2021 – 7,64 (размах от 3,0 до 9,9), за 2021-2022 – 7,11. (размах от 2,8 до 9,7). Достоверное снижение по U критерию Манна-Уитни наблюдается только в последний год ($p < 0,0001$). Средний балл студентов педиатрического факультета за 2018-2019 учебный год составил 6,87 (размах от 3,6 до 9,3), за 2019-2020 учебный год – 7,89 (размах от 5,5 до 9,8), за 2020-2021 – 6,85 (размах от 3,6 до 9,6), за 2021-2022 – 5,99 (размах от 2,8 до 9,1). Достоверное повышение отмечено в 2019-2020 учебном году относительно 2018-2019 ($p < 0,0001$), в остальные годы началось достоверное снижение относительно друг друга ($p_1 < 0,0001$; $p_2 < 0,0001$). Средний балл студентов стоматологического факультета за 2018-2019 учебный год составил 8,04 (размах от 3,7 до 9,9), за 2019-2020 учебный год – 7,13 (размах от 1,0 до 10,0), за 2020-2021 – 8,45 (размах от 5,3 до 9,9), за 2021-2022 – 7,17 (размах от 3,3 до 9,5). Достоверное повышение среднего балла наблюдалось в 2020-2021 учебном году относительно 2019-2020 учебного года ($p < 0,0001$) и достоверное снижение в 2021-2022 относительно 2020-2021 учебного года ($p < 0,0001$). Разница среднего балла за 2019-2020 и за 2021-2022 учебные года недостоверна ($p = 0,8148$). Наименьший средней балл среди студентов всех факультетов отмечается у медико-профилактического факультета: за 2018-2019 учебный год составил 6,19 (размах от 3,4 до 8,8), за 2019-2020 учебный год – 7,55 (размах от 4,7 до 9,6), за 2020-2021 – 5,67 (размах от 3,3 до 9,4), за 2021-2022 – 4,35 (размах от 1,6 до 8,3). Достоверное повышение наблюдалось в 2019-2020 учебном году относительно 2018-2019 года ($p < 0,0001$), в последующее же учебные годы наблюдается достоверное снижение среднего балла. Достоверное снижение также отмечается при сравнении среднего балла за 2020-2021 учебный год относительно 2018-2019 учебного года ($p < 0,001$).

При этом со стороны кафедры и университета сделано всё возможное для успешного освоения студентами новой дисциплины, в том числе переработаны все материалы в системе e-test, которая является неотъемлемой частью современного образовательного процесса. Проведена аудиозапись всех лекций, что даёт возможность прослушать учебный материал в любое время и в любом месте. Подход преподавания новой дисциплины направлен на развитие

критического мышления у студентов и на исключение простого запоминания материала.

Лабораторно-практические занятия по медицинской химии проводятся еженедельно. Продолжительность занятий на медико-профилактическом факультете и стоматологическом факультете – 3 академических часа, на лечебном и педиатрическом факультетах – 2 академических часа. Однако, студенты изучают дисциплину «Медицинская химия» всего один семестр, не смотря на огромную важность тем, обсуждаемых на занятиях. Кроме того, современный образовательный процесс всё более и более направлен на переход с обучения на учение.

Выводы. Установлено, что с 2019-2020 учебного года наблюдается тенденция к снижению среднего балла студентов педиатрического и медико-профилактического факультетов по дисциплине «Общая химия», а затем и по дисциплине «Медицинская химия», а у студентов лечебного и стоматологического факультетов аналогичная тенденция наметилась с 2020-2021 учебного года. Отчасти это связано с сокращением часов, выделяемых на данную дисциплину. Более же существенной причиной, на наш взгляд, является отсутствие экзамена или дифференцированного зачёта как итоговых форм аттестации студентов.

В связи с переходом на преподавание новой дисциплины под названием «Медицинская химия» и для более успешного её освоения необходимо вернуть форму итоговой аттестации в виде экзамена для студентов лечебного, педиатрического, стоматологического и медико-профилактического факультетов.

Список литературы

1. Печинский, С. В. Медицинская химия – новая дисциплина в фармацевтическом образовании / С. В. Печинский, А. Г. Курегян // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №3. URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=13045 (дата обращения: 12.09.2022).

2. Научный и образовательный процесс на кафедре общей химии БГМУ в условиях глобальных вызовов и цифровизации / Т. В. Прохорова [и все] // Проблемы устойчивого развития регионов Республики Беларусь и сопредельных стран: сб. науч. статей XI Междунар. науч.-практ. интернет-конф., 1–30 июня 2022 г., г. Могилев / под ред. Н. В. Маковской. – Могилев: МГУ имени А. А. Кулешова. – 2022. – С. 108–111.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ КУРСА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ГЛАЗАМИ ИНОСТРАННЫХ УЧАЩИХСЯ (РЕЗУЛЬТАТЫ АНКЕТИРОВАНИЯ)

Ринейская Ольга Николаевна
к.м.н., доцент, заведующий кафедрой биоорганической химии, УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск,
ryneiskaya@mail.ru
Глинник Станислава Владимировна
к.м.н., доцент, доцент, УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск,
hlinnik-bioorganic@yandex.by
Зайтуллаева Любовь Энверовна
старший преподаватель, УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск,
liublya@mail.ru

Обучение иностранных студентов на неродном для них языке всегда сопровождается трудностями как у обучающихся, так и у преподавателей. Цель данного исследования - выявление проблем в обучении студентов медицинского факультета иностранных учащихся, которые возникают при изучении курса биоорганической химии в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет». Материалами исследования выступали результаты анкетирования, проведенного среди иностранных студентов в период 2021-2022 учебного года. В исследовании были применены такие методы как наблюдение, анкетирование, анализ, сравнение и обобщение. Выявлено, что процесс изучения дисциплины «Биоорганическая химия» вызывает умеренный интерес со стороны студентов, сопровождается значительными трудностями при самостоятельном обучении и требует активного участия преподавателей в образовательной деятельности учащихся.

Ключевые слова: *биоорганическая химия, иностранные студенты, анкетирование.*

EDUCATIONAL AND METHODOLOGICAL SUPPORT OF THE COURSE OF BIOORGANIC CHEMISTRY IN THE EYES OF INTERNATIONAL STUDENTS (SURVEY RESULTS)

Ryneiskaya Olga Nicolaevna
C.M.Sc., Associate Professor, Head of the Bioorganic Chemistry department, Belarusian State Medical University, Minsk,
ryneiskaya@mail.ru
Hlinnik Stanislava Uladimirauna
C.M.Sc., Associate Professor, Associate Professor, Belarusian State Medical University, Minsk,

hlinnik-bioorganic@yandex.by
Zaitullaeva Liubov Enverovna
Senior teacher, Belarusian State Medical University, Minsk,
liublya@mail.ru

International students teaching in a non-native language is always accompanied by difficulties for both students and teachers. The purpose of this study was to identify problems in teaching students of the medical faculty of international students that arise when studying the course of bioorganic chemistry at the educational institution "Belarusian State Medical University". The research materials were the results of a survey conducted among international students during the 2021-2022 academic year. The study used such methods as observation, questioning, analysis, comparison and generalization. The process of studying the discipline "Bioorganic Chemistry" arouses moderate interest on the part of students, is accompanied by significant difficulties in self-study and requires the active participation of teachers in the educational activities of students.

Key words: *bioorganic chemistry, international students, questioning.*

Не секрет, что уровень исходной подготовки студентов медицинского факультета иностранных учащихся (МФИУ) по химии остается в целом невысоким. В ряде стран, из которых прибывают иностранные студенты, органическая химия не входит в школьную программу. В связи с этим у них возникают большие трудности при освоении биоорганической химии. Однако, существуют и другие факторы, которые препятствуют успешному формированию знаний и развитию практических навыков иностранных студентов, что сказывается на их успеваемости [1-3].

На протяжении 2021–2022 учебного года нами было проведено анкетирование студентов 1 курса медицинского факультета иностранных учащихся, обучающихся по специальностям 1-79 01 01 «Лечебное дело» и 1-79-01-07 «Стоматология», с русским языком обучения. В анкетировании приняло участие 36 студентов (по две группы от каждой специальности). Каждый вопрос содержал шкалу значимости в баллах от 1 до 10 с шагом в один балл, и в зависимости от контекста вопроса крайние показатели отражали максимально положительное либо максимально негативное отношение.

Результаты. Высокую эффективность проводимых лабораторных занятий по дисциплине «Биоорганическая химия» отметили 72,3 % (в диапазоне 6-10 баллов) опрошенных студентов. Ими была отмечена доступность изложения преподавателями трудных для понимания вопросов темы, доброжелательность и заинтересованность преподавателей в конечном результате.

Также студентам было предложено оценить доступность изложения материала в учебном пособии, созданном сотрудниками кафедры. В полученных результатах было приблизительно равномерное распределение ответов в

диапазоне от 7 до 14 % на каждый шаг шкалы (от 1 балл – «непонятно» до 10 баллов – «доступно»), что показывает субъективность восприятия изложенного материала каждым обучающимся.

Утвердительно ответили на вопрос о прослушивании лекционного курса, размещенного в ЭУМК, 80,2 % студентов. Из них 24,4 % студентов просмотрели все видеолекции курса биоорганической химии; 55,8 % – часть лекций. 9,1 % проанкетированных студентов не считали необходимым просматривать все лекции, что, возможно, объясняется возобновлением чтения лекций в очном формате. Отметили высокую эффективность заполнения практикума по дисциплине 83,9% опрошенных студентов (от 7 до 10 баллов). Большая часть респондентов (78,1 % в диапазоне от 4 до 7 баллов) проявляла умеренный интерес к дисциплине «Биоорганическая химия». Очень высокий интерес был отмечен у 17,6 % иностранных студентов (в диапазоне от 8 до 10 баллов). В комментариях к этому вопросу студенты высказывали заинтересованность при изучении тем, связанных со структурой и свойствами биологически активных веществ.

Трудность изучения биоорганической химии оценена в диапазоне от 7 до 10 баллов 64,5 % иностранных студентов. У 32,7 % (3–6 баллов) опрошенных не возникало заметных трудностей при освоении дисциплины. Однако лишь 2,8 % респондентов высказались о том, что изучение дисциплины для них было не трудным. Часть студентов испытывали трудности при самостоятельном овладении химической терминологии на неродном языке. Считают важным изучение дисциплины «Биоорганическая химия» для будущей специальности 44,4 % (от 4 до 7 баллов) анкетируемых; 50,4 % ответов студентов находились в диапазоне 8-10 баллов. Лишь 5,2 % опрошенных посчитали биоорганическую химию неважной дисциплиной для их будущей профессиональной деятельности.

Таким образом, проведенное исследование показало, что для большинства опрошенных иностранных студентов биоорганическая химия является сложным предметом, вызывающим трудности при самостоятельном изучении. Это может быть связано с низким уровнем школьной подготовки студентов медицинского факультета иностранных учащихся, так как преподавание и успешное изучение данной учебной дисциплины осуществляется на базе приобретенных студентом знаний и умений по органической химии за курс средней образовательной школы.

Список литературы

1. Н.В. Шарыпова [и др.], Особенности преподавания химических дисциплин иностранным студентам в педагогическом вузе // Современные проблемы науки и образования. – 2021. – № 2; URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=30546 (дата обращения: 16.09.2022).

2. А.В. Кондрашова, Преподавание химической дисциплины иностранным студентам // Школа будущего. – 2019. – № 3. – С. 268-275.

3. Е.В. Хайдукова, Опыт преподавания химических дисциплин иностранным // Модернизация системы профессионального образования: практическое внедрение нового содержания и технологий: материалы Международного электронного симпозиума. Махачкала, 2015. – С. 79-83.

IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ РИВАРОКСОБАНА К β-КЕТОАЦИЛ[АСР]СИНТАЗЕ 3

Ринейская Ольга Николаевна
к.м.н., доцент, заведующий кафедрой биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
ryneiskaya@mail.ru
Лахвич Фёдор Фёдорович
к.х.н., доцент, доцент кафедры биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
lakhvichtt@gmail.com

Целью исследованияя явилось изучение активности in silico активности Ривароксобана как представителя оксазолидинонов по отношению к β-кетоацил[АСР]синтазе 3. При помощи методов молекулярного докинга установлены центры связывания Ривароксабана с протеином. Для центра, обеспечивающего наибольшую аффинность Ривароксабана с протеином были проанализированы кластеры с числом пробегов более 6 и энергией связывания менее -9,0 ккал/моль).

Ключевые слова: *аффинность; β-кетоацил[АСР]синтаза 3; молекулярный докинг; оксазолидиноны; Ривароксабан.*

IN SILICO STUDY OF RIVAROXABAN BINDING AFFINITY TO β-KETOACYL[ACP]SYNTHASE 3

Ryneiskaya Volha Mikolaevna
Ph.D. in Medicine, Head of Bioorganic Chemistry Department of Belarusian State Medical University, Minsk
ryneiskaya@mail.ru
Lakhvich Todar Todarovich
Ph.D. in Chemistry, Associate Professor of Bioorganic Chemistry Department of Belarusian State Medical University, Minsk
lakhvichtt@gmail.com

The activity of Rivaroxoban as a representative of oxazolidinones in relation to β-ketoacyl[ACP]synthase 3 was studied in silico. With the help of molecular docking methods, the binding centers of Rivaroxaban with protein have been determined. For the center providing the highest affinity of Rivaroxaban with protein, clusters with a number of runs of more than 6 and a binding energy of less than -9.0 kcal/mol have been analyzed).

Keywords: *affinity; β-ketoacyl[ACP]synthase 3; molecular docking; oxazolidinones; Rivaroxaban.*

Поиск лекарственных средств, представителей новых классов веществ, для лечения резистентных форм туберкулеза представляет собой практически

значимую проблему здравоохранения [1]. Относительно новым направлением в разработке антибактериальных средств, в том числе противотуберкулёзных, является создание молекул, воздействующих на ферменты процессов синтеза жирных кислот. Наличие различных типов синтаз жирных кислот (FAS) у млекопитающих и бактерий, а также тот факт, что ферменты FAS необходимы для синтеза специфических для клеточной стенки Mycobacterium tuberculosis миколовых кислот, делают их очень привлекательной мишенью противотуберкулезных препаратов. Ранее нами была изучена активность различных классов соединений (производных изонипекотиновых кислот, альдонамидов, оксазолидинонов) по отношению к β-кетоацил[ACP]синтазе 1 [2-4], которая участвует в синтезе миколовых кислот путем введения двух атомов углерода в структуру длинноцепочечных субстратов. В настоящем исследовании мы изучили аффинность производного оксазолидинона по отношению к β-кетоацил[ACP]синтазе 3. Данный фермент играет ключевую роль в синтезе миколовых кислот, так как катализирует первую реакцию конденсации, инициирует синтез жирных кислот, и поэтому может играть роль в регуляции процесса образования длинноцепочечных миколовых кислот в целом.

Целью нашей работы является изучение аффинности и характера взаимодействий Ривароксабана по отношению β-кетоацил[ACP]синтазе 3 в пределах основных кластеров.

Материалы и методы. Информация о трехмерной структуре фермента β-кетоацил[ACP]синтазы 3 (код белка 1U6E, цепь A) получена с сайта Protein Data Bank (https://www.rcsb.org). Для молекулярного докинга *in silico* использовался ряд специализированных программ: программные ресурсы ChemOffice, AutoDock Tools 1.5.7, Pymol, OpenBabelGUI, онлайн-серверы Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index) и Protein-Plus (https://proteins.plus).

AutoDock 4 использовался для подготовки лигандов к стыковке с рецептором, расчета сетки потенциалов и непосредственно лиганд-белковых взаимодействий. При стыковке с целью оптимизации процесса в Autodock использовался генетический алгоритм поиска глобального минимума Ламарка (LGA) с числом прогонов 100, размером популяции 300 для жесткого рецептора и гибкого лиганда. Взаимодействие лиганда и белка оценивалось при помощи характеристик, полученных в результате докинга: энергии связывания ($E_{связ.}$) и константы ингибирования (K_i). В настоящей работе энергией связывания считали наименьшее значение изменения свободной энергии Гиббса при переходе комплекса лиганд-протеин из несвязанного состояния в связанное. Программа OpenBabelGUI использовалась в качестве конвертера форматов, требуемых AutoDock 4, PLIP и Protein-Plus. Поиск центров связывания, изучение характера взаимодействий лигандов с рецептором производился при помощи программы Pymol, онлайн-серверов PLIP и Protein-Plus.

Результаты и их обсуждение. Ривароксабан является производным оксазолидинона и широко используется в настоящее время в качестве антикоагулянта. Ранее нами была показана возможность проявления антимикобактериальной активности производными оксазолидинонов [4]. Представлен на рисунке 1.

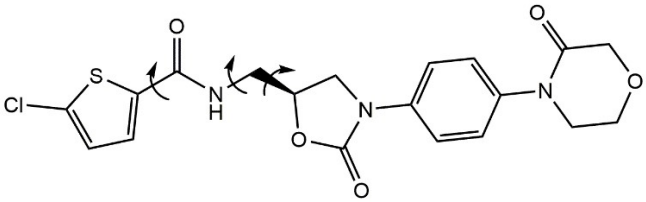


Рисунок 1 – Структурная формула Ривароксабана: молекула содержит 3 связи, вокруг которых возможно вращение

Чтобы определить, является ли β-кетоацил[ACP]синтаза 3 мишенью Ривароксабана, нами был проведен «слепой» докинг указанных протеина и лиганда. Было показано наличие нескольких карманов (рисунок 2). В рамках обозначенного на рисунке мажорного кармана было выявлено 92 (из 100) варианта стыковки.

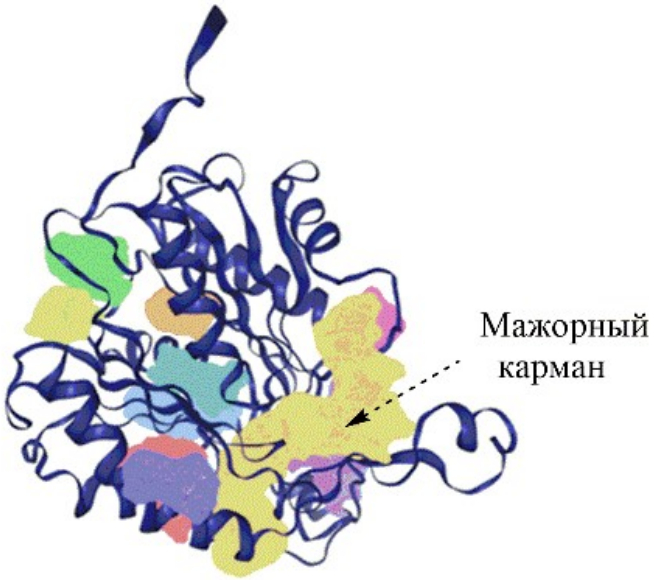


Рисунок 2 – Вероятные центры связывания β-кетоацил[ACP]синтазы 3 (цепь А), полученные при помощи онлайн-сервера Protein-Plus

Для комплекса с минимальной энергией связывания (-10,23 ккал/моль) были установлены координаты атомов аминокислотных остатков, участвующих в стыковке с целью проведения докинга в ограниченной области молекулы протеина (ограниченный докинг). Далее для детализации характеристик связывания лиганда в активном центре проводился докинг в ограниченной области протеина, центр которой был рассчитан по результатам «слепого» докинга: размер 60 х 60 х 60, координаты центра 14,589; 15,877; -6,728.

Таблица 1 – Показатели, характеризующие кластеры докинга Ривароксабана и β-кетоацил[ACP]синтазы 3 в ограниченной области

№	Минимальная $E_{связ.}$, ккал/моль	Средняя $E_{связ.}$, ккал/моль	Число пробегов в пределах кластера
1	-10,19	-9,87	5
3	-9,43	-8,41	27
7	-9,21	-9,56	4
8	-8,7	-8,55	4
10	-8,37	-7,93	4
12	-8,05	-7,65	6
18	-7,46	-7,13	14
21	-7,00	-6,88	5

В результате эксперимента были получены показатели, близкие по значению к характеристикам «слепого» докинга. Ограниченный докинг выявил 22 кластера, характеризующихся различной конформацией и позицией лиганда по отношению к протеину (9 из них характеризуются числом пробегов 4 и более). Для дальнейшего анализа выбраны кластеры 1 и 3 с числом пробегов 5 и 27 и энергией связывания менее -9,40 ккал/моль (таблица 1).

Для обоих кластеров гидрофобные взаимодействия играют исключительно важную роль в формировании аффинности лиганда к рецептору в пределах. Так, остатки Phe, Val, Ala, Ile и Leu для кластера 1, аналогично остатки Gly, Val, Ile и Leu формируют протяженную гидрофобную матрицу вдоль которой «вытягивается» молекула Ривароксабана. Влияние гидрофильного взаимодействия лиганда с Ser в пределах кластера 1 носит вспомогательный характер, обеспечивая ориентацию оксазолидинонового фрагмента. Геометрически кластер 3 отличается от кластера 1 поворотом (опрокидыванием) практически на 180 градусов в пределах мажорного кармана.

При формировании аффинности кластера 3 растет роль гидрофильных взаимодействий. Наибольшую роль в формировании этих взаимодействий играют остатки Arg и Asn. При этом вытянутая структура лиганда обеспечивают образование нескольких водородных связей, в которых карбонильная группа оксазолидинонового цикла является акцептором протонов двух аминокислотных остатков: Arg и Asn. Для этого кластера также растет роль оксазинонового фрагмента в образовании водородных связей с остатком Asn. Можно предположить, что конкретная позиция лиганда в пределах этих кластеров может меняться в рамках реализации одного механизма, обеспечивающего физиологический отклик. При этом можно предположить, что незначительные изменения характеристик среды (например, pH, присутствие ионов и пр.) приведут к переходу от энергетически доминирующего кластера ($E_{связ.}$= -10,19 ккал/моль; с преимущественно гидрофобными взаимодействиями) к статистически доминирующему кластеру 3 ($E_{связ.}$= -9,43 ккал/моль; с выраженным гидрофильным характером взаимодействия). Последнее может быть причиной возникновения физиологического отклика.

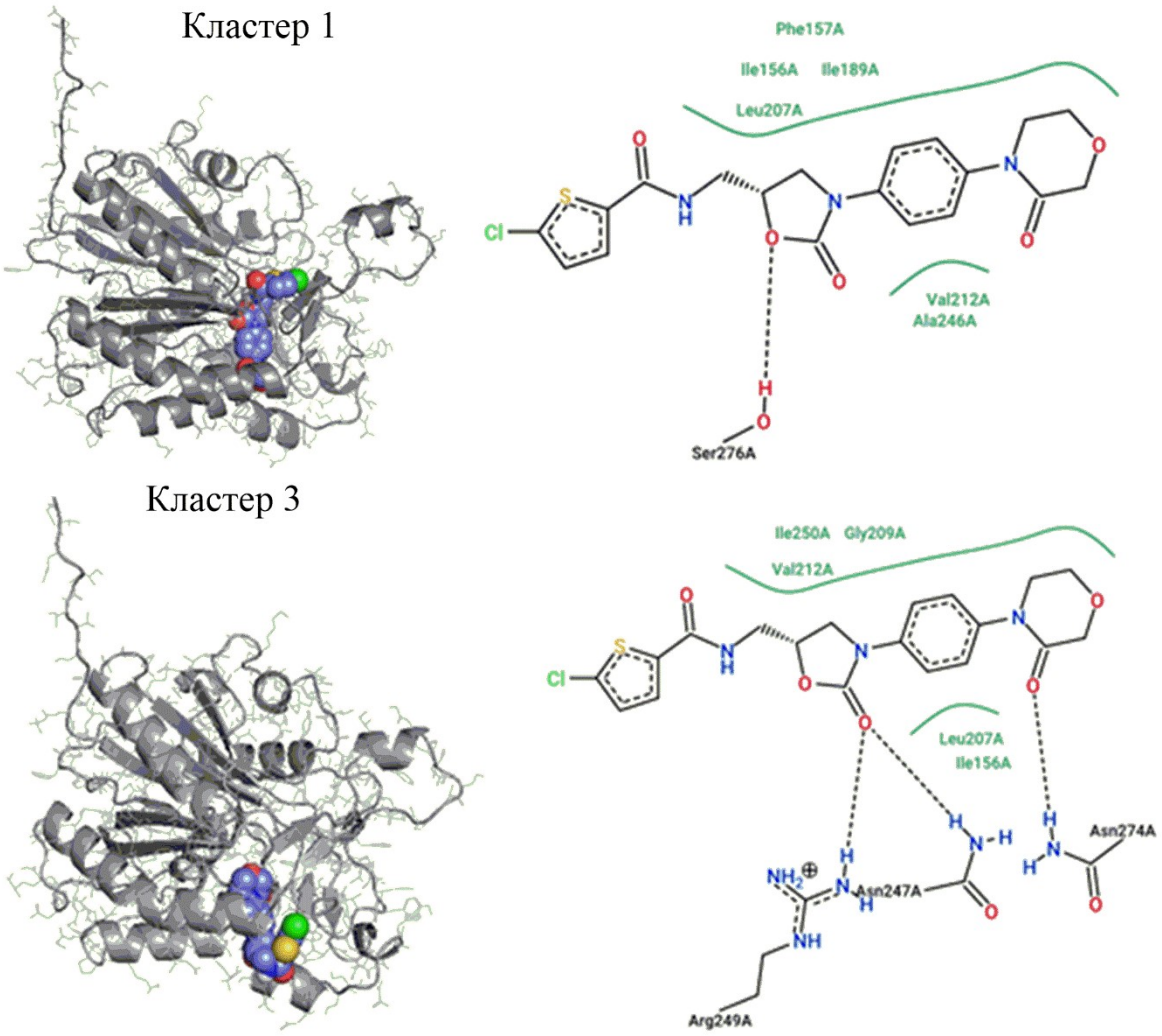


Рисунок 3 – Визуализация комплексов (Pymol) протеин-лиганд (слева) и типы взаимодействий (Protein-Plus) лиганда с протеином (справа), соответствующих кластерам 1,3

Проведенные ранее испытания показали антимикобактериальную активность Ривароксабана *in vitro*. Поэтому результаты нашего исследования с большой степенью вероятности подтверждают реализацию механизма антибактериального действия через ингибирование синтеза миколовых кислот.

Список литературы

1. Clinical outcome of individualized treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Latvia: a retrospective cohort study. / V. Leimane, V. Riekstina, T. Holtz, et al. // Lancet. – 2005.- V. 365(9456). – P. 318-326

2. Ф. Ф. Лахвич, Рациональный дизайн модели ациклических аналогов гидроксиизонипекотиновых кислот/ Ф. Ф. Лахвич, П.Ю. Зущик, А.Ф. Лахвич // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики. – 2019. – № 9. – С. 389 – 399.

3. Ф. Ф. Лахвич, Исследование сродства альдонамидов к рецепторам KASA в контексте разработки противотуберкулезных препаратов / Ф. Ф. Лахвич, М.И. Борова // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сборник научных трудов / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Белорусский государственный медицинский университет. – Минск: БГМУ, 2021. - Вып. 11. С. 518-523.

4. Ф. Ф. Лахвич, Исследование in silico зависимости структура-активность оксазолидинонов в поиске противотуберкулезных лекарственных средств / Ф. Ф. Лахвич, М.И. Борова, О.Н. Ринейская // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сборник научных трудов / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Белорусский государственный медицинский университет. – Минск: БГМУ, 2022. - Вып. 12. В печати.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОРБЦИИ ЦИТОКИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ТЕТРАПЕПТИДАМИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ

Рябцева Татьяна Владимировна
ассистент кафедры биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г.Минск
ta-yana@yandex.ru
Таганович Анатолий Дмитриевич
д.м.н., профессор, заведующий кафедры биологической химии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г.Минск
ataganovich@gmail.com

Цель данного исследования – оценить способность тетрапептидов, иммобилизованных в полиакриламидный гель, извлекать из плазмы крови провоспалительные цитокины.

Материалы и методы. В работе использовали синтетические тетрапептиды, иммобилизованные на стадии полимеризации в объем полиакриламидного геля. Эффективность оценивали по изменению концентрации цитокинов в плазме крови человека после ее контакта с гелем с пептидами и без них. Концентрацию цитокинов определяли иммуноферментным методом.

Впервые показана возможность удаления цитокинов с помощью специфических тетрапептидов, иммобилизованных в полиакриламидный гель.

Ключевые слова: *тетрапептиды; цитокины; полиакриламидный гель; сорбция; интерлейкин-6; интерлейкин-8; фактор некроза опухолей-альфа.*

EFFICIENCY OF BLOOD PLAMA CYTOKINES SORBTION BY TETRAPEPTIDES IMMOBILIZED ICЯ\N POLYACRYLAMIDE GEL

Ryabtseva Tatyana Vladimirovna
Assistant of the Department of Biological Chemistry, Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk
ta-yana@yandex.ru
Tahanovich Anatoli Dmitrievich
Dr.M.Sc., Professor, Head of Biological Chemistry Department, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus
taganovich@bsmu.by

The purpose of this study was evaluating the ability of immobilized tetrapeptides to extract pro-inflammatory cytokines from blood plasma.

Materials and methods. Synthetic tetrapeptides was immobilized at the stage of polymerization in the bulk of a polyacrylamide gel. Efficiency was assessed by the change in the concentration of cytokines in human plasma after its contact with the gel

with and without peptides. The cytokines concentration was determined by enzyme immunoassay.

It was shown for the first time the possibility of removing cytokines from plasma using the specific tetrapeptides immobilized in a polyacrylamide gel.

Keywords: *tetrapeptides; cytokines; polyacrylamide gel; sorption; interleukin-6; interleukin-8; tumor necrosis factor-alpha.*

Введение

Применение пептидов в медицине давно известно. Преимущества пептидов перед химическими низкомолекулярными соединениями заключаются в их высокой селективности, низкой токсичности, химическом и биологическом разнообразии. Короткоцепочечные (до 10 аминокислотных остатков) пептиды, обладают свойствами высокомолекулярных белков такими как антигенность (способность связываться с определенными эпитопами на поверхности антитела) и иммуногенность (способность вызывать специфический иммунный ответ). Однако, короткий период полураспада и низкая пероральная доступность существенно ограничивают возможности применения пептидов в клинической практике [1,2]. С целью устранения данных недостатков исследователями ведется разработка модификаций молекул пептидов. Одним из способов модификации может являться их иммобилизация на носителе и получение, так называемый, пептидных аптамеров. Они обладают основными преимуществами низкомолекулярных ингибиторов (низкая стоимость производства, низкая иммуногенность, высокая проницаемость) и моноклональных антител (высокая специфичность, низкая токсичность) [3].

Методами молекулярного моделирования было установлено, что тетрапептиды Trp-Asn-Trp-Val, Trp-Asp-Phe-Asp и Ser-Phe-Tyr-Arg потенциально способны к эффективному связыванию с ФНО-α, ИЛ-8 и ИЛ-6 так как являются структурными аналогами центров взаимодействия с этими лигандами в составе рецепторов и образуют с ними энергетически выгодные комплексы [4,5,6]. Поэтому *целью данного исследования* являлась экспериментальная оценка эффективности олигопептидов Trp-Asn-Trp-Val, Trp-Asp-Phe-Asp и Ser-Phe-Tyr-Arg, иммобилизованных в полиакриламидный гель, для удаления ФНО-α, ИЛ-8 и ИЛ-6 из плазмы крови.

Материалы и методы исследования. Для экспериментов использовали олигопептиды Trp-Asn-Trp-Val (WNWV), Trp-Asp-Phe-Asp (WDFD), Ser-Phe-Tyr-Arg (SFYR), синтезированные Changzhou Xuanming Chemical Co. Ltd., (Китай). Иммобилизацию олигопептидов проводили радикальной полимеризацией смеси растворов мономеров (акриламида и бис-акриламида) с раствором олигопептида. Перед реакцией полимеризации проводили N-ацилирование олигопептидов хлорангидридом акриловой кислоты. Круглодонные пробирки заполняли полиакриламидным гелем с иммобилизованным пептидом (5 мл), вносили 5 мл

плазмы крови с высоким содержанием провоспалительных цитокинов. Инкубировали 60 мин при комнатной температуре. Собирали плазму для определения концентрации цитокинов. Концентрацию цитокинов в плазме определяли с помощью набора реагентов для иммуноферментного определения (Вектор-Бест, Россия).

Результаты исследования обрабатывали с использованием пакетов статистического анализа данных Statistica10.0 («StatSoft Inc.»). Для описания и анализа результатов использовали методы непараметрической статистики, результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха.

Результаты экспериментов. После контакта плазмы с гелем (с пептидом и без) уменьшается концентрация ФНО-α. Концентрация ФНО-α, сорбированного гелем, увеличивается пропорционально росту исходной концентрации цитокина в плазме крови. Наибольшее снижение концентрации цитокина в плазме происходило после контакта с гелем с иммобилизованным пептидом Trp-Asn-Trp-Val, которое составило 231,4 (191,4;270,2) пг/мл при исходной концентрации цитокина 871,8 (815,8;957,2) пг/мл. (Таблица 1). После контакта с ПААГ без пептида снижение концентрации ФНО-α в плазме крови составило 35,1 (24,9;49,3) пг/мл. Таким образом, гель с иммобилизованным пептидом задерживает в 6,5 раз больше ФНО-α, чем гель без пептида.

Таблица 1 – Концентрация ФНО-α (пг/мл) в плазме крови после контакта с полиакриламидным гелем с иммобилизованным пептидом Trp-Asn-Trp-Val

Исходная [ФНО-α]	[ФНО-α] после контакта с гелем		A = $[C_{исх}]$ − $[C_{после}]$	
	ПААГ+WNWV	ПААГ+WNWV	ПААГ+WNWV	ПААГ
109,8 (102,2;121,0)	26,6 (22,9;32,5)* #	102,8 (93,9;111,5)*	79,6 (75,5;90,1)	7,2 (4,2;10,7)
210,9 (199,9;227,6)	91,2 (82,4;98,2)* #	198,8 (191,8;218,6)*	127,3 (101,6;145,3)*	8,9 (5,7;10,5)*
438,6 (410,6;490,3)	248,9 (219,2;267,1)* #	406,3 (389,5;464,3)*	199,3 (182,1;229,4)*	24,3 (17,5;30,7)*
871,8 (815,8;957,2)	671,0 (600,1;720,0)* #	826,0 (788,7;912,1)*	231,4 (191,4;270,2)*	35,1 (24,9;49,3)*

Примечание − ПААГ+WNWV – полиакриламидный гель с иммобилизованным Trp-Asn-Trp-Val, ПААГ - полиакриламидный гель без пептида, * – $p<0,05$, при сравнении исходных значений и после контакта с гелем (тест Вилкоксона); # – $p<0,05$ при сравнении результатов «ПААГ+WNWV» и «ПААГ» (тест Манна-Уитни).

Концентрация ИЛ-8 в плазме крови уменьшалась после контакта с

ПААГ+WDFD существенно ниже, чем после контакта с ПААГ. При исходной концентрации ИЛ-8 в плазме 680,9 (655,0;702,6) пг/мл, его количество в плазме после контакта с ПААГ+WDFD уменьшилось до 466,7 (437,3;509,3) пг/мл после ПААГ с пептидом, а после ПААГ – до 639,7 (622,0;656,2) пг/мл (таблица 2). Более выраженное снижение концентрации ИЛ-8 наблюдается после контакта плазмы крови с ПААГ+WDFD.

Разница концентрации цитокина в образцах плазмы крови до и после контакта с ним нарастала с 49,0 (41,8;59,8) пг/мл до 201,8 (173,1;225,7) пг/мл при увеличении исходной концентрации ИЛ-8 в плазме с 74,7 (71,0;86,5) пг/мл до 680,9 (655,0;702,6) пг/мл. После контакта плазмы с ПААГ без пептида аналогичная разница в образцах плазмы изменялась с 12,5 (10,2;14,7) пг/мл до 37,6 (17,3;53,7) пг/мл соответственно (таблица 2). По результатам эксперимента видно, что ПААГ+WDFD удаляет в 4-6 раз больше ИЛ-8, чем гель без пептида.

Уменьшение концентрации ИЛ-6 в плазме наблюдали после контакта плазмы крови с иммобилизованным Ser-Phe-Tyr-Arg в ПААГ (ПААГ+SFYR) и с ПААГ без пептида. Исходная концентрация ИЛ-6 в плазме 551,3 (507,5;568,8) пг/мл снизилась до 424,7 (410,4;468,3) пг/мл после ПААГ+SFYR, после ПААГ без пептида - до 530,3 (455,1;543,7) пг/мл (таблица 3).

Таблица 2 – Концентрация ИЛ-8 (пг/мл) в плазме крови после контакта с полиакриламидным гелем с иммобилизованным пептидом Trp-Asp-Phe-Asp

Исходная [ИЛ-8]	[ИЛ-8] после контакта с гелем		$A = [C_{исх}] - [C_{после}]$	
	ПААГ+WDFD	ПААГ	ПААГ+WDFD	ПААГ
74,7 (71,0;86,5)	23,2 (20,0;32,3)* #	64,9 (59,9;73,0)*	49,0 (41,8;59,8)	12,5 (10,2;14,7)
150,7 (143,6;173,1)	64,9 (59,0;72,7)* #	134,9 (130,3;151,8)*	90,6 (72,0;109,6)*	19,5 (10,0;24,8)*
324,0 (317,8;336,3)	174,3 (165,9;189,6)* #	298,5 (292,4;310,8)*	148,4 (140,9;176,9)*	24,5 (19,2;31,5)*
680,9 (655,0;702,6)	466,7 (437,3;509,3)* #	639,7 (622,0;656,2)*	201,8 (173,1;225,7)*	37,6 (17,3;53,7)

Примечание − ПААГ+WDFD – полиакриламидный гель с иммобилизованным Trp-Asp-Phe-Asp, ПААГ- полиакриламидный гель без пептида, * – $p<0,05$, при сравнении исходных значений и после контакта с гелем (тест Вилкоксона); # – $p<0,05$, при сравнении результатов «ПААГ+WDFD» и «ПААГ» (тест Манна-Уитни).

По мере увеличения исходной концентрации цитокина в плазме крови с 67,1 (62,1;75,3) пг/мл до 551,3 (507,5;568,8) пг/мл, разница концентрации после

контакта с ПААГ нарастает. Наибольшая разница концентрации ИЛ-6 в плазме крови после контакта с ПААГ+SFYR составляет 91,7 (83,8;128,4) пг/мл, а после контакта с ПААГ без пептида - 24,9 (19,6;42,9) пг/мл. Таким образом, ПААГ с пептидом задерживает в 3,5 раза больше ИЛ-6 из плазмы крови, чем ПААГ без пептида.

Таблица 3 – Концентрация ИЛ-6 (пг/мл) в плазме крови после контакта с полиакриламидным гелем с иммобилизованным пептидом Ser-Phe-Tyr-Arg

Исходная [ИЛ-6]	[ИЛ-6] после контакта с гелем		A = [$C_{исх}$] − [$C_{после}$]	
	ПААГ+SFYR	ПААГ	ПААГ+SFYR	ПААГ
67,1 (62,1;75,3)	26,0 (21,2;29,8)* #	57,6 (54,0;62,7)*	40,7 (39,8;49,9)	7,1 (6,2;12,9)
130,9 (122,0;146,1)	82,7 (75,4;93,7)* #	119,4 (109,7;128,5)*	50,9 (42,1;55,8)	13,2 (9,5;16,2)*
259,6 (242,8;255,4)	190,8 (185,3;209,7)* #	240,0 (219,2;264,4)*	69,2 (51,1;79,5)*	18,0 (16,6;20,1)*
551,3 (507,5;568,8)	424,7 (410,4;468,3)* #	530,3 (455,1;543,7)*	91,7 (83,8;128,4)*	24,9 (19,6;42,9)*

Примечание − ПААГ+SFYR – полиакриламидный гель с иммобилизованным Ser-Phe-Tyr-Arg, ПААГ - полиакриламидный гель без пептида, * – $p<0,05$, при сравнении исходных значений и после контакта с гелем (тест Вилкоксона); # – $p<0,05$, при сравнении результатов «ПААГ+SFYR» и «ПААГ» (тест Манна-Уитни).

Выводы. Иммобилизованные в ПААГ пептиды Trp-Asn-Trp-Val, Trp-Asp-Phe-Asp, Ser-Phe-Tyr-Arg увеличивают способность геля удалять провоспалительные цитокины из плазмы крови: ФНО-α – в 6 раз, ИЛ-8 – более чем в 4 раза, а ИЛ-6 – в 3,5 раза.

Олигопептиды, иммобилизованные в ПААГ, могут быть использованы для разработки гемосорбентов, снижающих концентрацию ФНО-α, ИЛ-8 и ИЛ-6 в плазме крови человека, так как являются специфичным и безопасным средством связывания и удаления провоспалительных цитокинов.

Список литературы

1. S. Menegatti, The hidden potential of small synthetic molecules and peptides as affinity ligands for bioseparations / S. Menegatti // Pharm.Bioprocess. – 2013. – Vol.1, №5. – P.467–485.

2. M. H. V. Van Regenmortel, Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic peptides / M. H. V. Van Regenmortel // Peptides Biologicals. – 2001. – Vol.29. – P.209–213.

3. M. Boshtam, Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: a review / M.Boshtam, S.Asgary, S.Kouhpayeh // Inflammation. – 2016. – Vol.40, №1. – P. 340–349.

4. Т.В. Рябцева, Молекулярное моделирование и анализ взаимодействия олигопептидов с интерлейкином-8 / Т.В.Рябцева, Д.А.Макаревич, А.Д.Таганович // Новости медико-биологических наук. – 2021. – Т.21, №3. – С.179–188.

5. Молекулярное конструирование и виртуальный докинг лигандов для связывания и элиминирования из плазмы крови интерлейкина-6 / Т.В. Рябцева, и др. // Известия национальной академии наук Беларуси.Серия биологических наук. – 2019. – Том 64, № 3. – С. 350–358.

6. Т. В. Рябцева, Моделирование и анализ взаимодействия олигопептидов с фактором некроза опухолей-альфа / Т.В. Рябцева, Д.А. Макаревич, А.Д. Таганович // Известия национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. – 2021. – Том 66, № 4. – С. 453–461.

МИКРОБИОТА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И СТРЕСС

Седакова Валентина Антоновна
к.т.н., доцент, заведующий кафедрой естествознания учреждения образования «Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова», город Могилев,
sedakova@msu.by
Клебанова Наталья Александровна
к.х.н., доцент, доцент кафедры естествознания учреждения образования «Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова», город Могилев,
klebanova@msu.by
Бибикова Мария Сергеевна
студентка 3 курса факультета математики и естествознания учреждения образования «Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова», город Могилев,
masha.bibikova.45@gmail.com
Клебанов Александр Владимирович
к.х.н., доцент, доцент кафедры естествознания учреждения образования «Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова», город Могилев,
klebanov@msu.by

В работе показана взаимосвязь «микробиота-кишечник-мозг» и важность изучения прогностической значимости характера метаболитного профиля кишечной микрофлоры на фоне стресса. Современные данные о биохимических и физиологических особенностях микробиоты кишечника и её влияния на организм человека рекомендовано включать в учебные программы при преподавании таких дисциплин биологического профиля, как «Микробиология» и «Нормальная физиология».

Ключевые слова: *микробиота кишечника; стресс; пробиотики и пребиотики; микробиология.*

GASTROINTESTINAL MICROBIOTA AND STRESS

Sedakova Valentina Antonovna,
C.T.Sc., Docent, Head of the Department of Natural Science Mogilev State A. Kuleshov University, Mogilev,
sedakova@msu.by
Klebanova Natalya Alexandrovna,
C.Ch.Sc., Docent, Associate Professor of the Department of Natural Science Mogilev State A. Kuleshov University, Mogilev,
klebanova@msu.by
Bibikova Maria Sergeevna,

3rd year student of the Faculty of Mathematics and Natural Science
Mogilev State A. Kuleshov University, Mogilev,
masha.bibikova.45@gmail.com
Klebanov Aleksandr Vladimirovich,
C.Ch.Sc., Docent, Associate Professor of the Department of Natural Science Mogilev State A. Kuleshov University, Mogilev,
klebanov@msu.by

The paper shows the relationship "microbiota-gut-brain" and the importance of studying the prognostic significance of the nature of the metabolic profile of the intestinal microflora on the background of stress. It is recommended to include up-to-date data on the biochemical and physiological features of the intestinal microbiota and its effect on the human body in curricula when teaching biological disciplines such as "Microbiology" and "Normal Physiology".

Keywords: *gut microbiota; stress; probiotics and prebiotics; microbiology.*

На сегодняшний день в научной среде сформировались определенные взгляды на функционирование микрофлоры и ее значение для организма хозяина. Доказано наличие взаимодействия между микробиотой кишечника и эндокринной, нейро-иммунной, иммунной системой, которое тем не менее недостаточно изучено. Перспективным направлением исследований является изучение оси микробиота-кишечник-мозг и различных расстройств (от стресса до депрессии). Модификация кишечной микробиоты с помощью пробиотиков, пребиотиков и постбиотиков открывает новые подходы к изменению функций мозга и лечению стрессовых расстройств с учетом новых взаимосвязей «микробиота-кишечник-мозг». В связи с чем изучение прогностической значимости характера метаболитного профиля кишечной микрофлоры (состава короткоцепочечных жирных кислот) на фоне стресса, влияние на данный профиль микробиома введения биологически активных добавок может послужить научным обоснованием для разработки отечественных биологически активных добавок для коррекции микробиоты кишечника в условиях воздействия стрессовых факторов на организм.

Исследования оси микробиом-кишечник-мозг ведется многими научными коллективами, в разных направлениях, с целью установления механизмов взаимодействия микробиоты, посредством вырабатываемых ею метаболитов, и мозга. Для человека наиболее значимой является микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1, 2, 3]. В различных отделах ЖКТ видовой состав и количественные показатели микрофлоры изменяются в довольно широком диапазоне: от 10^2 до 10^{13} клеток на 1 $см^3$ содержимого. При этом минимальное количество микрофлоры обнаруживается в желудке из-за высокой кислотности и воздействия протеолитических ферментов, а максимальное – в толстой кишке [4]. Токсины, продуцируемые патогенными микроорганизмами либо

популяционные изменения в кишечной микробиоте запускают механизм саморегуляции (первичный иммунный ответ) – аутофагию [5, 6]. Кишечный гомеостаз регулируется рядом эндогенных регуляторных молекул, продукция которых зависит от поступающих с пищей компонентов [7]. Известно, что состав и разнообразие микробиоты и, как следствие, её метаболитный профиль, может изменяться под действием различных факторов, в том числе стресса [8, 9]. Это подтверждается исследованиями проведенными на животных моделях [9, 10, 11, 12, 13], которые убедительно демонстрируют различия в составе и численности микрофлоры в стрессовых и контрольных группах. Существенное изменение в составе и количестве микроорганизмов флоры кишечника приводит к развитию дисбиоза, который влияет на гомеостаз хозяина и требует адекватного лечения. Одним из традиционно используемых способов коррекции дисбиоза кишечника является использование в пищу таких биологически активных добавок, как пробиотики – живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу для здоровья хозяина и пребиотики – субстраты, которые избирательно используются микроорганизмами хозяина, принося пользу для здоровья [14]. Широкий интерес к пробиотикам и пребиотикам как биологически активным добавкам, способным модулировать функции микробиоты со стороны научного сообщества привел к появлению еще одной группы добавок – постбиотики [14]. Физиологическое действие постбиотиков связывают с биологически активными метаболитами инактивированных бактерий [15, 16, 17].

Поддержка здоровой микробиоты кишечника за счет пробиотиков, пребиотиков и постбиотиков особенно в условиях неблагоприятных факторов среды в настоящее время признана важным условием для здоровья мозга. Поскольку влияние стрессовых факторов приводит к изменению состава кишечной микрофлоры и ее метаболитного профиля, то введение в рацион добавок с разным механизмом воздействия на микрофлору (пробиотиков, пребиотиков, постбиотиков) приводит к изменению метаболитного профиля микробиоты и способствует ее нормализации в условиях острого и хронического стресса, что повышает устойчивость организма к стрессу в целом.

Таким образом, взаимосвязь микробиоты кишечника и нормального функционирования организма человека на сегодняшний день широко исследуется и освещается в научной литературе.

При преподавании учебных дисциплин рекомендуется применять разнообразные сочетания элементов проблемного и развивающего обучения, индивидуально ориентированного подхода, отражать современное состояние и пути развития химических и биологических наук, что позволяет будущим специалистам в теоретическом плане быть более мобильным и отзывчивым к запросам времени.

В связи с чем, появляющиеся новые данные о биохимических и физиологических особенностях микробиоты кишечника и её влияния на организм человека целесообразно включать в учебные программы при преподавании таких дисциплин биологического профиля, как «Микробиология» и «Нормальная физиология» особенно для студентов специальности «Медико-биологическое дело».

Список литературы

1. Е.М. Булатова, Кишечная микробиота: современные представления / Е.М. Булатова, Н.М. Богданова, Е.А. Лобанова, Т.В. Габрусская // Педиатрия. – 2009. –Т.87. – №3. – С.104-110.

2. А.И. Хавкин, Пробиотичекие продукты питания и естественный иммунитет / А.И. Хавкин // Лечащий врач. – 2009. – №8. – С.84-86.

3. М.Д. Ардатская, Дисбактериоз кишечника: современные аспекты изучения проблемы, принципы диагностики и лечения / М.Д. Ардатская, А.В. Дубинин, О.Н. Минушкин // Тер.архив. – 2001. – №2. – С.67-72.

4. P.L. Stark, The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formulafed infants during the first year of life/ P. L. Stark, Lee Capital, A. Cyrillic// J. Med. Microbiol. – 1982. – №15(2). – P.189-203.

5. V. Deretic, Autophagy, immunity, and microbial adaptations. / V. Deretic, B. Levine// Cell Host Microbe. – 2009. – №5. – P.527-549, doi:10.1016/j.chom.2009.05.016.

6. B. Levine, Autophagy in immunity and inflammation. / B. Levine, N. Mizushima, H.W. Virgin // Nature – 2011. – Vol.469. – P. 323–335.

7. J. Hofmanova, Interaction of dietary fatty acids with tumour necrosis factor family cytokines during colon inflammation and cancer / J. Hofmanova et.al. // Mediators of inflamm. – 2014. – doi: 10.1155/2014/848632.

8. S.M. O'Mahony, Maternal separation as a model of brain – gut axis dysfunction / S.M. O'Mahony, N. P. Hyland, T.G. Dinan, J. F. Cryan // Psychopharmacology. – 2011. – doi: 10.1007/s00213-010-2010-9.

9. H. Fukui, Effect of probiotic Bifidobacterium bifidum G9-1 on the relationship between gut microbiota profile and stress sensitivity in maternally separated rats / H. Fukui et al. //Scientific Reports 8. Article number: 12384 (2018).

10. M.A. Schachtle The microbiota – gut – brain axis in health and disease and its implications for translational research / M.A. Schachtle, S.P. Rosshart // Frontiers in cellular neuroscience. – 2021. – doi: 10.3389/fincel.2021.698172.

11. M. Clos-Garcia, Gut microbiome and serum metabolome analyses identify molecular biomarkers and altered glutamate metabolism in fibromyalgia / M. Clos-Garcia et al. // EBioMedicine. – 2019. – doi: 10.1016/j.ebiom.2019.07.031.

12. Y. Li, Gut microbiota changes and their relathionship with inflammation in patients with acute and chronic insomnia / Y. Li et al. // nat Sci Sleep. – 2020. – doi: 10.2147/NSS.S271927.

13. Z. Xiang Potential implications of SARS-CoV-2 oral infection in the host microbiota / Z. Xiang, H Koo, Q. Chen, X. Zhou, Y. Liu, A. Simon-Soro // Journal of oral microbiology. – 2020. – Vol.13, 1853451. – doi.org/10.1080/20002297.2020.1853451.

14. S. Salminen The International Scientific Association of probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics / S. Salminen et al // Nat Rev Castroenterol Hepatol. – 2021. – Sep; 18 (9) : 649 – 667. – doi: 10.1038/s41575-021-00440-6.

15. Ch. Karen, Lactobacillus paracasei supplementation prevents early litl stress-induced anxiety and depressive-like behavior in maternal separation model-possible invarement of microbiota – gut – brain axis in differential regulation of microRNA 124a/132 and glutamate receptors / Ch. Karen, D. J. H. Shyu, K. E. Rajan // Front neurosci/ – 2021. – doi: 10.3389/fnins.2021.719933.

16. Y. Liu, Lactobaccillus plantarum CCFM8610 Alleviates irritable bowel syndrome and prevents gut microbiota dysbiosis : a randomized, double – blind, placebo-controlled, pilot clinical trial / Y. Liu et.al // Engineering. – 2021. – 7 : 376 – 385.

17. M. Murata, Effects of paraprobiotic lactobacillus paracasei MCC1849 suppelementation on symptoms of the common cold and mood states in healthy adults / M. Murata, J. Kondo, N. Iwabucti, S. Takahashi, K. Yamauchi, F. Ahe, K. Miura //Benef. Microbes. – 2018, Dec 7 : 9 (6) : 855 – 864. – doi: 10/3920/BM2017.0197.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ВЫЯВИЛ ВОЗМОЖНЫЕ СВОЙСТВА КОВАЛЕНТНОГО ИНГИБИТОРА ТРЕХ ФЕРМЕНТОВ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ВЕЩЕСТВА ИКСЕРИН Д ИЗ ОБЫЧНОГО ОДУВАНЧИКА

Старовойтова Виктория Александровна
Стажёр младшего научного сотрудника, лаборатории биохимии лекарственных препаратов НИИ ФХП, Белорусский государственный университет, Минск
vika.starovoytova.2000@mail.ru
Фалетров Ярослав Вячеславович
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск
yaroslav82@tut.by
Шкуматов Владимир Макарович
д.б.н., профессор, заведующий лаборатории биохимии лекарственных препаратов научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, Минск
E-mail: biopharm@bsu.by

Цель работы – провести высокопроизводительный виртуальный библтотек лигандов (~ 20 структур электрофильных веществ из растений) и белков из Mycobacterium tuberculosis (~ 2900 структур).

Методы: Программы Autodock Vina для расчета и FYTdock для организации процесса были использованы на всех стадиях процесса для расчетов и эффективного анализа результатов. Структуры низкомолекулярных соединений были выбраны с учетом вероятности из вхождения в состав представителей родной флоры.

Результаты: Иксерин D из обычного одуванчика (Taraxacum officinale) был выделен как потенциальный ковалентный ингибитор трех ферментов M. tuberculosis, а именно, липоил синтазы, инозин монофосфат дегидрогеназы, бета-кетоацил-ацилпереносящий белок синтазы III. Этот результат являет собой пример нахождения природного соединения с возможными противотуберкулезными свойствами, а также более общей идеи о том, что ковалентные ингибиторы могут стать новым классом противотуберкулезных лекарств, как это имеет место быть для противораковых.

Ключевые слова. *докинг; Autodock Vina; FYTdock; туберкулез; одуванчик*

HIGHTHROWPUT VIRTUAL SCREENING HAS REVEALED IXERIN D FROM COMMON DANDELION AS POTENTIAL COVALENT INHIBITOR OF TREE ENZYMES OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Staravoitava Viktoria Aleksandrovna
Trainee of junior researcher of Laboratory of Biochemistry of Medical Drugs, Research Institute for Physical-Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk
vika.starovoytova.2000@mail.ru
Faletrov Yaroslav Vycheslavovich
C.Ch.Sc., Docent, leading researcher of Laboratory of Biochemistry of Medical Drugs, Research Institute for Physical-Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk
yaroslav82@tut.by
Shkumatov Vladimir Makarovich
Dr.B.Sc., Head of the Laboratory of Biochemistry of Drugs of the Research Institute of Physical and Chemical Problems of the Belarusian State University, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
biopharm@bsu.by

The aim of the study – to proceed high-throughput cross-library virtual screening between ~ 20 electrophile phytochemicals and ~ 2900 structures of proteins from Mycobacterium tuberculosis.

Methods: Autodock Vina processing and FYTdock original helper software were used to run and analyze all the procedures effectively. Compounds' structures were chosen with respect to motherland flora.

Result: Ixerin D from common dandelion (Taraxacum officinale) has highlighted as potential covalent inhibitor of tree enzymes of M. tuberculosis, namely, Lipoyl synthase, inosine monophosphate dehydrogenase, Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. The result exemplifies a natural compound with possible anti-tubercular properties as well as an idea that covalent inhibitors might become a new class of anti-tubercular drugs, like it has become for anti-cancer medicines.

Keywords: *docking; Autodock Vina; FYTdock; tuberculosis; dandelion*

«Тихая» эпидемия туберкулеза на протяжении многих лет уносит ~1,5 миллионов человеческих смертей ежегодно согласно данным ВОЗ, главным образом, из-за резистентных к лекарствам штаммов. Поэтомупоиск новых антитуберкулезных препаратов не перестает быть актуальной научной задачей. Более того, такой поиск часто требует привлечения концептуально новых подходов. Примером такого подхода может быть разработка ковалентных ингибиторов. Отметим, что на сегодня, по нашим сведениям, нет одобренного к применению для лечения туберкулеза препарата, который является ковалетным иннгибитором, однако научные исследования в данном направлении начали появляться. Так, итаконат (соль 2-метилен-янтарной кислоты) в 2021 определен как ковалентный ингибитор изоцитрат лиазы 1Mycobacterium tuberculosis (Mtb), ковалентно присоединяющийся к цистеину 191 активного центра фермента и

критически влияющий на выживание клеток микобактерий [1]. Следовательно, поиск и разработка новых потенциальных ковалентных ингибиторов Mtb может помочь найти новые фармакологические решения для борьбы с туберкулезом. Начальные этапы этого процесса включают применение современных методов биохемоинформатики, в частности, молекулярного докинга, который и был использован в данном исследовании.

Материалы и методы исследования.

В работе использовали оригинальную программу-помошник FYTdock [2], который автоматизирует организацию, запуск расчетов при помощи программы Autodock Vina и анализ полученных результатов. Библиотека из ~20 структур веществ растительного происхождения была создана из базы данных Pubchem с учетом их произрастания на территории Республики Беларусь. Примерно 2900 белков из базы Protein Data Bank были выбраны для создания библиотеки белков. Для графической репрезентации результата использовали программу Biovia.

Результаты и обсуждение.

Финальная таблица результатов включала более 20000 комплексов белок-лиганд с рассчитанной энергией связывания (Ebind)от -7,6 до -13,1 ккал/моль. Иксерин Д (номер базы Pubchem CID101553163) демонстрировал ряд интеракций с высокой аффинностью и расположением его электрофильного фрагмента в пределах 0.4 нм от атома серы цистеина ряда белков (Таблица 1). Это соединение синтезируется в обычном одуванчике (Taraxacum officinale) и, вероятно, является малотоксичным для человека в связи с использованием частей эттого растения в пищу или как лекарства человеком и некоторыми животными.

Таблица 1 – Расчетные данные о белках микобактерий и спрогнозированных белок-лигандных с Иксерином Д, для которых показана колоколизация атома серы цистеинов этих макромолекул и электрофильной части лиганда

Код PDB	**Название белка**	**Цистеин**	**Ebind, ккал/моль**
5EXI	Липоил синтаза	CYS81	-10,7
4ZQR	Каталитический домен инозин монофосфот дегидрогеназы	CYS341	-9,4
1M1M	бета-кетоацил-ацилпереносящий белок синтаза III (бета-КААПБС)	CYS123	-9,2
2AJ9	бета-КААПБС	CYS122	-9,1
2AHB	бета-КААПБС	CYS122	-9,0

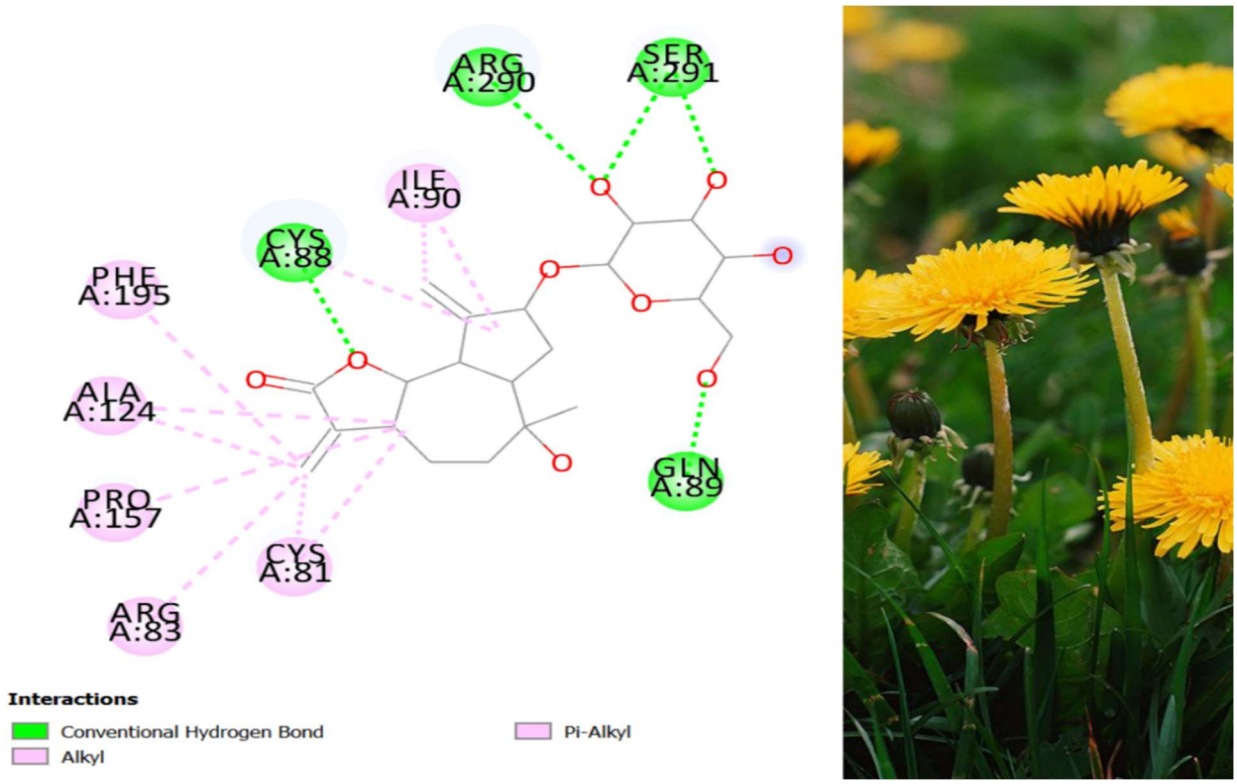


Рисунок 1 – Графическая репрезентация рассчитанного положения Иксерина Д из одуванчика в активном центре липоил синтазы и фотография растения, содержащего это вещество с потенциалом антитуберкулезного действия

Согласно расчетам, Иксерин Д способен формировать такие связи для Mtb, липоил синтазы, инозин монофосфат дегидрогеназы, бета-кетоацил-ацилпереносящий белок синтазы III. Последний фермент очень важен для биосинтеза жирных кислот, и он является очень важным для нормального жизненного цикла Mtb [3]. Такие расчетно-теоретические данные указывают на возможность благоприятного исхода биологического тестирования Иксерина Д, причем он может быть получен из природного источника, что не делает необходимостью разработку схемы его химического синтеза.

Заключение.

Иксерин D из обычного одуванчика (Taraxacum officinale) был выделен как потенциальный ковалентный ингибитор трех ферментов M. tuberculosis, а именно, липоил синтазы, инозин монофосфат дегидрогеназы, бета-кетоацил-ацилпереносящий белок синтазы III. Этот результат являет собой пример нахождения природного соединения с возможными противотуберкулезными свойствами, а также более общей идеи о том, что ковалентные ингибиторы могут стать новым классом противотуберкулезных лекарств.

Финансирование работы. Работа проведена при поддержке гранта ГПНИ № г.р. 20210560.

Список литературы.

1. B. X. C. Kwai, Itaconate is a covalent inhibitor of the Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyase / B. X. C. Kwai et al. // RSC Med. Chem. – 2020. – Vol. 12. – P. 57-61. Doi:10.1039/d0md00301h

2. Y. V. Faletrov Application of docking-based inverse high throughput virtual screening to found phytochemical covalent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease, NSP12 and NSP16 / Y. V. Faletrov, et al. // 21 March 2022. – PREPRINT (Version 1) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1456627/v1].

3. Sachdeva, S., Reynolds, K.A. Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (mtFabH) assay: principles and method // Methods Mol. Med. Doi:10.1007/978-1-59745-246-5_16

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЖЕЛЕЗИСТЫХ КЛЕТОК КОЖНОГО ЭПИТЕЛИЯ *SACCOGLOSSUS MERESCHKOWSKII* (ENTEROPNEUSTA, HEMICHORDATA)

Столярова Марина Владимировна
д.б.н., доцент, профессор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Минздрава России «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург
mvstolyarova@yandex.ru
Валькович Эрнест Иванович
д.м.н., профессор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Минздрава России «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург
asmcode@mail.ru

Целью работы является гистохимическое исследование железистых клеток кожного эпителия кишечнодышащих (Enteropneusta), относящихся к полухордовым (Hemichordata) и стоящим у корня ветви хордовых. Объект исследования - Saccoglossus mereschkowskii. Парафиновые срезы исследовали с помощью общегистологических, гистохимических методов и метода иммуноцитохимии. Кожный эпителий S. mereschkowskii по строению – однослойный ложномногорядный, содержит мерцательные и 4 вида железистых клеток: бокаловидные, слизистые, крупнозернистые, мелкозернистые. Новизна работы заключается в определении химических компонентов секрета разных клеток. Секрет бокаловидных клеток содержит основные и кислые белки, гликопротеины, липидный компонент. Слизистые клетки дают реакцию на гликозаминогликаны. Гранулы зернистых клеток содержат основные белки, гликопротеины; выявление FMRFамид-иммунореактивного материала указывает на их функцию как эндокриноподобных клеток.

Ключевые слова: *гистология; гистохимия; эпителии; эволюция.*

HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SECRETORY CELLS IN SKIN EPITHELIUM OF *SACCOGLOSSUS MERESCHKOWSKII* (ENTEROPNEUSTA, HEMICHORDATA)

Stolyarova Marina Vladimirovna,
Dr.B.Sc., professor of Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg
mvstolyarova@yandex.ru
Valkovich Ernest Ivanovich,
Dr.M.Sc., professor of Saint-Petersburg State Pediatric

Medical University, Saint-Petersburg
asmcode@mail.ru

The aim of the study is histochemical investigation of secretory cells in skin epithelium of Enteropneusta which belong to Hemichordata and are at the root of Chordata. The object of the study is Saccoglossus mereschkowskii. Paraffin sections were investigated using histological, histochemical and immunocytochemical methods. Skin epithelium of S. mereschkowskii is a simple epithelium with nuclei of cells lying on different levels. It contains ciliated cells and 4 types of glandular cells: goblet cells, mucous cells, granular cells with big and small granules. Novelty of the work is determination of chemical components of secretion of different cells. Secretion of goblet cells contains basic and acid proteins, glycoproteins, lipid component. Mucous cells produce glycosaminoglycans. Granular cells contain basic proteins, glycoproteins; the presence of FMRFamid-immunoreactive material indicates the function of these cells as endocrine-like.

Key words: *histology, histochemistry, epithelia, evolution.*

Актуальность. Кишечнодышащие (Enteropneusta) стоят у корня ветви хордовых, по данным молекулярной биологии [1] они наиболее близки к древним вторичноротым. Изучение тканей кишечнодышащих представляет значительный интерес для сравнительногистологических исследований.

Цель настоящей работы – изучение химического состава секрета железистых клеток кожного эпителия кишечнодышащих.

Материал и методы. Объектом исследования послужил представитель кишечнодышащих – *Saccoglossus mereschkowskii.* Животных фиксировали для световой микроскопии; использовались фиксаторы Буэна, Карнуа, формалин-спирт-уксусная кислота, ценкер-формол, «суза». По стандартной методике заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали для получения обзорных картин гематоксилином – эозином, железным гематоксилином, азуром – эозином, азаном по Гейденгайну и по методу Новелли [2]. Гистохимическими методами выявляли: суммарные белки – реакция тетразониевого сочетания по Берстону, метод с сулемой – бромфеноловым синим [3], ксантопротеиновая реакция; основные и кислые белки – метод Микель-Кальво [4]; слизь – окраска муцикармином; гликопротеины – метод ШИК; гликоген – ШИК-реакция, окраска кармином по Бесту; гликозаминогликаны – метод с альциановым синим; липиды – окраска суданом черным В по Лизону [5]. Методом пероксидазной иммуноцитохимии определяли локализацию нейропептида FMRFамида.

Результаты. Кожный эпителий *S. mereschkowskii* на большей части поверхности тела имеет значительную высоту: в области туловища – 50-100 мкм, в области хоботка – 200-300 мкм, а в области воротника – до 500 мкм. Ядра клеток располагаются на разных уровнях, распределяясь по всей высоте

эпителиального пласта, за исключением самой глубокой и самой поверхностной его зон [6, 7]. Эпителий по строению – однослойный ложномногорядный. Базально в эпителии располагается представленный фибриллярными структурами более или менее мощный нервный слой. Эпителий подстилает тонкая и не всегда хорошо заметная базальная мембрана.

В состав эпителия входят мерцательные клетки и железистые – бокаловидные, слизистые, крупнозернистые и мелкозернистые. *Мерцательные клетки* являются основным клеточным типом в эпителии. Они имеют расширенную апикальную часть и узкую, нитевидно вытянутую, базальную. Базальные отростки мерцательных клеток пересекают нервный слой и достигают базальной мембраны. В центральной части клеток располагается ядро. *Бокаловидные клетки* характеризуются шаровидно расширенной содержащей секрет апикальной частью, от которой, как иногда можно видеть, начинается нитевидный базальный отросток. Секреторные части бокаловидных клеток располагаются вблизи поверхности эпителия, в основании расширенной секреторной части клеток располагается ядро [8].

Секрет образует компактное скопление округлой или овальной формы диаметром до 5-9 мкм и длиной до 10 мкм. Секрет представлен гомогенным веществом, в котором часто наблюдаются светлые вакуоли, а также сильно преломляющие свет плотные включения различной величины. Секрет окрашивается эозином в розовый или, реже, красный цвет, но интенсивно воспринимает железный гематоксилин, причем при обеих окрасках степень окрашивания в разных клетках значительно варьирует. Азаном по Гейденгайну секрет окрашивается в разные оттенки синего и красно-коричневого цвета, а также может принимать смешанную красно-синюю окраску. Реактивом Шиффа секрет окрашивается в розовый цвет также с разной степенью интенсивности, но иногда совсем не окрашивается. Секреторные части бокаловидных клеток дают резко положительную реакцию на общие белки и содержат как основные белки, так и кислые. Секрет диффузно прокрашивается суданом черным В и иногда довольно интенсивно, что указывает на присутствие липидного компонента. Секрет бокаловидных клеток выделяется целиком, но в некоторых клетках над основной секреторной вакуолью видны более мелкие его капли, что свидетельствует и о возможности выделения секрета по частям [8].

Слизистые клетки широко представлены в эпителии. Они обычно имеют колбовидную или бутылковидную форму, но могут быть также сужены и малозаметны. Слизистые клетки достигают нервного слоя. В базальной части клеток располагается ядро. Клетки заполнены слабо базофильным пенистым секретом, обнаруживающим положительную реакцию на гликозаминогликаны. Цитоплазма клеток имеет вид сеточки, с перекладинами которой часто связаны мелкие гранулы, возможно, относящиеся к секрету [8].

Крупнозернистые и *мелкозернистые клетки* характеризуются

узкопризматической формой. Они прослеживаются от поверхности эпителия до нервного слоя; очевидно, зернистые клетки связаны с базальной мембраной крайне тонкими отростками. Цитоплазму зернистых клеток равномерно заполняют округлые гранулы, диаметр которых у крупнозернистых клеток составляет около 1 мкм. При окраске гематоксилином – эозином гранулы крупнозернистых клеток окрашиваются слабо оксифильно, мелкозернистых – несколько ярче. Секрет крупно- и мелкозернистых клеток интенсивно окрашивается железным гематоксилином и дает ярко выраженную реакцию на белки, представленные, преимущественно, основными белками. Гранулы крупнозернистых клеток окрашиваются реактивом Шиффа в розовый цвет, секрет мелкозернистых клеток – ярко-розовый. Ядра крупно- и мелкозернистых клеток в эпителии располагаются недалеко от нервного слоя [8].

С помощью иммунопероксидазного метода была показана локализация FMRFамид-иммунореактивного материала в цитоплазме узких клеток открытого типа (достигающих поверхности), и в отростках этих клеток, уходящих в нервный слой [8, 9]. Эти клетки по форме и расположению соответствуют зернистым клеткам. Также FMRFамид-иммунореактивность проявляют нервные клетки, расположенные на уровне нервного слоя в основании эпителия.

Обсуждение. Полученные данные позволяют рассмотреть вопрос о функциональном значении разных видов железистых клеток кожного эпителия кишечнодышащих. Слизистые клетки – наиболее универсальный и древний вид железистых клеток, они присутствуют в кожном покрове многих морских беспозвоночных. Слизь необходима для создания защитного слоя на поверхности эпителия, способствует скольжению. Бокаловидные клетки содержат богатый белками секрет. Считают, что эти клетки продуцируют некоторые ферменты и, возможно, йодоформ [10]. Предполагается, что бокаловидные клетки – это фотогенные элементы, вырабатывающие люминесцирующую слизь [11]. Зернистые клетки содержат гранулы как в апикальной, так и в базальной части, что характеризует их как клетки со смешанной секрецией - экзокринно-эндокриноподобные. Крупнозернистые клетки рассматриваются как типичные зимогенные клетки [12], выделяющие ряд ферментов [13] на поверхность эпителия. По данным электронной микроскопии, гранулы крупнозернистых клеток выделяются и в сторону базальной мембраны, а базальные отростки мелкозернистых клеток входят в состав нервного слоя [8, 9]. Это дает основания рассматривать зернистые клетки как эндокриноподобные, а мелкозернистые клетки и как рецепторные. Такое заключение подтверждается данными о локализации нейротрансмиттера FMRFамида в зернистых клетках, а также в нервных клетках нервного слоя. Мелкозернистые клетки некоторые авторы рассматривают как рецепторные [14]. Таким образом, мелкозернистые клетки можно характеризовать как рецепторно-эндокриноподобные. Все приведенные данные свидетельствуют о том, что разные виды железистых

клеток кожного эпителия кишечнодышащих выполняют ряд важных функций: выработка слизи, ферментов, участие в рецепции и регуляции. Вместе с мерцательными клетками и элементами нервного слоя они участвуют в образовании рецепторно - регуляторного тканевого комплекса.

Список литературы

1. L.D. Bromham, B.M. Degnan, Hemichordates and deuterostome evolution: robust molecular phylogenetic support for a hemichordate + echinoderm clade // Evol. Dev.- 1999.- V. 1.- N 3.- P. 166-171.

2. A. Novelli, La comportement fonctionnel des cellules dans les tissus démontré par une nouvelle méthode de coloration // Bull. Micr. Appliquee, 1954. Ser. 2, T. 4, N 7-8. P. 89-94.

3. Э. Пирс, Гистохимия [пер. с англ.]. М.: Изд. иностр. лит., 1962. 962 с.

4. А.И. Кононский, Гистохимия. Киев: Вища школа, 1976. 280 с.

5. Б. Ромейс, Микроскопическая техника. [Пер. с нем.] М.: Изд. иностр. лит., 1953. 718 с.

6. М.В. Атаманова, Кожный и кишечный эпителии кишечнодышащих как этап филогенетического развития эпителиев хордовых // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.- 1977.- Т. 73.- Вып. 9. - С. 55-61.

7. М.В. Атаманова, Морфо-функциональные особенности кожного покрова и центральной паренхимы бескишечных турбеллярий, кожного и кишечного эпителиев немертин и кишечнодышащих: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Л., 1980. 20 с.

8. М.В. Столярова, Сравнительная морфолого-физиологическая характеристика и реактивные особенности эпителиальных систем у животных разных уровней организации и человека: филогенетический аспект // Автореф. дис. д-ра биол. наук.- СПб, 2012.

9. М.В. Столярова, Э.И. Валькович, Регуляторные элементы кожного эпителия у *Saccoglossus mereschkowskii* – Enteropneusta, Hemichordata: электронномикроскопическое и иммуноцитохимическое исследование // Морфология.- 2013.- Т. 144.- № 6.- С. 26-31.

10. J. Benito, F. Pardos, Hemichordata // Microscopic Anatomy of Invertebrates. New-York: Wiley-Liss, 1997. V. 15. P. 15-101.

11. U. Dahlgren, Production of light by Enteropneusta // J. Franklin Inst., 1917. V. 183, pt. 5. P. 593-624.

12. J. Benito, Estudio histoqu'mico de la epidermis de *Glossobalanus minutus* (Kowalewsky). (Ptychoderidae, Enteropneusta, Hemichordata) // Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.), 1975b. V. 73. P. 229-235.

13. L.T. Welsch, U. Welsch, Histologische und Elektronen Mikroscopische Untersuchungen an der praoralen wimpergrube von *Saccoglossus horsti* (Hemichordata) und der hatschekschen grube von *Branchiostoma lanceolatum* (Acrania). Ein beitrag zur Phylogenetischen entwicklung der adenohypophyse // Zool. Jb. Anat, 1978. Bd. 100. S. 564-578.

14. U. Welsch Hemichordata // Biology of the integument [J. Bereiter-Hahn, A.G. Maltotsy and K.S. Richards (eds.)]. V. I. Invertebrates.- Berlin: Springer, 1984.- P. 790-799.

НОВЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СТЕРОИД 17-((NBD)-МЕТИЛАМИНО)-АНДРОСТ-5-ЕН-3β-ОЛ: СИНТЕЗ И IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО СВОЙСТВ КАК МОЛЕКУЛЯРНОГО ЗОНДА ДЛЯ БЕЛКОВ

Столярчук Анна Петровна
Студентка 2 курса химического факультета Белорусского государственного университета, специальность научно-производственная деятельность, Минск
stoliarchuk.anna@outlook.com
Фалетров Ярослав Вячеславович
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск
yaroslav82@tut.by
Шкуматов Владимир Макарович
д.б.н., профессор, заведующий лаборатории биохимии лекарственных препаратов научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, Минск
biopharm@bsu.by

Цель исследования – синтезировать новый флуоресцирующий стерол на основе дегидроэпиандростерона путем реакций восстановительного аминирования и нуклеофильного ароматического замещения хлора в 7-нитробензоксадиазол-хлориде полученным амином. Методы: органический синтез, доконг. Вещество было получено. Молекулярный докинг показал возможность аффинного связывания этого соединения (DAMNBD) с белками RORγt и LXR, STARD1 и CYP11A1. Полученное соединение перспективно к разработке как молекулярный инструмент для этих белков для использования в целях диагностики ряда заболеваний, в т.ч. раковых.

Ключевые слова. *7-Нитробензоксадиазол-хлорид; молекулярный докинг; флуоресцентный зонд; холестерол; оксистеролы*

A NEW FLUORESCENT STEROID 17-((NBD)-METHYLAMINO)-ANDROST-5-EN-3β-OL: SYNTHESIS AND IN SILICO INVESTIGATION OF ITS PROPERTIES AS A MOLECULAR PROBE FOR PROTEINS

Stolyarchuk Anna Petrovna.
2nd year student of the Faculty of Chemistry of the Belarusian State University, specialty research and production activities, Minsk
stoliarchuk.anna@outlook.com
Faletrov Yaroslav Vycheslavovich,
C.Ch.Sc., Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Biochemistry of Medicinal Products, Research Institute of Physical and Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk

yaroslav82@tut.by
Shkumatov Vladimir Makarovich
Dr.B.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of Drugs of the Research Institute of Physical and Chemical Problems of the Belarusian State University, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
biopharm@bsu.by

The aim of the study – to synthesize of new fluorescent sterol-like molecule based on DHEA using chemical steps of reductive amination and nucleophilic aromatic substitution of chlorine of 7-nitrobenzoxadiadole-chloride by the amine. Methods: organic synthesis, docking. Molecular docking has revealed possibility of affine binding of the compound (DAMNBD) with proteins RORyt, LXR, STARD1 and CYP11A1. The compound has a perspective to be developed as a molecular tool for the proteins aiming its usage for diagnostics of diseases, including cancer.

Keywords. *7-Nitrobenzoxadiazole chloride; molecular docking; fluorescent probe; cholesterol; oxysterols*

Стеролы являются активными участниками и регуляторами различных биопроцессов, в том числе связанных с развитием различных заболеваний. Например, болезнь Альцгеймера (БА) взаимосвязана с гомеостазом и высоким уровнем холестерина в сыворотке крови [1]. Несколько исследований показали взаимосвязь между профилем продуктов окисления холестерина (оксистеролов) и развитием болезни Паркинсона [2]. Окисленные формы холестерина, оксистеролы, могут быть использованы также в качестве маркеров для диагностики или прогноза риска развития сахарного диабета, рассеянного склероза, остеопороза, рака легких, рака молочной железы и бесплодия [3]. Недавно установлена способность рецептора RORgammat связывать холестерин и оксистеролы и возможность использовать его ингибиторы для 1) подавления T(H)17лимфоцитов при артрите и воспалительных заболеваних кишечника и как потенциальные средства для терапии трижды негативного рака молочной железы [4]. Для целей исследования процессов, связанных со стеролами, используют их флуоресцентные аналоги (смотрите, например, работу [5]).

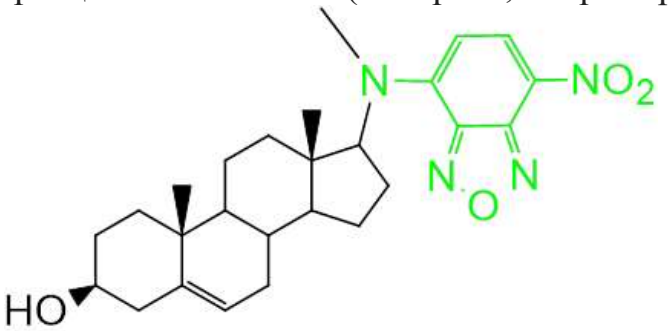


Рисунок 1 – Структурная формула DAMNBD (флуоресцентная группа выделена зелёным цветом)

На сегодня известен ряд белков, осуществляющих процессы транспорта, метаболизма и рецепции стеролов, среди них ядерные рецепторы RORyt и LXR, а также митохондриальные белки STARD1 (осуществляет транспорт холестерина в митохондрии) и CYP11A1 (осуществляет первую стадию биосинтеза стероидных гормонов) [6]. Целью этого исследования была разработка нового меченого стеролоподобного соединения с 7-нитробензокса-1,3-диазол-4-ил (NBD-амино) флуоресцентной группой, а именно 17-((NBD)-метил-амино)-андрост-5-ен-3β-ол (DAMNBD) (рисунок 1) и in silico исследование его свойств как молекулярного зонда для этих белков**.**

Материалы и методы исследования.

Тонкослойная хроматография проводилась на пластинках с закреплённым слоем силикагеля. В качестве элюента для тонкослойной хроматографии использовали хлороформ. Так как полученное вещество обладает флуоресцентными свойствами, для проявления данного изображения использовали ультрафиолетовый свет с длиной волны 365 нм.

В результате синтеза было получена смесь веществ, содержащая необходимое нам вещество и некоторые побочные продукты. Для разделения данной смеси и очистки необходимого нам вещества был использован метод колоночной хроматографии, в качестве элюента использовали хлороформ. Чистоту полученного вещества проверили методом тонкослойной хроматографии, результаты которой приведены на рисунке 2. Для моделирования взаимодействия белок-лиганд использовалась компьютерная программа Autodock 4.0. Структуры белков были взяты из базы данных PDB.

Результаты и их обсуждение.

DAMNBD был получен из 3-бета-гидрокси-5-енового стероида дегидроэпиандростерона (DHEA), обладающего кетогруппой при С17 – предшественника андрогенов и эстрогенов. Флуорофор представлен NBD-группой. Схема синтеза, включающая 2 стадии, приведена на схеме ниже (рисунок 2).

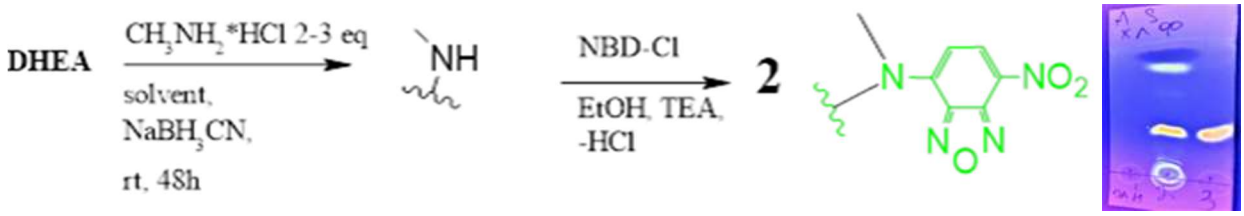


Рисунок 2 – Схема синтеза DAMNBD и результат тонкослойной хроматографии DAMNBD (**2**) (Rf = 0,33); EtOH – этанол, TEA – триэтиламин. Точке 1 соответствует вещество с кодовым названием DAM, продукт первой реакции в схеме синтеза DAMNBD, точке 2 соответствует неочищенный DAMNBD, точке 3 DAMNBD, не содержащий примесей.

Вторым этапом нашего исследования была оценка потенциала полученного флуоресцентного соединения в качестве лиганда для различных белков, оперирующих с холестерином или его производными, а именно с 20-гидроксихолестерином (20-HO-CHOL), его аналогом 26,27-dinorcholest-5-en-24-yne3β,20-diol (Nat 20S-yne) и 22-NBD-холестерином (22-NBD-CHOL). В настоящее время известно очень много холестерин- и оксистерол-управляющих белков различных классов (транспортеров, ферментов, рецепторов), для многих из них решены 3D-структуры. Для нашего исследования мы выбрали 4 белка из начальной стадии стероидогенеза (биосинтеза стероидных гормонов), а именно ядерные рецепторы RORγt и LXR, а также митохондриальные белки STARD1 и CYP11A1. Результаты докинга сведены в таблицу 1.

Таблица 1. Результаты докинга.

	DAM-NBD	CHOL	20-HO-CHOL	Nat 20S-yne	22-NBD-CHOL
STARD1 (3P0L)	-11,7 / Arg182	-10,1 / Arg182	-9,5 / Ala172	-10,3 / Arg182	-12,4 / Arg182
CYP11A1 (3MZS)	-13,4 / Thr354	-12,4 / Thr354	-11,8 / Thr354	-11,4 / Thr354	-14,0 / Thr354
LXR β (1p8d)	-14,8 / Asn239	-11,8 / Asn239	-11,7 / Asn239	-11,1 / Asn239	-13,2 / Asn239
ROR γt (3L0L)	-12,6 / Gln286	-10,8 / Gln286	-11,5 / Gln286	-10,4 / Gln286	-12,2 / Gln286
LXR α (3ips)	-13,8 / Glu267	-11,7 / Glu267	-11,5 / Glu267	-10,7 / Glu267	-13,1 / Glu267

В целом все соединения демонстрируют аффинное связывание в активных центрах выбранных белков, как и их известные лиганды. Диапазоны связывания от -10 до -14 ккал/моль (теоретическая константа диссоциации 30 нМ и ниже), т.е. с хорошим сродством.

Заключение. Был получен новый флуоресцентный стероид. При помощи докинга показана возможность его эффективного связывания с четырьмя стерол-связывающими белками. Экспериментальная оценка выявленных in silico биологических взаимодействий в будущем может быть использована в качестве для исследования механизма различных физиологических и патологических процессов, связанных с белками RORγt, LXR, STARD1 и CYP11A1, для целей разработки новых методов лечения ряда заболеваний.

Финансирование работы. Работа проведена при поддержке гранта ГПНИ № г.р. 20210560 (Я.В.Фалетров, В.М. Шкуматов).

Список литературы

1.R.Valencia, Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment / R. Valencia, et al. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2019. – V. 190. – P. 104-114. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.03.003.

2. M. Doria, Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease / M. Doria, et al. // Free Radic Biol Med. – 2016. - V. 101. – P. 393-400. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.008.

3. A. Samadi, A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases / A.Samadi, et al. // Curr Med Chem. - 2021. – V. 28. – P. 110-136. DOI:10.2174/0929867327666200316142659.

4. D. Cai, RORγ is a targetable master regulator of cholesterol biosynthesis in a cancer subtype / D. Cai et al. // Nature Commun. – 2019. – Vol. 10. – P. 4621 DOI:10.1038/s41467-019-12529-3

5. Y. V Faletrov, New 20-hydroxycholesterol-like compounds with fluorescent NBD or alkyne labels: Synthesis, in silico interactions with proteins and uptake by yeast cells / Y. V Faletrov, et al // Chem Phys Lipids. – 2020. – V. 227. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104850

6. C. Traversari, LXR-dependent and -independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth. / C. Traversari, et al // Eur J. Immunol. - 2014. – V. 44. – P. 7. DOI:10.1002/eji.201344292

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПСИХОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Сяхович Виталий Эдуардович
заведующий научно-исследовательской лабораторией УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», Лесной
rlab.head@antidoping.by
Походня Екатерина Николаевна
научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории УЗ «национальная антидопинговая лаборатория», Лесной
rlab@antidoping.by
Голубева Татьяна Сергеевна
к.б.н., заведующий отделом наркологии ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», Минск
tatyana.gol2011@yandex.by
Докукина Татьяна Васильевна
д.м.н., доцент, заместитель директора по научной работе ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», Минск
polak0208@mail.ru
Ходжаев Александр Валерьевич
к.м.н., доцент, директор ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», Минск
a-hodzhaev@rambler.ru
Походня Юрий Георгиевич
к.б.н., директор УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», Лесной
director@antidoping.by

В данной работе продемонстрировано использование масс-спектрометрии высокого разрешения для разработки методики определения психотропных лекарственных средств в плазме крови с целью терапевтического лекарственного мониторинга. Важной особенностью данного инструментального подхода является возможность получения полных данных о составе биологического образца, а также последующего их использования для выявления содержания новых соединений и их метаболитов

Разработана методика одновременного определения кветиапина, клозапина, оланзапина и рисперидона в образцах плазмы крови человека, включающая предварительную подготовку образцов с использованием метода разведения-ввода и инструментальный анализ ВЭЖХ-МС высокого разрешения. Проведена оценка параметров методики с целью подтверждения ее работоспособности.

Ключевые слова: *жидкостная хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения, кветиапин, клозапин, оланзапин, рисперидон, плазма крови.*

HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY IN THE DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING THE CONTENT OF PSYCHOTROPIC DRUGS IN HUMAN BLOOD PLASMA

Syakhovich Vitaly Eduardovich
Head of Research Laboratory of Health Institution «National Anti-Doping Laborator», Lesnoy
rlab.head@antidoping.by
Pakhadnia Katsiaryna Nikolaevna
Researcher of Research Laboratory of Health Institution «National Anti-Doping Laboratory», Lesnoy
rlab@antidoping.by
Golubeva Tatiana Sergeevna
C.B.Sc., Head of the Department of Narcology of State Institution «Republican scientific and practical center for mental health», Minsk
tatyana.gol2011@yandex.by
Dokukina Tatiana Vasilievna
Dr.M.Sc., Associate Professor, Deputy Director for Research of State Institution «Republican Scientific and Practical Center for Mental Health», Minsk
polak0208@mail.ru
Khodzhaev Alexander Valerievich
C.B.Sc., Associate Professor, Director of State Institution «Republican Scientific and Practical Center for Mental Health», Minsk
a-hodzhaev@rambler.ru
Pakhadnia Yury Georgievich
C.B.Sc., Director of Health Institution «National Anti-Doping Laboratory», Lesnoy
director@antidoping.by

This paper demonstrates the use of high-resolution mass spectrometry to develop a technique for the determination of psychotropic drugs in blood plasma for the purposes of therapeutic drug monitoring. An important feature of this instrumental approach is the possibility of obtaining the most complete data on the composition of a biological sample, as well as their subsequent use to identify the content of new compounds and their metabolites.

A method has been developed for the simultaneous determination of quetiapine, clozapine, olanzapine, and risperidone in human plasma samples, including preliminary sample preparation using the "dilute-and-shoot" method and high-resolution HPLC-MS instrumental analysis. The parameters of the technique were evaluated to confirm its performance.

Keywords: *high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry, quetiapine, clozapine, olanzapine, risperidone, blood plasma.*

Введение. В настоящее время широко обсуждается целесообразность использования масс-спектрометрии высокого разрешения в рутинном аналитическом процессе в таких областях как лабораторная диагностика, токсикология, ветеринария, антидопинговый анализ и других [1]. Исторически данный раздел масс-спектрометрии используется для научных и поисковых исследований. В рутинном аналитическом процессе лидируют масс-детекторы типа «тройной квадруполь», обеспечивая высокоселективный и высокочувствительный таргетный анализ целевых соединений [2]. Однако, с появлением масс-спектрометров высокого разрешения нового поколения, например, с детектором типа «орбитальная ловушка», а также значительным «упрощением» и удешевлением данного оборудования с целью приближения к широкому конечному пользователю, все большее число аналитических лабораторий рассматривает его как серьезную альтернативу.

Ключевой особенностью данного инструментального подхода является возможность использования режима полного сканирования и на его основе получения максимальной информации о составе биологического образца. Также существенной является возможность последующего анализа исходных данных с целью выявления содержания других (новых) соединений и их метаболитов [3].

Цель работы: разработка методики определения содержания психотропных лекарственных средств: кветиапина, клозапина, оланзапина и рисперидона в плазме крови, основанного на использовании жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии высокого разрешения.

Материалы и методы. Забор крови проводился в стерильные вакуумные пробирки с антикоагулянтом K_2ЭДТА. Для получения плазмы образцы крови центрифугировали в течение 10 минут при 1100 g при комнатной температуре. Плазму хранили при минус 20 ± 5 °С (до 2х недель) или при минус 75 ± 5 °С (долгосрочное хранение).

При приготовлении холостых образцов, калибровочных образцов и контрольных образцов использовали плазму крови добровольцев, заведомо не содержащую анализируемый компонент. Калибровочные образцы готовили путем внесения анализируемых веществ в холостую плазму крови до конечной концентрации целевых соединений 2 нг/мл – 1000 нг/мл (кветиапин и клозапин) и 2 нг/мл – 500 нг/мл (рисперидон и оланзапин). В качестве внутреннего стандарта в разработанной методике был использован цетиризин-D8. Осаждение белков плазмы проводили добавлением смеси ацетонитрил/вода в соотношении 80/20 по объему с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 15 000 об/мин и температуре 4 °С. Супернатант разбавляли в 10 раз элюентом для хроматографии и использовали для проведения инструментального анализа.

Хромато-масс-спектрометрический анализ образцов проводили на жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000 с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения типа квадруполь – орбитальная ловушка Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) с использованием хроматографической колонки Hypersil Gold C18, 50 мм × 2,1 мм, размер частиц 3 мкм (Thermo Scientific). Хроматографическое разделение целевых соединений проводили с использованием градиента ацетонитрила (5 % – 95 %), содержащего 0,1 % муравьиную кислоту при скорости потока 0,25 мл/мин.

Ионизацию образца проводили электрораспылением с использованием источника HESI II (положительный режим ионизации). Масс-детектирование проводили в режиме полного сканирования (Full scan) в диапазоне 100-500 m/z с разрешением 70 000 FWHM и точностью ±5 ppm.

Результаты и обсуждение. Для разработки методики определения кветиапина, рисперидона, клозапина и оланзапина в образцах плазмы крови были подобраны условия хромато-масс-спектрометрического детектирования данных целевых соединений. Были апробированы одномерная МС-детекция, а также варианты тандемной масс-спектрометрии. Было установлено, что одномерная МС-детекция в сочетании с высоким разрешением дает необходимую специфичность определения целевых соединений, обеспечивая их высокую селективность как относительно друг друга, так и элементов матрицы. Детектирование целевых соединений проводили путем их экстракции по характеристическим ионам: кветиапина (m/z 384,17402), клозапина (m/z 327,13710), оланзапина (m/z 313,14814) и рисперидона (m/z 411,21908), Цетиризина-D8 (m/z 397,21286) с точностью точностью ±5 ppm.

На рисунке 1 представлены хроматограммы стандартных растворов кветиапина, рисперидона, клозапина, оланзапина и внутреннего стандарта в концентрациях 10 нг/мл.

Проведена разработка подходов подготовки образцов к инструментальному анализу. С целью ускорения анализа был использован метод разведения-ввода с предварительным осаждением белков смесью ацетонитрил/вода 80/20 по объему.

Для построения калибровочных кривых использовался рабочий диапазон концентраций для кветиапина и клозапина от 2 нг/мл до 1000 нг/мл (8 точек), для рисперидона и оланзапина от 2 нг/мл до 500 нг/мл (6 точек). Дополнительно, для контроля качества анализа, в анализируемую серию вводили три уровня положительного контроля в двух воспроизведениях (10 нг/мл, 100 нг/мл и 400 нг/мл).

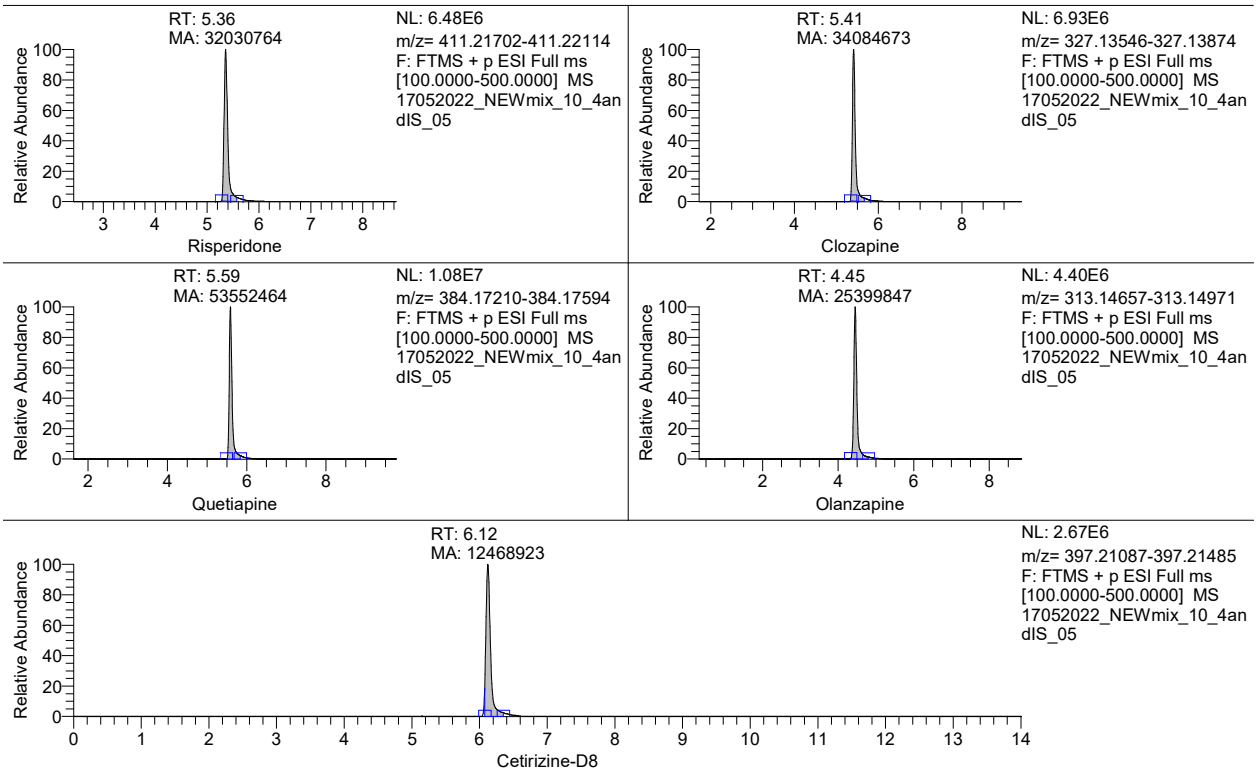


Рисунок 1 – Хроматограммы стандартных растворов анализируемых соединений и внутреннего стандарта (10 нг/мл)

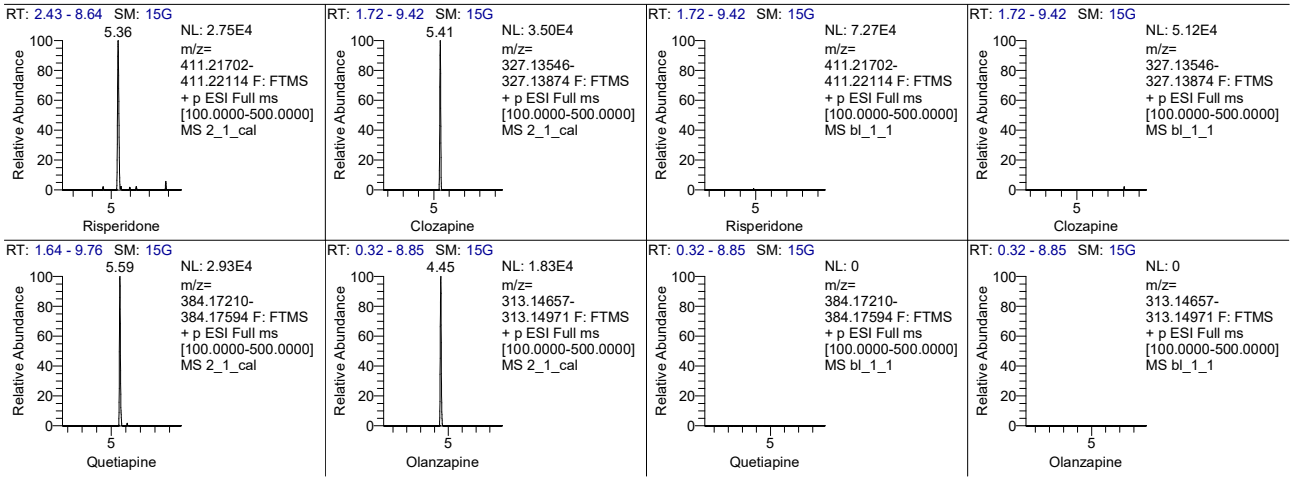


Рисунок 2 – Хроматограммы образцов НПКО (2 нг/мл) и холостого образца с экстракцией по ионам кветиапина, клозапина, оланзапина и рисперидона

Была проведена оценка параметров разработанной методики с целью подтверждения ее работоспособности: проведено установление следующих аналитических характеристик метода – избирательность (специфичность), рабочий диапазон, линейность, предел количественного определения, предел обнаружения, правильность, робастность. На рисунке 2 показаны результаты

исследования на специфичность методики, демонстрирующие особенности детекции соединений с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения с точностью экстракции целевых ионов ±5 ppm – для трех соединений из четырех на протяжении всего анализа холостого образца, а также до и после выхода целевого соединения при анализе образцов нижнего предела количественного обнаружения (НПКО) полностью отсутствуют ионы «шума».

Заключение. В ходе выполнения настоящей работы разработана методика одновременного определения психотропных лекарственных средств кветиапина, клозапина, оланзапина и рисперидона в образцах плазмы крови человека, включающая предварительную подготовку образцов с использованием метода разведения-ввода и инструментальный анализ ВЭЖХ-МС высокого разрешения. Проведена оценка параметров методики с целью подтверждения ее работоспособности.

Список литературы

1. Мирошниченко И.И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств / И.И. Мирошниченко // М.: Медицинское информационное агентство. – 2011. – 416 с.

2. Н.В. Баймеева, Роль биомаркеров в диагностике и терапии депрессии / Баймеева Н.В., Платова А.И., Сафарова Т.П., Яковлева О.Б., Шешенини В.С., Шипилова Е.С., Корнилов В.В., Мирошниченко И.И. // Сборник материалов XIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство» Тезисы докладов. – 2017. – 120 с.

3. M.Z. Bocato, Solid phase microextraction and LC-MS/MS for the determination of paliperidone after stereoselective fungal biotransformation of risperidone / M.Z. Bocato, R.A. Simões, L.A. Calixto, C.M. Gaitani, M.T. Pupo, A.R. Oliveira // Anal Chim Acta. –2012. – Vol.80. – P.742–753.

ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ GABAЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

Хожай Людмила Ивановна
д.б.н., главный научный сотрудник, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, доцент, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация
astarta0505@mail.ru

Целью работы было изучение численности популяции тормозных нейронов в неокортексе крыс ювенильного и препубертатного возраста после воздействия перинатальной гипоксии и оценка нейропротективных свойств фенибута, препарата производного GABA.

Работа выполнена на крысах линии Wistar, на модели недоношенной беременности человека и модели энцефалопатии новорожденных. Воздействие гипоксии осуществляли на 2 постнатальные сутки в течение 1 часа, в специальной камере с содержанием кислорода в дыхательной смеси 8%. Было использовано 3 группы животных: (1) контрольные животные; (2) крысы, подвергавшиеся гипоксии и (3) животные подвергавшиеся гипоксии и получавшие фенибут. Изучали соматосенсорную область неокортекса на 20 и 40 постнатальные сутки (П20, П40). GABAергические нейроны выявляли, используя первичные кроличьи поликлональные антитела к глутаматдекарбоксилазе (GAD-67).

Показано, что у крыс в контроле популяция GABAергических нейронов к ювенильному возрасту (П20) достигает определенной численности и сохраняется до препубертатного возраста (П40). Воздействие острой перинатальной гипоксии приводит к утрате значительной части тормозных нейронов у животных обеих возрастных групп. Применение фенибута сразу после воздействия гипоксии нивелирует ее повреждающие эффекты в отношении тормозных интернейронов.

Ключевые слова: *GABAергические нейроны, перинатальная гипоксия, неокортекс, фенибут.*

CHANGES IN THE NUMBER OF GABAERGIC NEURONS IN THE NEOCORTEX OF RATS AFTER PERINATAL HYPOXIA AND THE POSSIBILITY Of ITS PHARMACOLOGICAL CORRECTION

Khozhai Lyudmila Ivanovna
Dr.B.Sc, chief researcher I.P. Pavlov Institute of Physiology RAS, associate professor of the department of histology, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia
astarta0505@mail.ru

The aim of this work was to study the population size of inhibitory neurons in the neocortex of juvenile and prepubertal rats after exposure to perinatal hypoxia and to evaluate the neuroprotective properties of phenibut, a GABA derivative preparation. The work was performed on Wistar rats, on a model of human premature pregnancy and a model of neonatal encephalopathy. The impact of hypoxia was carried out on the 2nd postnatal day for 1 hour, in a special chamber with an oxygen content in the respiratory mixture of 8%. 3 groups of animals were used: (1) control animals; (2) hypoxic rats; and (3) hypoxic animals treated with phenibut. The somatosensory area of the neocortex was studied on the 20th and 40th postnatal days (P20, P40). GABAergic neurons were detected using primary rabbit polyclonal antibodies to glutamate decarboxylase (GAD-67). It was shown that in control rats the population of GABAergic neurons reaches a certain number by juvenile age (P20) and persists until prepubertal age (P40). Exposure to acute perinatal hypoxia leads to the loss of a significant part of inhibitory neurons in animals of both age groups. The use of phenibut immediately after exposure to hypoxia eliminates its damaging effects on inhibitory interneurons.

Keywords: *GABAergic neurons, perinatal hypoxia, neocortex, phenibut.*

Гипоксия в ранний неонатальный период является одной из основных причин возникновения патологии головного мозга, определяемой клиницистами как гипоксически-ишемическая энцефалопатия или перинатальная энцефалопатия (ПЭП), включающая в себя большую группу поражений головного мозга, возникающих как во время беременности и родов, так и в неонатальный период. ПЭП является собирательным диагнозом, подразумевающим структурные и функциональные нарушения в различных формациях головного мозга. Клиническая картина перинатальной энцефалопатии чрезвычайно пестрая и проявляется в детском возрасте по-разному - это задержка психического развития, расстройство памяти, внимания, и в 40% случаев может приводить к детскому церебральному параличу, симптоматической эпилепсии, нарушения в когнитивной и эмоциональной сферах [1,2]. Особенно остро неблагоприятное воздействие гипоксии-ишемии может проявляться у недоношенных детей, органы и системы которых к моменту рождения не достигли определенной структурной и функциональной зрелости. Известно, что одной их мишеней воздействия гипоксии является GABAергическая тормозная система, нарушения функций которой приводят к развитию ряда неврологическихнарушений: идеопатической и ювенильной миоклонической эпилепсии, фибриллярным судорогам и психоэмоциональным расстройствам. Выявлено, что некоторые препараты, производные GABA, в условиях ишемии могут оказывать антигипоксическое действие, подавлять процессы окисления и активировать ферменты антиоксидантной защиты. Одним из таких препаратов является фенибут (бета-фенил гамма-аминомасляной

кислоты гидрохлорид), зарегистрирован в реестре лекарственных средств РФ как транквилизатор. Он широко применяется как психотоническое средство без стимулирующего эффекта. В клинике фенибут используют для коррекции психоневрологических патологий в детском возрасте [1,3]. Показано, что фенибут обладает антистрессорным, антиоксидантным и антигипоксическим действием.

Целью работы было изучение общей численности GABAергических нейронов в неокортексе крыс ювенильного и препубертатного возраста после воздействия перинатальной гипоксии и оценка нейропротективных свойств фенибута.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на крысах линии Wistar, на модели недоношенной беременности человека и модели одной из форм энцефалопатии новорожденных. Воздействие гипоксии осуществляли на 2 постнатальные сутки (П2) в течение 1 часа, в специальной камере с содержанием кислорода в дыхательной смеси 8%. Было использовано 3 группы животных: (1) контрольные животные (*n*-8); (2) крысы, подвергавшиеся гипоксии (*n*-8) и (3) животные подвергавшиеся гипоксии (*n*-8) и получавшие фенибут в терапевтической дозе 15 мг/кг сразу после воздействия гипоксии. Изучали соматосенсорную область неокортекса на 20 и 40 постнатальные сутки (П20, П40) (ювенильный и препубертатный периоды).

Для выявления GABAергических нейронов использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к глутаматдекарбоксилазе (GAD-67) (Spring Bioscience, США); в качестве вторичных антител для GAD-67 использовали реактивы из набора EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Визуализацию продукта иммунной реакции осуществляли при помощи хромогена DAB+(3,3′-диамино-бензидин) (Dako, Дания). Количественный анализ проводили на цифровых изображениях серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия). Статистически обработанные данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ($m \pm$ SEM). Для анализа и сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway* ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc., USA), различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Результаты исследования. Результаты исследования показали, что у контрольных животных ювенильного (П20) и препубертатного (П40) возраста иммунопозитивные на GAD-67нейроны в значительном количестве присутствуют во всех слоях неокортекса, распределяются диффузно и примерно равномерно (табл. 1). У животных, перенесших перинатальную гипоксию, общее число иммунопозитивных на GAD-67 нейронов было значительно меньше как на П20, так и на П40 (на 22% и 39,5% соответственно) ($p<0,05$) (табл. 1) по

сравнению с их числом у крыс контрольной группы. У крыс, подвергавшихся воздействию перинатальной гипоксии и получавших в течение 14 суток фенибут на П20 и П40 общее число GABAергических нейронов не отличалось от его показателей у животных контрольной группы, при этом количество GABAергических нейронов в обеих возрастных группах было значительно выше (более 30%), чем у крыс, переживших перинатальную гипоксию ($p<0,05$) (табл. 1).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в соматосенсорной области неокортекса у крыс в контроле популяция GABAергических нейронов к ювенильному возрасту (П20) достигает определенной численности и сохраняется до препубертатного возраста (П40). Воздействие острой гипоксии в ранний неонатальный период приводит к утрате значительной части тормозных GABAергических нейронов у крыс обеих возрастных групп. Применение фенибута сразу после воздействия гипоксии нивелирует ее повреждающие эффекты в отношении тормозных интернейронов.

Таблица 1. Число GABAергических нейронов в соматосенсорной области неокортекса (слои (I-VI) у крыс разных возрастных групп П20 и П40 (на усл. ед. площади)

П20 (животные ювенильного возраста)	Количество GAD-67-иммуноположительных нейронов	П40 (животные препубертатного возраста)	Количество GAD-67-иммуноположительных нейронов
Контрольные животные	141,7±6,8	Контрольные животные	152,8±6,9
Животные, пережившие перинатальную гипоксию	110,5±5,8* -22% [1]	Животные, пережившие перинатальную гипоксию	92,4±7,1* -39,5%[1]
Животные, пережившие перинатальную гипоксию и получавшие фенибут	144,4±7,3	Животные, пережившие перинатальную гипоксию и получавшие фенибут	159,2±5,8

* - различия между данными разных возрастных групп значимы при $p<0,05$.

Сокращение численности GABAергических нейронов изменяет баланс тормозных и возбуждающих эффектов в неокортексе, негативно модифицирующих регуляцию двигательной активности, что и наблюдается в клинике энцефалопатий. Применение фенибута может иметь большое значение для разработки стратегии фармакологической коррекции негативных последствий гипоксически-ишемических поражений головного мозга

новорожденных, а также обосновывает перспективность использования фенибута для профилактики и лечения психоневрологических нарушений в постнатальном периоде у детей, перенесших гипоксию на ранних неонатальных сроках.

Список литературы

1. M. Herrera-Marschitz, Short- and long-term consequens of perinatal asphyxia: looking for neuroprotective strategies. /M. Herrera-Marschitz , T.Neira Pefia , E.Rojas-Mancilla , P.Morales . [et all.] //Adv.Neurobiol. – 2015. – Vol, 34, №10.- P. 169-98.

2. E.E. Benarroch, Neocortical interneurons: functional diversity and clinical correlations. / E.E. Benarroch // Neurology. – 2013.- V.81, N 3 . – P. 273–280.

3. V.A. Otellin, Effect of hypoxia in early perinatal ontogenesis on behavior and structural characteristics of the rat brain. /V.A. Otellin, L.I.Khozhai, L.E. Vataeva //. J Evolution.biochem.a.physiol. – 2012. – Vol.48, N5. – P.540-547.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ GABA, И ЭКСПРЕССИЯ GAT_1 ТРАНСПОРТЕРА GABA В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ

Хожай Людмила Ивановна
доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник,
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
astarta0505@mail.ru

Целью работы было изучение распределения нейронов, содержащих ГАМК, и уровня экспрессии GAT_1 в неокортексе крыс в неонатальный период после перинатальной гипоксии. Воздействие гипоксии на мозг новорожденных крыс осуществляли на 2-е неонатальные сутки в течение 1 часа при содержании кислорода в дыхательной смеси – 7,8%. Для выявления GABA и GAT_1 использовали иммуногистохимические реакции. . Изучали соматосенсорную область неокортекса на 5 и 10 постнатальные сутки (П5, П10). Показано, что на П5 воздействие гипоксии приводит к увеличению числа нейронов, содержащих ГАМК, во всех слоях неокортекса. К концу неонатального периода (П10) их численность снижается до контрольных значений. Воздействие гипоксии вызывает значительное снижение экспрессии GAT_1 в слоях неокортекса, при том, что количество GABAергических нейронов соответствует контрольному значению.

Ключевые слова: *неокортекс; гипоксия; GABA; транспортер GAT_1; неонатальный период.*

DISTRIBUTION OF GABA-CONTAINING NEURONS AND EXPRESSION OF THE GABA TRANSPORTER GAT_1 IN THE RATS NEOCORTEX IN THE NEONATAL PERIOD AFTER EXPOSURE TO HYPOXIA

Khozhai Lyudmila Ivanovna
Dr.B.Sc., Chief Researcher I.P. Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia
astarta0505@mail.ru

The aim of this work was to study the distribution of GABA containing neurons and the level of GAT1 expression in the neocortex of rats in the neonatal period after perinatal hypoxia. The effect of hypoxia on the brain of newborn rats was carried out on the 2nd neonatal day for 1 hour at an oxygen content in the respiratory mixture of 7.8%. Immunohistochemical reactions were used to detect GABA and GAT1. The somatosensory area of the neocortex was studied on the 5th and 10th postnatal days (P5, P10). It has been shown that the effect of hypoxia on P5 leads to an increase in the number of GABA containing neurons in all layers of the neocortex. By the end of the neonatal period (P10), their number decreases to control values. Exposure to hypoxia causes a significant decrease in GAT1 expression in neocortical layers, while the number of GABAergic neurons corresponds to the control value.

Keywords: *neocortex; hypoxia; GABA; transporter GAT1; neonatal period.*

Известно, что в неонатальный период головной мозг отличается высокой чувствительностью к воздействию неблагоприятных факторов среды. Гипоксия/ишемия в это время является одним из мощных повреждающих факторов, приводящих к структурно функциональным нарушениям в ЦНС и представляет одну из основных причин детской смертности на ранних постнатальных сроках развития.

Считают, что в период развития и становления формаций мозга расположение и упорядоченное распределение разных типов нейронов в его структурах, в частности, в неокортексе, имеет критическое значение для нормального функционирования ЦНС [1,2]. Показано, что перинатальная гипоксия оказывает повреждающее действие на тормозные GABAергические нейроны неокортекса, при этом, вопрос о распределении нейронов, экспрессирующих GABA, и динамике изменения их численности в разных слоях неокортекса в неонатальный период после воздействия гипоксии, мало изучен.

Транспортные белки для GABA представлены четырьмя классами, из которых GAT_1 является одним из основных транспортеров при синаптической GABAергической нейропередаче [3]. Основная функция GAT_1 заключается в переносе через мембрану аниона этой аминокислоты на основе градиента катиона натрия. Эффективность GABAергической нейропередачи определяется скоростью обратного захвата GABA, осуществляемого GAT_1 транспортером, из синаптической щели или межклеточного пространства [4]. Установлено, что GAT_1 регулирует активность основных пирамидных нейронов коры и нарушение его экспрессии может быть связано с многочисленными патологическими состояниями головного мозга, включая эпилепсию [3,5].

Вопрос о динамике экспрессии GAT_1 в разных слоях неокортекса в неонатальный период развития после воздействия гипоксии до настоящего времени остается мало изученным.

В связи с этим, целью работы было исследование распределения, GABA-содержащих нейронов и уровня экспрессии GAT_1 в разных слоях неокортекса после воздействия перинатальной гипоксии.

Материал и методы исследования.

Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar. В работе использовали модель недоношенной беременности человека, т.е. общей гипоксии, воспроизводящей спектр повреждений мозга, наблюдаемых у недоношенных новорожденных детей при условии недоразвития респираторной системы и нарушения респираторных функций (асфиксии).

Воздействие общей острой гипоксии осуществляли на 2-е постнатальные сутки в специальной камере в течение 1 часа при содержании в дыхательной смеси: кислорода – 7.6-7.8%; углекислого газа – 0.15-0.21%; азота – 91.8%, при

температуре 21.3-23 Cº и нормальном общем атмосферном давлении (760 мм рт. ст.). В работе использовали 2 группы животных: (1) крысы, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии (n=12); и (2) контрольные животные тех же возрастных сроков (n=12). Исследование проводили на 5 и 10 постнатальные сутки (П5, П10). Изучали соматосенсорную область неокортекса.

Готовили парафиновые серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм на уровне брегмы – 0,60 mm – 0,40 mm. Исследование проводили цифровых изображениях, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) при увеличении объектива 100× и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Иммуногистохимическую реакцию на ГАМК проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, ab8891, Abcam, Великобритания). В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP) (Abcam, Великобритания).

Иммуногистохимическую реакцию на GAT_1 проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA transporter 1; GAT_1; ab426, Abcam, Великобритания). В качестве вторичных реагентов для GAT_1 использовали реактивы из набора EnVision+System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США) Визуализацию продукта обеих иммунных реакций осуществляли использованием хромогена DAB+ (Dako, Дания), специфичность реакций проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител). Срезы заключали в синтетическую среду Permaunt (Termo, США).

Количественный анализ данных осуществляли на изображениях, при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0.

Уровень содержания GAT_1 выражали в значениях оптической плотности (D) (условных единицах; у.е.) продукта иммунной реакции. Определяли среднее значение D в иммунопозитивных отростках и гранулах.

Все статистически обработанные данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего (m ± SEM). Для анализа и сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway* ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc., USA), различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Результаты исследования.

Исследование показало, что у контрольных животных на П5 в верхних слоях II-III и глубоком слое VI число нейронов, иммунопозитивных на GABA, существенно превышает их количество в слоях IV и V (табл.1). После воздействия гипоксии в верхних слоях высокая численность таких нейронов сохраняется, а в глубоких слоях IV и V их число значительно увеличивается и примерно соответствует их числу в верхних слоях (табл.1).

Выявлено, что у животных в контроле к концу неонатального периода (П10) в разных слоях (II-III, IV,V и VI) неокортекса значения численности нейронов, иммунопозитивных на GABA, сопоставимы между собой, т.е. тормозные интернейроны почти равномерно распределяются в слоях неокортекса. После воздействия гипоксии численность нейронов, иммунопозитивных на GABA, в слоях почти не меняется за исключением их числа в слое V, где оно значительно сокращается (табл.1).

Таблица1 – Количество нейронов иммунопозитивных на GABA в слоях неокортекса на 5 и 10 постнатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия гипоксии (число клеток на у. е. площади)

Слои неокортекса	число нейронов, иммунопозитивных на GABA, на у. е. площади			
	Сроки развития			
	П5 (контроль)	П5 (гипоксия)	П10 (контроль)	П10 (гипоския)
I	6,2±0,4	4,8±1,4	5,8±1,2	6,4±1,3
II-III	18,6±1,4	19,9±1,4	9,0±1,3	7,3±1,1
IV	12,5±1,8	16,2±1,5	10,7±1,2	12,4±0,9
V	8,0±1,4	20,1±0,9	7,4±0,9	4,3±1,0*
VI	19,3±1,2	16,4±1,3	8,5±0,8	8,3±0,8

* Отличия количественных значений в слоях неокртекса между животными разных возрастных групп достоверны при $P < 0.05$.

На протяжении неонатального периода у крыс в контроле в разных слоях соматосенсорной области коры интенсивность экспрессии GAT_1 меняется. В слое I на П5 она имеет самое высокое значение по сравнению с другими слоями, к концу неонатального периода (П10) она значительно снижается, а во всех остальных слоях интенсивность экспрессии GAT_1 существенно повышается. Воздействие гипоксии приводит к резкому увеличению экспрессии GAT_1 во всех слоях на П5. К концу неонатального периода (П10) интенсивность экспрессии GAT_1 в слоях I и VI соответствует контрольным значениям, а в остальных слоях (II-III, IV и V) значительно снижается.

Таблица 2 – Значения оптической плотности (D) продукта иммунной реакции на GAT_1 в слоях неокортекса на 5 и 10 неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия гипоксии (в у. е.)

Слои неокортекса	*D (у. е.)*			
	Сроки развития			
	П5 (контроль)	П5 (гипоксия)	П10 (контроль)	П10 (гипоксия)
I	0,280 ± 0,004	0,350 ± 0,008	0,142 ± 0,007*	0,128 ± 0,008
II-III	0,044 ± 0,002	0,106 ± 0,007	0,138 ± 0,005*	0,036 ± 0,004*
IV	0,071 ± 0,003	0,059 ± 0,006	0,091 ± 0,004*	0,031 ± 0,005*
V	0,095 ± 0,004	0,064 ± 0,008	0,123 ± 0,008*	0,055 ± 0,008*
VI	0,048 ± 0,005	0,053 ± 0,007	0,069 ± 0,003	0,067 ± 0,006

* Отличия значений ***D*** в разных слоях неокортекса между животными различных возрастных групп достоверны при $P < 0.05$.

Проведенное исследование показало, что в течение неонатального периода в разных слоях неокортекса существует динамика изменения как числа нейронов, содержащих **GABA**, так и экспрессии GAT_1. Середина неонатального периода (П5) - это срок, когда активно идет процесс стратификации, который заканчивается к П7 и, вероятно, происходит завершение формирования верхних слоев, которые в ходе развития образуются последними. Показано, что у животных в контроле к концу неонатального периода молодые **GABA**ергические нейроны распределяются по слоям неокортекса почти равномерно и к этому времени существенно повышается уровень экспрессии GAT_1, что может свидетельствовать об установлении синаптической трансмиссии **GABA.** Воздействие гипоксии приводит сначала к повышению числа интернейронов в слоях коры, но к концу неонатального периода их количество снижается и соответствует контрольным значениям, при этом резко снижается уровень экспрессии GAT_1, что скорее всего можно рассматривать как нарушение **GABA**ергического синаптогенеза и общего созревания нейронов неокортекса

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-015-00052\22.

Список литературы

1. G. Fishell, Mechanisms of inhibition within the telencephalon: «where the wild things are" / G. Fishell, B. Rudy // Annu. Rev. Neurosci. – 2011. – Vol.34. – P. 535-567.

2. S. Sahara, The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. / S.Sahara, Y.Yanagawa, D.D. O'Leary, C.F. Stevens // J. Neurosci. – 2012. – Vol. 32. –P. 4761-4761.

3. A. Gadea, Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. / A. Gadea, A.M. Lopez-Colome // J. Neurosci. Res. – 2001. – Vol. 63. – P. 461-468.

4. D.D. Loo, Role of Cl- in electrogenic Na+-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. / D.D. Loo, S. Eskandari, K.J. Boorer // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 37414-37422. 5. Qian Z. Expression and functions of glutamate and γ-aminobutyric acid transporters in ischemic models. / Z. Qian, Y. Lin, J. Xing, Y. Qiu., L. Ren // Molecular Medicine Reports. – 2018. - Vol. 17, N6. – P. 8196–8202.

РОЛЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ГЕНАХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ ХРОНИЧСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Хотько Екатерина Александровна
к.м.н., ассистент кафедры биологической химии, Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск
qwert.poilk@mail.ru
Таганович Анатолий Дмитриевич
д.м.н., профессор, заведующий кафедры биологической химии, Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск
ataganovich@gmail.com
Шабаев Глеб Витальевич
студент лечебного факультета, Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск
glebshab@mail.ru

При хронической обструктивной болезни легких отмечаются изменения количества или связывающей способности интерлейкинов, что может быть обусловлено однонуклеотидными заменами в структуре генов интерлейкинов. Целью работы явилось определение роли однонуклеотидных замен в структуре генов интерлейкинов 4, 6 и 10 при ХОБЛ. В ходе работы использованы инструментальные, лабораторные и статистические методы исследования. Установлено, что однонуклеотидные замены rs1800896 в гене IL10 и rs1800795 в гене IL6 имеют тесную связь с развитием ХОБЛ. При этом носительство генотипов AA (rs1800896) и CG/GG (rs1800795) достоверно чаще встречается у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми людьми ($\chi2=11,80$, $p=0,003$ и $\chi2=6,88$, $p=0,03$ соответственно).

Ключевые слова: *однонуклеотидные замены; интерлейкины; хроническая обструктивная болезнь легких.*

THE ROLE OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLIMORPHISMS IN THE INTERLEUKIN GENES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Khotko Ekaterina Alexandrovna
C.M.Sc., assistant of the department of biological chemistry, Belarusian state medical university, Minsk
qwert.poilk@mail.ru
Taganovich Anatoly Dmitrievich
Dr.M.Sc., professor, head of the department of biological chemistry, Belarusian state medical university, Minsk
ataganovich@gmail.com
Shabaev Gleb Vitalievich
student of the faculty of medicine, Belarusian state medical university, Minsk

glebshab@mail.ru

In chronic obstructive disease, changes or binding properties of interleukins are observed. It can depend on single nucleotide polymorphisms in the structure of interleukin genes. The aim of the study was to determine the role of single nucleotide polymorphisms in the genes of interleukins 4, 6 and 10 in COPD. In this study, instrumental laboratory and statistical research methods were used. It has been established that single nucleotide polymorphisms rs1800896 in the IL10 gene and rs1800795 in the IL6 gene are closely associated with COPD development. At the same time, carriage of the AA (rs1800896) and CG/GG (rs1800795) genotypes is statistically significant predominant in patients with COPD compared to healthy people ($\chi2=11.80$, $p=0.003$ and $\chi2=6.88$, $p=0.03$, respectively).

Key words: *single nucleotide polymorphisms; interleukins; chronic obstructive pulmonary disease.*

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – заболевание, которое характеризуется усиленным воспалительным ответом легочной ткани. При этом в крови пациентов отмечается увеличение количества воспалительных медиаторов, в первую очередь, интерлейкинов [1]. Причиной таких изменений могут служить однонуклеотидные замены (ОНЗ) в структуре генов, кодирующих образование интерлейкинов. ОНЗ, расположенные в некодирующих участках, могут влиять на генетический сплайсинг, деградацию мРНК и связывание транскрипционных факторов [2].

Среди провоспалительных интерлейкинов в крови пациентов с ХОБЛ значительно изменяется содержание IL6 и IL4. Роль IL6 в патогенезе ХОБЛ подтверждается исследованиями, показывающими, что высокий уровень этого цитокина в сыворотке крови и мокроте связан с быстрым снижением функции легких [3]. Также, у пациентов с ХОБЛ, имеющих признаки хронического бронхита, отмечено увеличение синтеза IL4 клетками, секретирующими слизь, и плазматическими клетками слизистой оболочки дыхательных путей [4].

Среди противовоспалительных интерлейкинов особое место занимает IL10, снижение концентрации которого в сыворотке крови коррелирует с тяжестью ХОБЛ [5].

ОНЗ в структуре вышеназванных генов, влияющие на количество синтезируемого белка, расположены, главным образом, в промоторе гена. Так для замены rs2243250 (C589T) в гене IL4 было показано увеличение связывания фактора транскрипции при наличии полиморфной аллели T [6]. Замена rs1800795 (G174C) гена IL6 характеризуется появлением цитозина (C) в 174 положении промотора вместо гуанина (G). Отмечено, что у гомозиготных носителей мажорной аллели G наблюдается повышение концентрации IL6 [7]. Одной из наиболее значимых ОНЗ промоторной области гена IL10 является rs1800896 (A1082G). Она характеризуется заменой аденина (A) на гуанин (G) в

промоторной области гена. Наличие аллельного варианта G ассоциировано с высоким синтезом IL10, в то время как аллель A приводит к снижению продукции IL10 in vitro [8].

Таким образом, целью исследования явилось определение роли однонуклеотидной замены rs2243250 в структуре гена IL4, rs1800795 гена IL6 и rs1800896 гена IL10 при хронической обструктивной болезни легких.

Таблица 1 – Результаты оценки частот встречаемости генотипов изучаемых однонуклеотидных на соответствие уравнению Харди-Вайнберга в группах пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц [9]

Генотип	Пациенты с ХОБЛ, %	HWE, %	χ^2 (p)	Здоровые лица, %	HWE, %	χ^2 (p)
IL10, rs1800896						
AA	42,1	37,9	3,17 (0,07)	21,0	18,1	1,36 (0,24)
AG	38,9	47,3		43,2	48,9	
GG	19,0	14,8		35,8	32,9	
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	

На базе учреждения здравоохранения «Минский консультативно-диагностический центра» были проведены диагностика и клиническое обследование 190 участников исследования. Среди всех обследованных диагноз ХОБЛ был установлен у 95 пациентов, остальные 95 обследуемых составили группу клинически здоровых лиц. В качестве материала для исследования использована ДНК, выделение которой из лейкоцитов осуществлялось с использованием коммерческих наборов. Для поиска однонуклеотидных замен исследуемых локусов использовали аллель-специфические зонды типа Taq-Man (ООО «ТестГен»). Предварительно частоты генотипов в исследуемых группах были проанализированы на соответствие уравнению Харди-Вайнберга с помощью пакета программ Microsoft Excel. В дельнейшем проводили сравнение исследуемых выборок пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц путем составления таблиц сопряженности и расчета критерия хи-квадрат. Для оценки риска развития ХОБЛ в зависимости от носительства аллели или генотипа рассчитывали показатель отношения шансов (ОШ). Статистически значимыми

принимали значения доверительного интервала 95% (ДИ95%), не пересекающие 1. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

При анализе распределения частот генотипов полиморфизмов rs2243250 гена IL4, rs1800795 гена IL6 и rs1800896 гена IL10 отклонений от равновесия Харди-Вайнберга как в группе пациентов с ХОБЛ, так и в группе здоровых лиц выявлено не было (таблица 1).

Сравнение частот генотипов однонуклеотидной замены rs2243250 гена IL4 не выявило существенных отличий их носительства в исследуемых группах ($p>0,05$). Однако, значения частот двух аллелей ОНЗ rs2243250 гена IL4 (C=77,9% и T=22,1%) у белорусов наиболее близки к таковым у жителей Южной Азии (73,0% и 27,0% соответственно) и представителей субэтнической группы евреев Центральной Европы – Ашкеназы (76,2% и 23,8% соответственно).

Таблица 2 – Рисковая значимость носительства генотипов исследуемых однонуклеотидных замен [9]

Ген/rs	Генотип/ аллель	Частота носительства, %		χ2 (p)	ОШ	95%ДИ
		Пациенты с ХОБЛ, n=95	Здоровые лица, n=95			
IL10 rs1800896	AA[1]	42,1 (40)	21,0 (20)	11,80 (0,003)	2,73	1,44-5,17
	AG	38,9 (37)	43,2 (41)		0,84	0,47-1,50
	GG	19,0 (18)	35,8 (34)		0,42	0,22-0,82
	AA/AG[2]	81,1 (77)	64,2 (61)	6,78 (0,010)	2,38	1,23-4,63
	GG	18,9 (18)	35,8 (34)		0,42	0,22-0,82
	AG/GG[3]	57,9 (55)	78,9 (75)	9,74 (0,002)	0,37	0,19-0,70
	AA	42,1 (40)	21,1 (20)		2,73	1,44-5,17
	аллель A[4]	61,6 (117)	42,6 (81)	13,67 (<0,001)	2,18	1,43-3,25
	аллель G	38,4 (73)	57,4 (109)		0,46	0,31-0,70
IL6 rs1800795	CC[1]	19,0 (18)	35,8 (34)	6,88 (0,03)	0,42	0,22-0,82
	CG	52,6 (50)	40,0 (38)		1,66	0,94-2,96
	GG	28,4 (27)	24,2 (23)		1,24	0,65-2,38
	CC/CG[2]	71,6 (68)	75,8 (72)	0,43 (0,51)	0,81	0,42-1,54
	GG	28,4 (27)	24,2 (23)		1,24	0,65-2,38
	CG/GG[3]	81,1 (77)	64,2 (61)	6,78 (0,010)	2,38	1,23-4,63
	CC	19,0 (18)	35,8 (34)		0,42	0,22-0,82
	аллель C[4]	45,3 (86)	55,8 (106)	4,83 (0,041)	0,66	0,44-0,98
	аллель G	54,7 (104)	44,2 (84)		1,53	1,02-2,29

Примечание: [1] – аддитивная модель наследования; [2] – рецессивная модель наследования; [3] – доминантная модель наследования; [4] – мультипликативная модель наследования.

Оценка генотипов и аллелей замены rs1800795 гена IL6 показала, что среди пациентов с ХОБЛ преобладают носители гетерозиготного генотипа GC (56,2%) в сравнении с контрольной группой (40,0%). В ходе анализа рисковой значимости каждого из вариантов генотипов установлено, что гомозиготное

носительство СС ассоциировано с пониженной вероятностью развития ХОБЛ (ОШ=0,42; ДИ=[0,22-0,82], p=0,03), в то время как генотипы CG/GG связаны с повышенной вероятностью возникновения патологии (ОШ=2,38) (таблица 2).

Сравнение частот генотипов ОНЗ rs1800896 гена IL10 выявило существенные отличия их носительства в исследуемых группах ($\chi2$=11,80, p=0,003). Доля носителей гомозиготного генотипа АА в выборке пациентов с ХОБЛ составила 42,1%. В то же время в группе здоровых людей частота носительства этого генотипа была на уровне 21,0%. При этом значения параметра ОШ указывают на то, что генотипом, влияющим на повышение вероятности развития ХОБЛ, является АА (ОШ=2,73; ДИ=1,44-5,17).

Таким образом, однонуклеотидные замены rs1800896 в гене IL10 и rs1800795 в гене IL6 имеют тесную связь с развитием ХОБЛ. При этом носительство генотипов АА (rs1800896) и CG/GG (rs1800795) достоверно чаще встречается у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми людьми ($\chi2$=11,80, p=0,003 и $\chi2$=6,88, p=0,03 соответственно).

Список литературы

1. Хотько, Е. А. Полиморфизм генов рецепторов и их лигандов при хронической обструктивной болезни легких / Е. А. Хотько, А. Д. Таганович // Медицинский журнал. – 2016. – № 3. – С. 36–42.

2. Robert, F. Exploring the impact of single-nucleotide polymorphisms on translation [Electronic resource] / F. Robert, J. Pelletier // Front. Genet. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6218417/. – Date of access: 30.12.2018. – doi: 10.3389/fgene.2018.00507.

3. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis [Electronic resource] / J. Wei [et al.] // PeerJ. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4556145/. – Date of access: 26.08.2020. – doi: 10.7717/peerj.1199.

4. Plasma cells and IL-4 in chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease / J. Zhu [et al.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 175, № 11. – P. 1125–1133.

5. Increased serum IL-17 and decreased serum IL-10 and IL-35 levels correlate with the progression of COPD / S. Jiang [et al.] // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. – 2018. – Vol. 2018, № 13. – P. 2483–2494.

6. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD / A. E. Hegab [et al.] // Chest. – 2004. – Vol. 126, № 6. – P. 1832–1839.

7. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women / S. L. Ferrari [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 88, № 1. – P. 255–259.

8. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter / D. M. Turner [et al.] // Eur. J. Immunogenet. – 1997. – Vol. 24, № 1. – P. 1–8.

9. Хотько, Е. А. Риск развития ХОБЛ у пациентов с полиморфизмами генов, кодирующих рецепторы лейкоцитов и их лиганды / Е. А. Хотько, А. Д. Таганович, А. Г. Кадушкин // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рецензир. ежегод. сб. науч. трудов / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: С.П. Рубникович, В.А. Филонюк. – Минск: БГМУ, 2021. – Вып. 11. – С. 491-500.

ОЛИГОМЕРЫ ПЕПТИДОВ SK30, DT19Y И DT19W ИЗ КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА B19 УСТОЙЧИВЫ К ЗАКИСЛЕНИЮ СРЕДЫ

Хрусталёв Владислав Викторович
д.б.н., доцент, заведующий кафедрой общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
vvkhrustalev@mail.ru
Хрусталёва Татьяна Александровна
к.б.н., учёный секретарь Института физиологии НАН Беларуси, г. Минск
tanissia.lir@gmail.com
Стожаров Александр Николаевич
д.б.н., профессор, профессор кафедры радиационной медицины и экологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
stojarov@mail.ru
Шалыго Николай Владимирович
д.б.н., доцент, член-корреспонднт НАН Беларуси, профессор кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
nikolai_shalygo@yahoo.com
Побойнев Виктор Витольдович
Ассистент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
dremozzew@mail.ru
Акуневич Анастасия Александровна
Ассистент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
nastya.akunevich@gmail.com
Харитонова Ульяна Витальевна
Преподаватель-стажёр кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
ulyana221199@mail.ru

Проведён голубой нативный электрофорез синтетических пептидов DT19Y, DT19W и SK30 из капсидного белка парвовируса B19. Сравнение результатов электрофореза при pH=7,4 и pH=5,0 показало, что порядок олигомеров этих пептидов не изменился при закислении среды, что позволяет изучать влияние снижения pH на их спектральные свойства без учёта процесса олигомеризации. Замена Tyr на Trp в восьмом положении пептида DT19 приводит к снижению порядка олигомеров. Пептид SK30 формирует олигомеры высокого порядка.

Ключевые слова: *парвовирус B19; синтетический пептид; голубой нативный электрофорез; рецептор-связывающий домен; капсидный белок.*

OLIGOMERS OF SK30, DT19Y AND DT19W PEPTIDES FROM PARVOVIRUS B19 CAPSID PROTEIN ARE RESISTANT TO THE ACIDIFICATION OF THE MEDIUM

Khrustalev Vladislav Victorovich
Dr.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
vvkhrustalev@mail.ru
Khrustaleva Tatyana Aleksandrovna
C.B.Sc., Scientific Secretary, Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
tanissia.lir@gmail.com
Stojarov Aleksander Nicolaevich
Dr.B.Sc., Professor, Professor of the Department of Radiation Medicine and Ecology, Belarusian State Medical University, Minsk
stojarov@mail.ru
Shalygo Nikolai Vladimirovich
Dr.B.Sc., Associate Professor, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
nikolai_shalygo@yahoo.com
Poboinev Victor Vitoldovich
Assistant Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
dremozzew@mail.ru
Akunevich Anastasia Aleksandrovna
Assistant Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
nastya.akunevich@gmail.com
Kharitonova Ulyana Vitalyevna
Trainee Teacher of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
ulyana221199@mail.ru

Native blue electrophoresis of synthetic peptides DT19Y, DT19W, and SK30 from capsid protein of parvovirus B19 has been performed. Comparison of the results of electrophoresis at pH=7.4 and pH=5.0 showed that the order of oligomers did not change with the acidification of the medium, that justifies the study of the influence of the decrease in pH on their spectral properties without additional consideration of oligomerization process. Substitution of Tyr by Trp in the eights position of the DT19 peptide leads to the decrease of the order of oligomers. SK30 peptide forms oligomers of the high order.

Key words: *parvovirus B19; synthetic peptide; blue native electrophoresis; receptor-binding domain; capsid protein.*

Парвовирус B19 попадает в клетку благодаря фагоцитозу [1]. Вирионы, прикреплённые к рецептору на клеточной мембране, попадают в эндосому, а последняя сливается с лизосомой. При закислении среды в капсиде вируса происходят определённые структурные перестройки, благодаря которым домен, гомологичный фосфолипазе A2, гидролизирует кардиолипин мембраны, формируя в ней пору, через которую генетический материал вируса проникает внутрь цитоплазмы. О том, какие именно перестройки могут происходить в капсидном белке при закислении среды, можно косвенно судить по результатам экспериментов с пептидами из его наиболее функционально важных фрагментов. К таковым можно отнести рецептор-связывающий домен, моделью которого можно считать пептид DT19Y, и фрагмент, гомологичный фосфолипазе A2, моделью для которого является пептид SK30. Пептид DT19W содержит аминокислотную замену Tyr на Trp, приводящую к полной потере способности проникать внутрь цитоплазмы для парвовируса B19 [2]. О структурных переходах в пептидах можно судить по результатам спектральных методов исследования. Однако перед их применением необходимо проверить, формируют ли эти пептиды олигомеры в водном растворе, остаётся ли их порядок одинаковым при pH=7,4 и pH=5,0.

Целью настоящего исследования явилась проверка влияния закисления среды на порядок олигомеров пептидов из капсида парвовируса B19.

В качестве материала для исследования использованы сконструированные нами коммерчески синтезированные (Elabscience) пептиды DT19Y (DKFAKAVYQQFVEFYEKVT), DT19W (DKFAKAVWQQFVEFYEKVT) и SK30 (SAVDSAARIHDFRYSQGWTVADEELLKNIK), а также цитохром C из сердца свиньи (SERVA, Германия). Методом исследования был нативный голубой электрофорез в 10% полиакриламидном геле в камере Hoefer SE600 при охлаждении, который осуществляли трижды при pH=7,4 и однократно при pH=5,0. Протокол исследования включал заливку геля при pH=7,4 в 0,5 М бис-трис буфере, растворение в течение ночи при 5°C пептидов в катодном буфере при pH=7,4 (или pH=5,0) в присутствии Кумасси голубого G-250 (0,25%) и проведение электрофореза в таком же буфере, содержащем 50 мМ трицин и 15 мМ бис-трис при pH=7,4 (или pH=5,0) в присутствии 0,02% Кумасси голубого G-250. В качестве анодного буфера использовали 50 мМ бис-трис буфер при pH=7,4 (или pH=5,0). Перед проведением электрофореза при pH=5,0 гель, приготовленный при pH=7,4, предварительно подвергали пре-электрофорезу с соответствующими катодным и анодным буферами, pH которых был равен 5,0, не содержащими Кумасси голубого G-250.

Электрофорез проводили при напряжении 120 В до момента пересечения красителем линии между концентрирующим и разделяющим гелем, а затем увеличивали напряжение до 150 В. Сила тока была равна 20 мА. Процедура длилась 4 часа – до момента приближения красителя к краю геля на 1 см.

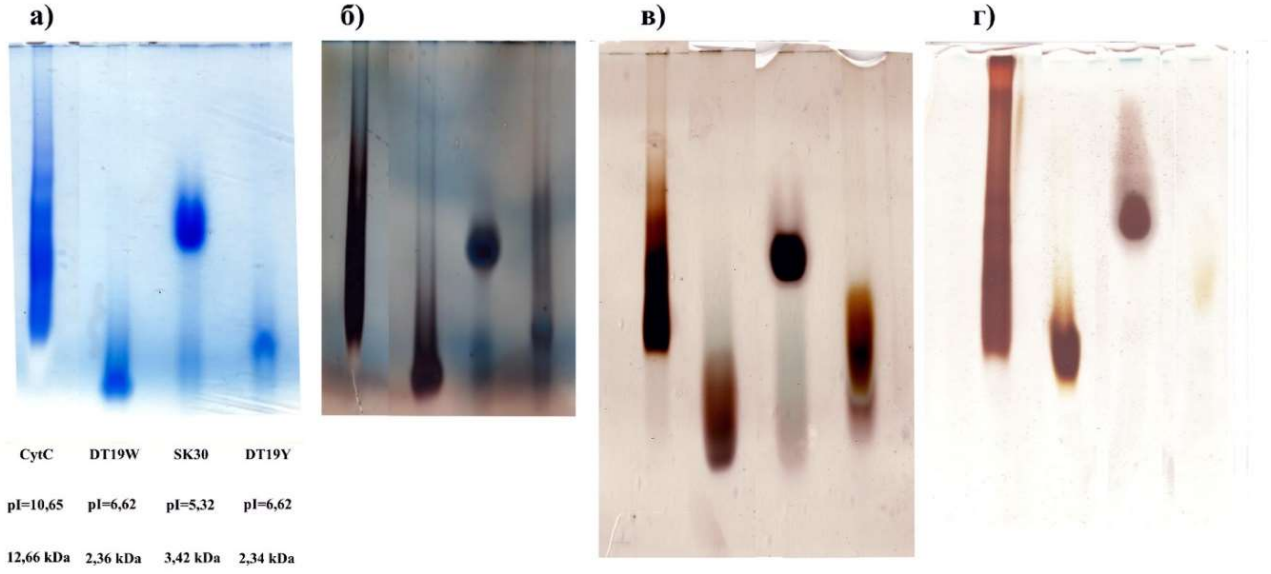


Рисунок 1 – Электрофореграммы для цитохрома С и пептидов DT19W, SK30, DT19Y при pH=7,4 (а, б, в) и pH=5,0 (г); три последних геля (б, в, г) окрашены серебром.

В первом эксперименте окраску геля не проводили, так как белки уже были окрашены Кумасси голубым G-250, но отмывали краситель раствором этанола и уксусной кислоты в деионизованной воде. В трёх последующих экспериментах после отмывки геля в течение 48 часов раствором этанола и уксусной кислоты в деионизованной воде проводили окраску серебром по стандартному протоколу.

Результаты всех четырёх экспериментов (рисунок 1) схожи в плане взаимного расположения на геле полос для трёх синтетических пептидов. Пептид DT19W мигрирует на более далёкое расстояние от линии старта, чем пептид DT19Y, несмотря на то что разница в молекулярной массе их мономеров незначительна, а рассчитанное значение pI одинаково. Получается, что замена Tyr на Trp привела к тому, что пептид DT19W образует олигомеры более низкого порядка, чем пептид DT19Y. Пептид SK30 демонстрирует наименьшее расстояние от линии старта относительно DT19W и DT19Y на всех электрофореграммах. При этом молекулярная масса его мономера превышает таковую для DT19W менее, чем в 1,5 раза (что должно способствовать сокращению пути его миграции в геле), но его pI ниже, чем у двух других пептидов (что должно, наоборот, заставлять его мигрировать быстрее в буфере с pH=7,4). Исходя из полученных данных можно предположить, что пептид SK30

образует олигомеры более высокого порядка, чем DT19Y и, тем более, DT19W. Весьма вероятно, что SK30 будет более иммуногенным, чем DT19Y.

При сравнении электрофореграммы с рисунка 1г с тремя другими заметно, что интенсивность окраски полосы для пептида DT19Y является весьма низкой. Объяснить такое явление можно тем, что концентрация этого пептида в насыщенном растворе при pH=5,0 примерно в 2 раза ниже, чем при pH=7,4, согласно сравнению интенсивности сигнала флюоресценции в них.

Ещё одной особенностью электрофореграммы с рисунка 1г является сокращение пути миграции пептидов DT19Y и DT19W относительно такового для мономера цитохрома С. Основной принцип голубого нативного электрофореза заключается в том, что Кумасси голубой G-250, связываясь с белками, не приводит к их полной денатурации (белок-белковые комплексы сохраняются), но сообщает им (точнее их комплексам с красителем) отрицательный заряд. Последнее обстоятельство заставляет мигрировать к аноду даже те белки, которые сами по себе имели бы положительный заряд при данном pH буфера. Таким белком является цитохром С, так как его pI=10,65, и он должен нести положительный заряд как в буфере с pH=7,4, так и в буфере с pH=5,0. Получается, что величина отрицательного заряда во многом зависит от pI белка даже после обработки его раствором Кумасси голубого G-250. Синтетические пептиды DT19Y и DT19W должны были быть отрицательно заряжены в буфере с pH=7,4, но положительно заряжены при pH=5,0, так как их pI=6,62. Следовательно, при pH=7,4 DT19Y и DT19W действительно должны передвигаться быстрее, чем при pH=5,0, в особенности, относительно цитохрома С. Таким образом, о молекулярной массе олигомеров DT19Y и DT19W в данном эксперименте можно судить лишь приблизительно: она находится в районе 12,66 кДа, так как на рисунках 1а, 1б и 1в полоса DT19Y близка к полосе для мономера цитохрома С, а на рисунке 1г к последней близка полоса DT19W.

Исходя из ранее полученных данных [2], в растворе пептидов DT19Y и DT19W при pH=7,4 присутствуют олигомеры, масса которых выше, чем 10 кДа, так же, как и олигомеры с молярной массой менее 10 кДа. Количественное соотношение между олигомерами разного порядка путём мембранной фильтрации установить невозможно по причине адсорбции пептидов как на нитроцеллюлозе, так и на полиэфирсульфоне [2]. В настоящем эксперименте доказан факт более высокого порядка для основной фракции олигомеров пептида DT19Y по сравнению с таковым для пептида DT19W с аминокислотной заменой. Так как закисление среды не повлияло на порядок олигомеров этих пептидов, изменения в их спектральных свойствах, вызванные снижением pH, нельзя объяснять диссоциацией олигомеров или образованием олигомеров более высокого порядка, что важно для интерпретации подобных данных.

Выводы

1. Несмотря на перезарядку пептидов SK30, DT19Y и DT19W при переходе от pH=7,4 к pH=5,0, порядок их олигомеров остаётся прежним.

2. Пептид SK30 формирует олигомеры высокого порядка, что делает его перспективным для использования в качестве вакцинного пептида без предварительной конъюгации с белком-носителем.

3. Структурные перестройки рецептор-связывающего домена парвовируса B19 при закислении среды можно изучать спектральными методами на модели пептидов DT19Y и DT19W, так как на интенсивность и характеристики сигнала не будет влиять изменение порядка олигомеров.

Список литературы

1. Human parvovirus B19 interacts with globoside under acidic conditions as an essential step in endocytic trafficking / J. Bieri [et al.] // PLoS Pathog. – 2021. – Vol. 17. – N. e1009434.

2. О влиянии аминокислотной замены Y20W на вторичную структуру пептида, соответствующего фрагменту рецептор-связывающего домена парвовируса B19 / В.В. Хрусталёв [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. К 100-летию белорусской академической науки [Электронный ресурс] : тез. докл. междунар. науч. конф., Пятнадцатого съезда Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Респ. Беларусь, Минск, 15–17 июня 2022 г. – Минск : БГУ, 2022. – стр. 77.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДОВ DT19Y И DT19W ИЗ КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА B19

Хрусталёв Владислав Викторович
д.б.н., доцент, заведующий кафедрой общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
vvkhrustalev@mail.ru
Хрусталёва Татьяна Александровна
к.б.н., учёный секретарь Института физиологии НАН Беларуси, г. Минск
tanissia.lir@gmail.com
Стожаров Александр Николаевич
д.б.н., профессор, профессор кафедры радиационной медицины и экологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
stojarov@mail.ru
Акуневич Анастасия Александровна
Ассистент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
nastya.akunevich@gmail.com

Конформационные перестройки, происходящие в рецептор-связывающем домене капсидного белка парвовируса B19, были смоделированы в экспериментах in vitro: спектры испускания и возбуждения флюоресценции растворов синтетических пептидов снимали при нагревании образцов. В пептиде DT19Y, соответствующем консенсусной последовательности домена, при pH=5,0 улучшается перенос энергии от пептидных связей к боковым цепям остатков тирозина по сравнению с таковым при pH=7,4. В пептиде DT19W, соответствующем мутантному домену, не позволяющему вирусу интернализироваться, при pH=5,0 остаток триптофана переходит в гидрофобное микроокружение, хотя при pH=7,4 он экспонирован растворителю.

Ключевые слова: *парвовирус B19; синтетический пептид; спектр возбуждения флюоресценции; рецептор-связывающий домен; капсидный белок.*

FLUORESCENT PROPERTIES OF DT19Y AND DT19W PEPTIDES FROM CAPSID PROTEIN OF PARVOVIRUS B19

Khrustalev Vladislav Victorovich
Dr.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
vvkhrustalev@mail.ru
Khrustaleva Tatyana Aleksandrovna
C.B.Sc., Scientific Secretary, Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
tanissia.lir@gmail.com

Stojarov Aleksander Nicolaevich
Dr.B.Sc., Professor, Professor of the Department of Radiation Medicine and Ecology, Belarusian State Medical University, Minsk
stojarov@mail.ru
Akunevich Anastasia Aleksandrovna
Assistant Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
nastya.akunevich@gmail.com

Conformational changes happening in receptor-binding domain of parvovirus B19 capsid domain have been modelled in in vitro experiments: spectra of emission and excitation of fluorescence were recorded for solutions of synthetic peptides during the heating. In the DT19Y peptide that corresponds to the consensus sequence of the domain at pH=5.0 the energy transfer from peptide bonds to side chains of tyrosine residues is enhanced compared to that at pH=7.4. In the DT19W peptide that corresponds to the mutant domain unable to promote virus internalization at pH=5.0 tryptophan residue gets into the hydrophobic microenvironment, while at pH=7.4 it is exposed to the solvent.

Key words: *parvovirus B19; synthetic peptide; fluorescence excitation spectrum; receptor-binding domain; capsid protein.*

Рецептор-связывающий домен капсидного белка парвовируса B19 был определён экспериментально методом направленного мутагенеза [1]. Известно, что многие антитела к данному фрагменту капсидного белка обладают нейтрализирующей активностью [2]. Однако вопрос о том, с каким именно рецептором или ко-рецептором связывается этот домен, остаётся открытым. До сих пор идут дискуссии и о том, при каком именно значении pH происходит связывание: при pH=7,4 (плазма крови) или при pH=5,0 (эндолизосома) [3]. О том, могут ли происходить конформационные изменения в рецептор-связывающем домене парвовируса B19 при закислении среды, можно косвенно судить по результатам экспериментов *in vitro* с синтетическим пептидом, имеющим аналогичную аминокислотную последовательность. Известно, что замена Tyr на Trp в 20 положении капсидного белка VP1 лишает парвовирус B19 способности проникать внутрь цитоплазмы из эндолизосомы [1]. Целесообразным является проведение экспериментов как с пептидом, соответствующим консенсусной последовательности рецептор-связывающего домена (DT19Y), так и с пептидом, несущим упомянутую выше аминокислотную замену (DT19W).

Целью настоящего исследования явилась проверка влияния закисления среды на конформацию флюорофоров в пептидах DT19Y и DT19W из рецептор-связывающего домена капсидного белка парвовируса B19.

Материалом для работы послужили сконструированные нами коммерчески синтезированные (Elabscience) высокоочищенные препараты пептидов DT19Y (DKFAKAVYQQFVEFYEKVT) и DT19W (DKFAKAVWQQFVEFYEKVT). Пептиды (300 мкг) растворяли в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера, оставляли на ночь при температуре 5°С, затем перемешивали при комнатной температуре и подвергали центрифугированию (10 минут при 18000 g) с целью получения насыщенного истинного раствора. Использовали 0,01 М фосфатный буфер с pH=7,4 и с pH=5,0. Далее раствор пептида нагревали от 22°С до 50°С в термостатируемом кюветном отделении спектрофлюориметра Solar 2203 с шагом подъёма температуры в 1°С. При каждой температуре трижды снимали спектр испускания флюоресценции и спектр возбуждения флюоресценции. Для пептида DT19Y, который содержит остатки тирозина, но не содержит остатков триптофана, флюоресценцию возбуждали при длине волны 270 нм и записывали спектр испускания при длинах волн от 295 до 395 нм с шагом в 1 нм, со средней скоростью, при щелях 5 нм. Для пептида DT19W, содержащего остаток триптофана, флюоресценцию возбуждали при длине волны 280 нм и записывали спектр испускания при длинах волн от 300 до 400 нм с шагом в 1 нм, со средней скоростью, при щелях 5 нм. Спектр возбуждения флюоресценции для пептида DT19Y записывали, регистрируя эмиссию при длине волны 302 нм, а для пептида DT19W – при длине волны 360 нм (pH=7,4) и 330 нм (pH=5,0).

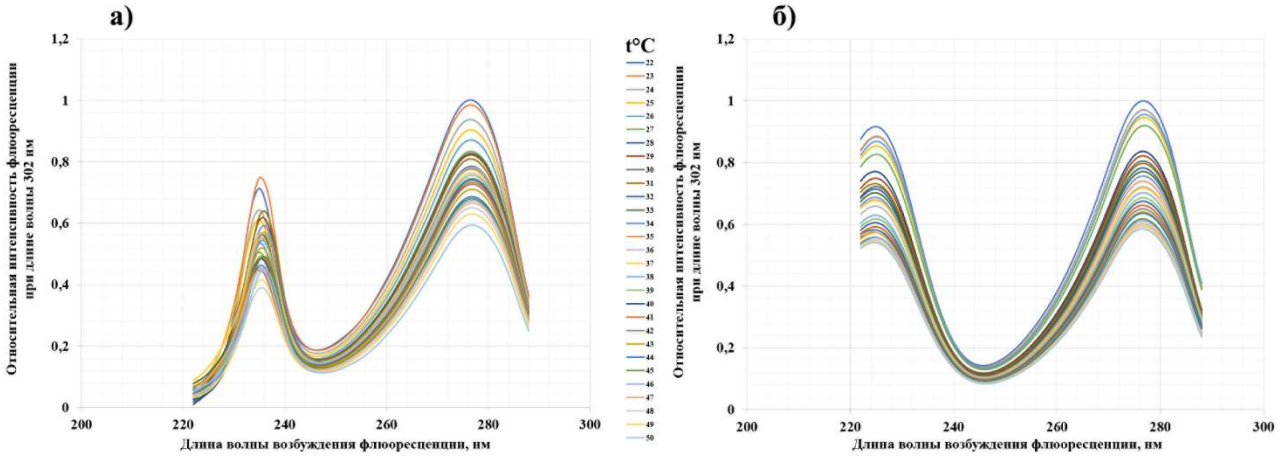


Рисунок 1 – Спектры возбуждения флюоресценции пептида DT19Y в 0,01 М фосфатном буфере при pH=7,4 (а) и pH=5,0 (б) по мере нагревания от 22°С до 50°С

Максимум на спектре испускания флюоресценции белков и пептидов, содержащих остатки тирозина, но не содержащих остатки триптофана, всегда находится при длине волны 302 нм. Спектр возбуждения флюоресценции таких белков и пептидов, однако, подвержен вариациям в зависимости от того, образуют ли ароматические системы боковых цепей тирозина контакты с атомами водорода из пептидных связей [4]. При этом отмечаются изменения в

положении и интенсивности дополнительного пика на спектре возбуждения флюоресценции в районе 220 – 230 нм, возникающего за счёт поглощения энергии пептидной связью и передачи её ароматической системе тирозина.

На рисунке 1 заметно, что второй максимум на спектре возбуждения флюоресценции для пептида DT19Y имеет достоверно ($p<0,001$) более низкую интенсивность (69,27±1,83% от интенсивности главного пика при 277 нм) при pH=7,4, чем при pH=5,0 (91,20±0,51%). Более того, при pH=7,4 второй пик расположен при 235 нм, а при pH=5,0 – при 225 нм. Полученные данные свидетельствуют о том, что энергия, поглощённая пептидными связями, лучше передаётся остаткам тирозина в пептиде DT19Y в условиях закисления среды. Локальная конформация полипептидной цепи в районе остатков Tyr8 и Tyr15 «чувствительна» к переходу от pH=7,4 к pH=5,0, что может иметь место не только у отдельно взятого пептида, но и в полноразмерном капсидном белке.

При нагревании пептида DT19Y при обоих значениях pH воспроизводится одинаковая тенденция: от 22°C до 27°C интенсивность флюоресценции снижается гораздо более резко, чем при дальнейшем нагревании от 27°C до 50°C. Угол наклона при pH=7,4 уменьшается (по модулю) при этом от 0,5472 до 0,1717. Угол наклона при pH=5,0 уменьшается (по модулю) от 0,3253 до 0,1333. Полученные данные можно интерпретировать как свидетельство начала диссоциации олигомеров пептида DT19Y при температуре 27°C. В результате диссоциации олигомеров воздействие соседних аминокислотных остатков, приводящее к уменьшению квантового выхода флюоресценции остатков тирозина, снижается, что обуславливает более плавное увеличение эффекта от температурного тушения флюоресценции при дальнейшем нагревании. Важно подчеркнуть, что диссоциация не происходит одномоментно, а степень её повышается по мере увеличения температуры.

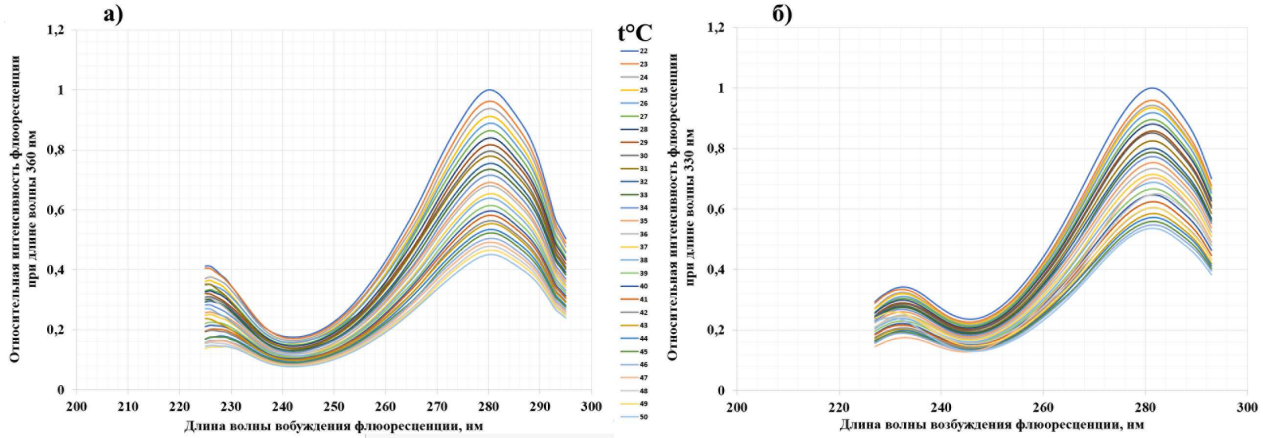


Рисунок 2 – Спектры возбуждения флюоресценции пептида DT19W в 0,01 М фосфатном буфере при pH=7,4 (а) и pH=5,0 (б) по мере нагревания от 22°C до 50°C

Для пептида DT19W интенсивность пика на спектре возбуждения флюоресценции в районе 220-230 нм значительно ниже (рисунок 2), чем для пептида DT19Y (рисунок 1). При pH=7,4 относительная интенсивность этого пика снижается от 41% до 33% от основного пика по мере нагревания. При pH=5,0 данный показатель остаётся на одном уровне 34,34±0,14% от 22°C до 46°C, а далее возрастает до 44% при 50°C. Получается, что перенос энергии от пептидных связей к флюорофорам пептида DT19W не столь эффективен, как у пептида DT19Y. Более того, по мере нагревания пептида DT19W в буфере с pH=7,4 эффективность этого переноса ухудшается, что не характерно для пептида DT19Y.

Интенсивность флюоресценции на её максимуме плавно и линейно снижается по мере нагревания для пептида DT19W при pH=7,4, в то время как при pH=5,0 после линейного снижения наблюдается «возгорание» флюоресценции при температуре 48°C – 50°C. По всей видимости, диссоциация олигомеров пептида DT19W начинается в кислой среде только после достижения температуры, равной 48°C.

Важно отметить, что максимум флюоресценции для пептида DT19W при pH=7,4 находится при 360 нм, а при pH=5,0 он расположен при 330 нм. Такой сдвиг свидетельствует о том, что остаток триптофана пептида DT19W при закислении среды попадает в гидрофобное микроокружение, а при pH=7,4 он полностью экспонирован водному окружению.

Выводы

1. Спектры возбуждения флюоресценции пептидов DT19Y и DT19W отличаются друг от друга, что свидетельствует о существенных различиях в конформации флюорофоров: перенос энергии от пептидных связей к ароматическим системам тирозина и триптофана затруднён в пептиде DT19W.
2. Закисление среды способствует переносу энергии от пептидных связей к радикалам тирозина пептида DT19Y.
3. При закислении среды остаток триптофана пептида DT19W попадает в гидрофобное микроокружение.
4. Пептиды, соответствующие рецептор-связывающему домену капсидного белка парвовируса B19, изменяют свою конформацию при закислении среды, что свидетельствует о подверженности самого рецептор-связывающего домена к pH-зависимым структурным переходам.

Список литературы

1. The receptor-binding domain in the VP1u region of parvovirus B19 / R. Leisi [et al.] // Viruses. – 2016. – Vol. 8. – N. 61.

2. Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits / S. Anderson [et al.] // Virology. – 1995. – Vol. 206. – P. 626-632.

3. The globoside receptor triggers structural changes in the B19 virus capsid that facilitate virus internalization / C. Bönsch [et al.] // J. Virol. – 2010. – Vol. 84. – P. 11737-11746.

4. Костюченко Н.С. Влияние температуры и полярности растворителя на флуоресцентные характеристики тирозина / Н.С. Костюченко, Т.А. Хрусталёва, В.В. Хрусталёв // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : тез. докл. междунар. науч. конф., Пятнадцатого съезда Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Респ. Беларусь, Минск, 15–17 июня 2022 г. – Минск : БГУ, 2022. – стр. 59.

КОНЪЮГАЦИЯ ПЕПТИДА SK30 ИЗ КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА B19 С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ПРЕПЯТСТВУЕТ ФОРМИРОВАНИЮ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОЙ БЕТА-СТРУКТУРЫ

Хрусталёв Владислав Викторович
д.б.н., доцент, заведующий кафедрой общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
vvkhrustalev@mail.ru
Хрусталёва Татьяна Александровна
к.б.н., учёный секретарь Института физиологии НАН Беларуси, г. Минск
tanissia.lir@gmail.com
Стожаров Александр Николаевич
д.б.н., профессор, профессор кафедры радиационной медицины и экологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
stojarov@mail.ru
Акуневич Анастасия Александровна
ассистент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
nastya.akunevich@gmail.com
Побойнев Виктор Витольдович
ассистент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск
dremozzew@mail.ru
Сапон Егор Геннадьевич
научный сотрудник центра физико-химических методов исследования УО «Белорусский государственный технологический университет», г. Минск
sapon@belstu.by

С помощью инфракрасной спектроскопии множественного нарушенного полного внутреннего отражения и флюоресцентной спектроскопии была оценена вторичная и третичная структура вакцинного пептида SK30 из фосфолипазного домена капсидного белка парвовируса B19 и конъюгата пептида CSK31 с бычьим сывороточным альбумином. Несмотря на то, что конформация флюорофоров в обоих случаях весьма схожа, содержащий альфа-спирали пептид SK30 образует олигомеры, в которых мономеры связаны друг с другом межмолекулярной бета-структурой, образованию которой препятствует его конъюгация с бычьим сывороточным альбумином.

Ключевые слова: *парвовирус B19; синтетический пептид; спектр возбуждения флюоресценции; фосфолипазный домен; межмолекулярная бета-структура.*

CONJUGATION OF SK30 PEPTIDE FROM CAPSID PROTEIN OF PARVOVIRUS B19 WITH BOVINE SERUM ALBUMIN DEMINISHES FORMATON OF INTERMOLECULAR BETA STRUCTURE

Khrustalev Vladislav Victorovich
Dr.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
vvkhrustalev@mail.ru
Khrustaleva Tatyana Aleksandrovna
C.B.Sc., Scientific Secretary, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
tanissia.lir@gmail.com
Stojarov Aleksander Nicolaevich
Dr.B.Sc., Professor, Professor of the Department of Radiation Medicine and Ecology, Belarusian State Medical University, Minsk
stojarov@mail.ru
Akunevich Anastasia Aleksandrovna
Assistant Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
nastya.akunevich@gmail.com
Poboinev Victor Vitoldovich
Assistant Professor of the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk
dremozzew@mail.ru
Sapon Yehor Gennadievich
Researcher at the Center for Physical and Chemical Investigation Methods of Belarusian State technological university, Minsk
sapon@belstu.by

With a help of infra red spectroscopy of multiple attenuated total reflectance and fluorescence spectroscopy, secondary and tertiary structures of vaccine peptide SK30 from phospholipase domain of parvovirus B19 capsid protein and conjugate of CSK31 peptide with bovine serum albumin have been studied. Even though conformations of fluorophores in both cases are quite similar, SK30 peptide that contains alpha helices forms oligomers in which monomers are connected with each other by intermolecular beta structure, while conjugation with bovine serum albumin diminishes intermolecular beta structure formation.

Key words: *parvovirus B19; synthetic peptide; fluorescence excitation spectrum; phospholipase domain; intermolecular beta-structure.*

Вакцинный пептид SK30 представляет собой модифицированный фрагмент капсидного белка парвовируса B19, соответствующий его фосфолипазному домену [1]. Ранее путём макромолекулярного докинга с

кардиолипином нами был найден фрагмент на домене капсидного белка парвовируса B19, гомологичного фосфолипазе A2, который ответственен за связывание с этим фосфолипидом. Гидрофобный фрагмент петли между двумя альфа-спиралями был удалён и заменён на остаток глицина [2]. Пептиды, имеющие в своём составе гидрофобные аминокислотные остатки, как правило, существуют в водном растворе в форме олигомеров. При формировании олигомеров могут происходить некоторые структурные перестройки в каждой отдельной полипептидной цепи, что может приводить как к исчезновению В-клеточных эпитопов, присущих полноразмерному белку, так и к появлению новых иммуногенных фрагментов, полноразмерному белку не присущих. Для предотвращения формирования олигомеров вакцинного пептида при сохранении достаточно крупных размеров антигена можно использовать конъюгат, состоящий из множества молекул пептида, «сшитых» с белком-носителем. Однако структура пептида может существенно измениться и в результате конъюгации.

Целью работы явилась оценка вторичной и третичной структуры пептида SK30 в свободном и конъюгированном с бычьим сывороточным альбумином состоянии.

В качестве материала использовали коммерчески синтезированные (Elabscience) высокоочищенные пептиды SK30 (SAVDSAARIHDFRYSQGWTVADEELLKNIK) и CSK31 (CSAVDSAARIHDFRYSQGWTVADEELLKNIK). Конъюгацию пептида с белком-носителем проводили с помощью SMCC (Сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат). Так как конъюгация осуществляется за счёт аминогрупп (со стороны белка-носителя) и сульфгидрильных групп (со стороны пептида), к N-концу пептида SK30 был добавлен остаток цистеина (в результате получился пептид CSK31). Белком-носителем был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА), так как он отличается большим количеством аминогрупп (из боковых цепей лизина), находящихся на поверхности его молекулы.

Пептид SK30, БСА из сыворотки крови крупного рогатого скота (Elabscience) и конъюгат CSK31 с БСА (по 500 мкг) растворяли в 2 мл 0,01 М фосфатного буфера pH=7,4, оставляли на ночь при температуре 5°C, затем перемешивали при комнатной температуре и подвергали центрифугированию (10 минут при 18000 g) с целью получения насыщенного истинного раствора. Полученный раствор исследовали методом спектрофлюориметрии (Solar 2203) и методом инфракрасной спектроскопии многократного нарушенного полного внутреннего отражения (ИК МНПВО) на приборе Thermo Nexus 670 FT-IR ESP Nicolet (Thermo Scientific).

При проведении спектрофлюориметрического исследования растворы нагревали от 20°C до 50°C в термостатируемом кюветном отделении

спектрофлюориметра, шаг подъёма температуры составлял 1°C. При каждой температуре трижды снимали спектр испускания флюоресценции (длина волны возбуждения 280 нм, спектр испускания регистрировали в диапазоне от 300 до 400 нм с шагом в 1 нм, щели по 2 нм) и спектр возбуждения флюоресценции (длина волны регистрации 360 нм, спектр возбуждения записывали от 200 до 300 нм с шагом в 1 нм, щели по 2 нм).

С целью анализа состава олигомеров пептида SK30 проводили центрифужную мембранную фильтрацию (10 минут при 18000 g) его насыщенного раствора через нитроцеллюлозный фильтр Amicon Ultra 0.5 ml (Merk) с порогом отсечения 30 кДа, а затем – через фильтр Amicon Ultra 0.5 ml (Merk) с порогом отсечения 10 кДа.

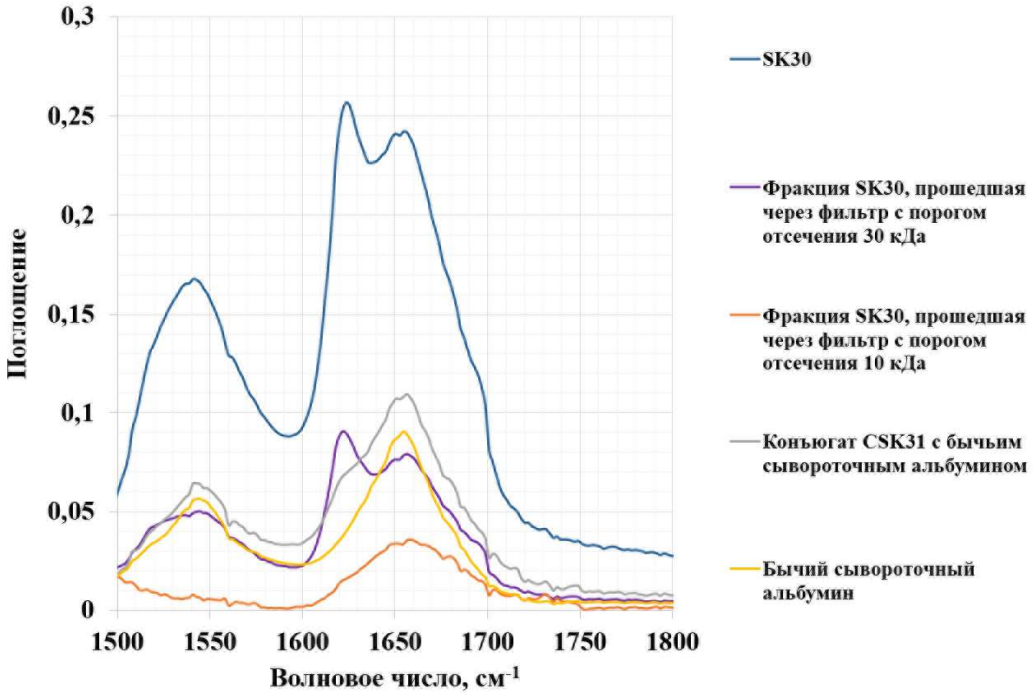


Рисунок 1 – ИК-спектры МНПВО пептида SK30, БСА и конъюгата пептида CSK31 с БСА в 0,01 М фосфатном буфере при pH=7,4

При проведении ИК-спектрографии 50 мкл раствора наносили на кристалл ZnSe с углом падения ИК излучения 45°. Далее регистрировали спектры в течение 2 часов. По мере испарения воды спектр изменялся, пока не достигал постоянной формы. Конечный спектр является усреднённым для 5 спектров, каждый из которых записывался 32 раза, а затем подвергался автоматической коррекции полос поглощения CO_2 и H_2O (подавлению атмосферы) и автоматической коррекции базовой линии.

Метод ИК-спектроскопии МНПВО позволяет судить о вторичной структуре белков в остаточном количестве воды путём анализа положения пиков в полосе амид I, соответствующей вибрациям пептидных связей. Как видно на

рисунке 1, полоса амид I исходного раствора пептида SK30 представлена двумя пиками: при 1655 $см^{-1}$ и при 1624 $см^{-1}$. Первый пик соответствует вибрациям альфа-спирали (1650 – 1659 $см^{-1}$), а второй – вибрациям межмолекулярной бета-структуры (1610 – 1627 $см^{-1}$) [3].

Во фракции раствора пептида SK30, прошедшей через фильтр с порогом отсечения 30 кДа (рисунок 1), также определяются два пика полосы амид I: при 1657 $см^{-1}$ (альфа-спираль) и при 1622 $см^{-1}$ (межмолекулярная бета-структура). Фильтрация такого раствора через следующий фильтр с порогом отсечения 10 кДа привела к удалению олигомеров пептида с межмолекулярной бета-структурой. На спектре остался единственный пик в полосе амид I при 1659 $см^{-1}$ (альфа-спираль).

Следует отметить, что через фильтр с порогом отсечения 30 кДа, судя по интенсивности флюоресценции, прошло 90,65% от исходного количества пептида. Через фильтр с порогом отсечения 10 кДа прошло только 6,53% от нанесённого количества пептида. Подавляющее количество олигомеров SK30 должно иметь молекулярную массу в пределах от 10 кДа до 30 кДа, что соответствует тримерам – октамерам (молекулярный вес мономера SK30 равен 3,42 кДа).

На спектре для чистого БСА присутствует только альфа-спиральный пик полосы амид I при 1655 $см^{-1}$ (что соответствует его альфа-спиральному строению), так же, как и на спектре для конъюгата CSK31 с БСА (при 1657 $см^{-1}$). Однако на рисунке 1 заметно, что спектр конъюгата CSK31 с БСА имеет скрытый пик в районе 1620 $см^{-1}$ – 1630 $см^{-1}$, который может быть обусловлен формированием межмолекулярной бета-структуры между отдельными конъюгированными пептидами, но не между большинством из них, как в растворе свободного SK30.

Спектры испускания флюоресценции SK30 и его конъюгата с БСА в 0,01М фосфатном буфере с pH=7,4 имеют максимум при одной и той же длине волны: 358 нм. Это говорит о преобладании вклада остатков триптофана из CSK31 в спектр флюоресценции конъюгата над вкладом двух остатков триптофана БСА, имеющих максимум флюоресценции при 336 нм. Тем не менее, соотношение между интенсивностью флюоресценции при 330 нм и 360 нм несколько сдвинуто в коротковолновую сторону для конъюгата: интенсивность флюоресценции при 330 нм составляет 69,87% от таковой при 360 нм для SK30, но 83,98% для конъюгата CSK31 с БСА. При этом вклад длинноволнового компонента (при 360 нм) линейно (R^2 = 0,9113) снижается по мере нагревания конъюгата: интенсивность флюоресценции при 330 нм составляет 81,91% от таковой при 360 нм при 20°C и 86,71% – при 50°C.

Как для SK30, так и для конъюгата CSK31 с БСА характерна остановка на кривой температурного тушения флюоресценции при высокой температуре (начиная с 40°C для SK30 и начиная с 45°C для конъюгата CSK31 с БСА). Такие

температурные остановки обычно возникают за счёт диссоциации олигомеров пептида. Если это так, то аналогичные контакты могут формироваться не только между мономерами SK30, но и между молекулами пептида CSK31, конъюгированными с БСА.

Спектры возбуждения флюоресценции SK30 и конъюгата CSK31 с БСА также отличаются высокой степенью сходства (рисунок 2). Положение основного максимума возбуждения, возникающего за счёт поглощения ароматической системой боковой цепи остатков триптофана, находится при 280 нм. Положение дополнительного максимума возбуждения в обоих случаях находится в районе 245 нм. Дополнительный максимум возникает за счёт поглощения света пептидными связями. Важно подчеркнуть, что обычно пептидная связь поглощает при 220 нм, а в молекуле SK30 положение максимума сдвинуто на 25 нм в длинноволновую область, что может быть свидетельством нахождения некоторых пептидных связей в возбуждённом состоянии, вероятно, за счёт образования водородной связи с ароматической системой расположенного рядом остатка триптофана или тирозина. При этом интенсивность дополнительного максимума на спектре возбуждения для конъюгата CSK31 с БСА достоверно ниже (52,87±2,03% от главного максимума), чем для пептида SK30 (67,74±2,17%), что связано с наличием остатков триптофана в самом БСА, которые в меньшей степени возбуждаются в результате переноса энергии от пептидных связей.

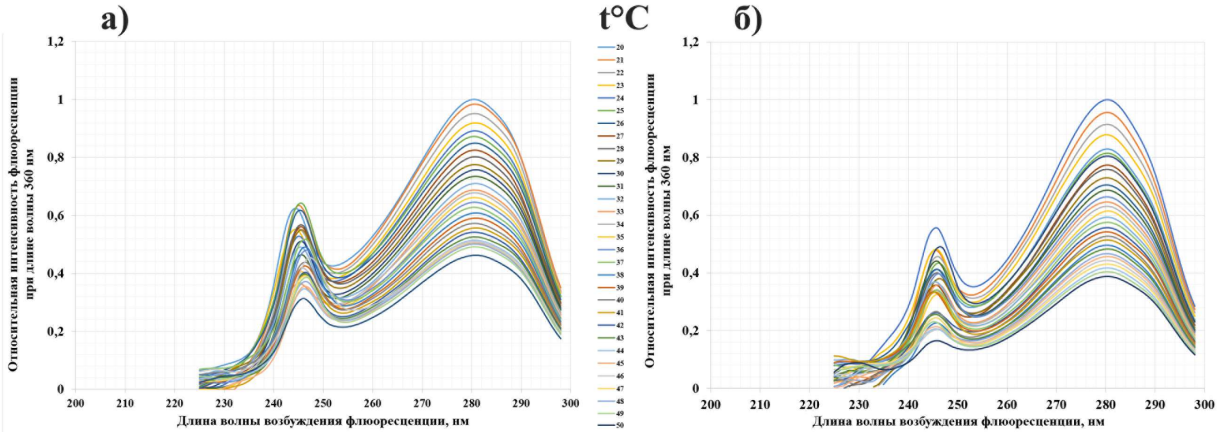


Рисунок 2 – Спектры возбуждения флюоресценции пептида SK30 в 0,01 М фосфатном буфере при pH=7,4 (а) и конъюгата CSK31 с БСА в том же буфере (б) по мере нагревания от 20°С до 50°С

Наиболее вероятная модель пептида SK30 была получена с помощью алгоритма C-QUARK [4], а модель октамера – с помощью белок-белкового докинга в программе HEX 8.0.0 [5]. В модели мономера пептида SK30 присутствуют две альфа-спирали и петля между ними, в которой имеется бета-мостик между остатком тирозина и триптофана.

Рисунок 3 – Модель октамера пептида SK30

Наиболее вероятной моделью октамера является такая (рисунок 3), в которой межмолекулярная бета-структура образуется между фрагментами петель, содержащими остатки, формирующие бета-мостик. В таком случае конъюгация пептида CSK31 через N-концевой остаток цистеина должна препятствовать формированию подобных контактов внутри одной молекулы конъюгата, но при этом остатки тирозина и триптофана будут по-прежнему находиться в бета-мостике, что не будет существенно влиять на их конформацию и, соответственно, на спектр возбуждения их флюоресценции. Конъюгат пептида CSK31 с БСА может быть использован в качестве антигена для выработки антител против парвовируса B19 наряду с пептидом SK30.

Выводы

1. Пептид SK30 в 0,01М фосфатном буфере с pH=7,4 образует как альфа-спирали, так и межмолекулярную бета-структуру.

2. Межмолекулярная бета-структура присутствует в олигомерах пептида весом от 10 кДа до 30 кДа, но отсутствует у димеров.

3. Конъюгация пептида CSK31 через SMCC с бычьим сывороточным альбумином препятствует образованию межмолекулярной бета-структуры.

4. Конформация полипептидной цепи CSK31 в районе флюорофоров (Tyr15 и Trp19) в составе конъюгата с бычьим сывороточным альбумином схожа с таковой для соответствующих аминокислотных остатков в составе олигомеров SK30.

Список литературы

1. Дизайн синтетического вакцинного пептида, соответствующего фосфолипазному домену капсидного белка парвовируса B19 / В.В. Хрусталёв, Т.А. Хрусталёва, В.В. Побойнев, А.Н. Стожаров, Н.В. Шалыго, Е.О. Самойлович, М.А. Ермолович, Г.В. Семейко // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск, 2021. – Вып. 14. – С. 157-163.

2. Молекулярное моделирование комплекса кардиолипина и домена капсидного белка парвовируса B19, обладающего фосфолипазной активностью / В.В. Хрусталёв, Т.А. Хрусталёва, В.В. Побойнев, А.Н. Стожаров, Н.В. Шалыго, Е.О. Самойлович, М.А. Ермолович, Г.В. Семейко // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. – Минск, 2021. – Вып. 14. – С. 164-170.

3. Sadat, A. Peak fitting applied to fourier transform infrared and Raman spectroscopic analysis of proteins / A. Sadat, I. J. Joye // Applied Sciences. – 2020. – № 5918. – P. 1–16.

4. Improving fragment-based ab initio protein structure assembly using low-accuracy contact-map predictions / S. M. Mortuz [et al.] // Nature Communications. – 2021. – Vol. 12. – N. 5011.

5. Protein docking using case-based reasoning / A. W. Ghoorah [et al.] // Proteins. – 2013. – Vol. 81. – P. 2150-2158.

АМИНОКИСЛОТНЫЕ СПЕКТРЫ ГЕПАТОПАНКРЕАСА ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ АНТИМЕТАБОЛИТОВ

Чиркин Александр Александрович
д.б.н., профессор, профессор кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
chir@tut.by
Балаева-Тихомирова Ольга Михайловна
к.б.н., доцент, заведующая кафедрой химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
olgabal.tih@gmail.com
Вишневская Мария Викторовна
лаборант кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
khim@vsu.by
Дорошенко Евгений Михайлович
к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ УО «Гродненский государственыйй медицинский университет», г. Гродно
dgi03@mail.ru

Целью исследования явилось изучение влияния антиметаболитов этионина, стрептозотоцина, актиномицина D и пуромицина на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков - прудовика (Lymnaea stagnalis L.) и роговой катушки (Planorbarius corneus L.). Установлено, что четыре антиметаболита вызвали одинаковый тип изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса у прудовиков и роговых катушек: повышение концентрации семи и снижение концентрации десяти незаменимых аминокислот. Видовые различия изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса включали меньшие изменения в связи с введением четырех антиметаболитов: у прудовиков повышены концентрации двух незаменимых, а у роговых катушек - одной незаменимой аминокислоты, а также снижение концентрации в гепатопанкреасе прудовиков пяти незаменимых, а у роговых катушек – двух незаменимых аминокислот. Легочные пресноводные моллюски могут быть модельными организмами для оценки спектров свободных аминокислот тканей, вызванных введением биологически активных субстанций.

Ключевые слова: *аминокислоты; легочные пресноводные моллюски; гепатопанкреас; антиметаболиты; модельные организмы.*

AMINO ACID SPECTRA OF THE HEPATOPANKREAS OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSCS UNDER THE ACTION OF SOME ANTIMETABOLITES

Chirkin Alexandr Alexsandrovich

Dr.B.Sc, Professor, Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
chir@tut.by
Balaeva-Tikhomirova Olga Michailovna
C.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of Chemistry and Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
olgabal.tih@gmail.com
Vishnevskaya Mariya Victorovna
laboratory assistant of the Department of Chemistry and Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
khim@vsu.by
Doroshenko Eugeniy Michailovich
C.B.Sc., Associate Professor, Leading Researcher, NRL Grodno State Medical University, Grodno
dgi03@mail.ru

The aim of the study was to study the effect of the antimetabolites ethionine, streptozotocin, actinomycin D, and puromycin on the free amino acid spectra of the hepatopancreas of the lung freshwater mollusks - pond snail (Lymnaea stagnalis L.) and horn coil (Planorbarius corneus L.). It was found that four antimetabolites caused the same type of changes in the amino acid spectra of the hepatopancreas in pond snails and horn coils: an increase in the concentration of seven and a decrease in the concentration of ten essential amino acids. Species differences in the changes in the amino acid spectra of the hepatopancreas included smaller changes due to the introduction of four antimetabolites: the concentrations of two essential amino acids were increased in pond snails, and one essential amino acid in the horn coils, as well as a decrease in the concentration of five essential amino acids in the hepatopancreas of pond snails, and two essential amino acids in the horn coils. Pulmonary freshwater mollusks can be model organisms for assessing the spectra of free amino acids in tissues caused by the introduction of biologically active substances.

Keywords: *amino acids; lung freshwater molluscs; hepatopancreas; antimetabolites; model organisms*

Проблема выбора модельных организмов для биохимических, молекулярно-биологических, биофармацевтических и биомедицинских целей становится все более острой из-за принятия многими странами регламентирующих документов, требующих снижения количества подопытных млекопитающих по этическим соображениям и введения мероприятий, уменьшающих страдания животных, введенных в эксперименты. Альтернативой млекопитающим животным могут быть простые организмы, например, легочные пресноводные моллюски прудовики (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговые катушки (*Planorbarius corneus* L.), широко распространенные в поверхностных водах

Беларуси. Они используются в различных областях биологии и экологии в качестве модельных и контрольных организмов. Поэтому проводятся исследования по оценке молекулярно-структурной гомологии важнейших белков между различными модельными организмами и человеком. В последние годы показан средний уровень гомологии протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков [1,2]. Целью исследования явилось изучение влияния антиметаболитов этионина, стрептозотоцина, актиномицина D и пуромицина на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков - прудовика (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговой катушки (*Planorbarius corneus* L.).

Материал и методы исследования.

В эксперименте на первом поколении лабораторной культуры легочных пресноводных моллюсков было исследовано действие четырех субстанций антиметаболитного действия на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса: этионин – антиметаболит метионина (введение в ногу в дозе 1 мг/г массы моллюска), стрептозотоцин – ингибитор инсулиноцитов (введение в ногу в дозе 65 мкг/г массы моллюска), актиномицин D – ингибитор ДНК-зависимой РНК-полимеразы (введение в ногу в концентрации 1мкг/мл на 1 г массы животного) и пуромицин – ингибитор элонгации полипептидной цепи (введение в ногу в концентрации 20 мкг/мл на 1 г массы моллюска) [3]. Содержание свободных аминокислот гепатопанкреаса изучали через 3, 12, 24 и 48 часов после введения антиметаболитов. Навески гепатопанкреаса гомогенизировали в соотношении 1:10 (по объёму) в среде, содержащей 0,2 М раствор хлорной кислоты, 40 мг/л ЭДТА, 40 мг/л $Na_2S_2O_5$, а также 0,2 мМ nVal (внутренний стандарт). Определение свободных аминокислот и их дериватов проводили в полученном экстракте методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции (338/445 нм). В работе использовали сорбент Zorbax Eclipse Plus C_{18} с размером частиц 3,5 мкм, размеры колонки 2,1×150 мм, с предколонкой 2,1×12,5 мм, заполненной таким же сорбентом с размером частиц 5 мкм. При всех определениях использовался прибор ВЭЖХ Agilent 1200. Прием данных и обработка хроматограмм проводились с помощью программы Agilent Open Lab CDSC.01.05 с ручной коррекцией базовой линии, в режиме расчета по внутреннему стандарту с использованием одноуровневой калибровки [4].

Полученный цифровой материал обработан методами параметрической вариационной статистики.

Полученные результаты и обсуждение.

Этионин является антиметаболитом и антагонистом метионина. Его введение вызывало повышение концентрации Asp, Glu, Arg, Met, Phe, Ile во все сроки наблюдения в гепатопанкреасе у обоих видов легочных пресноводных

моллюсков. В этот перечень вошли три незаменимых гидрофобных незаряженных аминокислоты – метионин, фенилаланин и изолейцин. В гепатопанкреасе прудовиков были повышены концентрации His, bAla, GABA, Trp, Leu, а у роговых катушек – Glu, Thr. Кроме того у прудовиков были снижены концентрации Gln, Ala, Val, тогда как у роговых катушек Ser, GABA, Tyr, Trp.

Стрептозотоцин представляет собой соединение глюкозамин - нитрозомочевина. Стрептозотоцин подобно глюкозе транспортируется в клетку с помощью транспортного белка глюкозы GLUT2, но не распознается другими переносчиками глюкозы. Это объясняет его относительную токсичность для инсулиноцитов, поскольку эти клетки имеют высокие уровни GLUT2. Независимо от вида легочных пресноводных моллюсков введение стрептозотоцина во все сроки наблюдения привело к повышению концентрации в гепатопанкреасе двух важных для метаболизма аминокислот: Asp и незаменимой аминокислоты Met. Одновременно было обнаружено снижение концентрации восьми аминокислот в гепатопанкреасе: Ser, His, Gly, Arg, Thr, Ile, Leu, Lis (последние четыре аминокислоты относятся к незаменимым). Видовые особенности спектров аминокислот гепатопанкреаса заключались в повышении концентрации Gln и bAla у прудовиков и Ala у роговых катушек, а также снижение концентрации трех незаменимых аминокислот Trp, Phe, Val и важной для азотистого и энегетического обменов заменимой аминокислоты Glu у прудовиков; у роговых катушек были понижены во всем периоде наблюдения концентрации GABA и Tyr.

Актиномицин D ингибирует ДНК-зависимый синтез РНК - важнейший этап синтеза белков – транскрипцию. У обоих видов легочных пресноводных моллюсков введение актиномицина D вызвало во все сроки наблюдения повышение концентрации в гепатопанкреасе двух незаменимых (Phe, Ile) и четырех заменимых аминокислот (Ser, His, Gly, GABA), а также снижение концентрации трех незаменимых аминокислот (Val, Met, Leu). Видовые различия включали повышение концентрации Gln, Arg, bAla и снижение концентрации Glu и Ala в гепатопанкреасе прудовиков. У роговых катушек введение актиномицина D вызвало повышение содержания Trp и снижение концентрации Lys, Asp, Tyr.

Пуромицин является ингибитором синтеза белков на уровне трансляции. Введение пуромицина вызвало у обоих видов легочных пресноводных моллюсков в гепатопанкреасе повышение содержания Trp, Asp и снижение концентрации Val, Ile, Lys, His, GABA. Видовые различия действия пуромицина на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса проявились в повышении концентрации Tyr и снижении концентрации bAla у прудовиков, но в повышении концентрации Gly, Arg, bAla, Ala, GABA и снижении концентрации Ser в гепатопанкреасе роговых катушек.

Таким образом, четыре антиметаболита вызвали одинаковый тип изменений спектров аминокислот гепатопанкреса у двух видов легочных пресноводных моллюсков: повышение концентрации 16 аминокислот, из которых 7 незаменимые, в том числе аспарагиновая кислота (этионин, стрептозотоцин и пуромицин), глицин (этионин, актиномицин D), метионин (этионин, стрептозотоцин), фенилаланин (этионин, актиномицин D), изолейцин (этионин, актиномицин D). Четыре антиметаболита вызвали также снижение концентрации 16 аминокислот, включая 10 незаменимых, в том числе валин (актиномицин D, пуромицин), изолейцин (стрептозотоцин, пуромицин), лейцин (стрептозотоцин, актиномицин D), лизин (стрептозотоцин, пуромицин) и гистидин (стрептозотоцин, пуромицин). Можно предположить, что общие изменения концентраций аминокислот гепатопанкреаса для обоих видов легочных пресноводных моллюсков могут служить объективным критерием антиметаболического действия каждой из четырех испытанных субстанций. Следует обратить внимание, что более половины аминокислот при этом относятся к незаменимым.

Видовые различия изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса включали меньшие изменения в связи с введением четырех антиметаболитов: у прудовиков повышены концентрации 11 аминокислот, включая две незаменимых, а у роговых катушек – 6 аминокислот, в том числе одна незаменимая; снижение концентрации аминокислот в гепатопанкреасе прудовиков включало 13 аминокислот, включая пять незаменимыз, а у роговых катушек – 10 аминокислот, в том числе две незаменимых. Эти данные могут использоваться для объяснения особенностей метаболических изменений в гепатопанкреасе моллюсков в связи с особенностями транспорта кислорода: у прудовиков медь-содержащим гемоцианином, а у роговых катушек железо-содержащим гемоглобином.

Заключение.

Четыре антиметаболита вызвали одинаковый тип изменений спектров аминокислот гепатопанкреса у двух видов легочных пресноводных моллюсков: повышение концентрации 7 и снижение концентрации 10 незаменимых аминокислот. Видовые различия изменений спектров аминокислот гепатопанкреаса включали меньшие изменения в связи с введением четырех антиметаболитов: у прудовиков повышены концентрации 2 незаменимых, а у роговых катушек – 1 незаменимой аминокеислоты, а также снижение концентрации в гепатопанкреасе прудовиков 5 незаменимых, а у роговых катушек – 2 незаменимых аминокислот. Таким образом, легочные пресноводные моллюски могут служить модельными организмами для оценки действия биологически активных субстанций антиметаболического действия на спектры свободных аминокислот гепатопанкреаса и, вероятно, окажутся полезными для доклинических биофармацевтических испытаний.

Список литературы

1. А.А. Чиркин, Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А.А. Чиркин [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хім. навук. – 2021. – Т. 57, №. 2. – С. 206-221.

2. А.А. Чиркин, Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов: монография / А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова. – Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022. – 124 с.

3. Клеточный цикл. Проблемы регуляции. Под. ред. О.И. Епифановой. – М.: Наука, 1973. – 193 с.

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

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗ-АНТИПРОТЕОЛИЗ НА МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКАХ

Чиркин Александр Александрович
д.б.н., профессор, профессор кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
chir@tut.by
Балаева-Тихомирова Ольга Михайловна
к.б.н., доцент, заведующая кафедрой химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
olgabal.tih@gmail.com
Долматова Виктория Викторовна
младший научный сотрудник кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
vika.dolmatova19@yandex.by
Вишневская Мария Викторовна
лаборант кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск
khim@vsu.by

Целью исследования явилось установление возможности использования легочных пресноводных моллюсков - прудовика (Lymnaea stagnalis L.) и роговая катушка (Planorbarius corneus L.) для изучения фармакодинамики этионина, стрептозотоцина, актиномицина D и пуромицина на активность трипсиноподобных протеиназ, антипротеазного ингибитора и α2-макроглобулина в гемолимфе и гепатопанкреасе. Установлено, что на все использованные в работе субстанции-антиметаболиты у легочных пресноводных моллюсков была выявлена однотипная реакция ферментов системы протеолиза-антипротеолиза – повышение активности трипсиноподобных протеаз и снижение активности антипротеазного ингибитора и α2-макроглобулина. Легочные пресноводные моллюски могут быть модельными организмами для оценки катаболических процессов, вызванных введением биологически активных субстанций, оказывающих повреждающее действие на биохимические процессы обмена глюкозы и процессы биосинтеза белков.

Ключевые слова: *протеолиз; антипротеолиз; антиметаболиты; модельные организмы.*

PHARMACODYNAMIC STUDIES OF THE PROTEOLIS-ANTIPROTEOLIS SYSTEM IN MODEL ANIMALS OF PULMONARY FRESHWATER MOLLUSCS

Chirkin Aleksander Aleksandrovich

Dr.B.Sc., Professor, Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
chir@tut.by
Balaeva-Tikhomirova Olga Michailovna
C.B.Sc., Associate Professor, Head of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
olgabal.tih@gmail.com
Dolmatova Victoria Victorovna
Junior Researcher, Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
vika.dolmatova19@yandex.by
Vishnevskaya Mariya Victorovna
Laboratory assistant of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk
khim@vsu.by

The aim of the study was to establish the possibility of using pulmonary freshwater mollusks - pond snail (Lymnaea stagnalis L.) and horn coil (Planorbarius corneus L.) to study the pharmacodynamics of ethionine, streptozotocin, actinomycin D and puromycin on the activity of trypsin-like proteinases, antiprotease inhibitor and α2-macroglobulin in hemolymph and hepatopancreas. It was found that all antimetabolite substances used in the work in lung freshwater molluscs showed the same type of reaction of enzymes of the proteolysis-antiproteolysis system - an increase in the activity of trypsin-like proteases and a decrease in the activity of the antiprotease inhibitor and α2-macroglobulin. Pulmonary freshwater mollusks can be model organisms for evaluating catabolic processes caused by the introduction of biologically active substances that have a damaging effect on the biochemical processes of glucose metabolism and protein biosynthesis.

Keywords: *proteolysis; antiproteolysis; antimetabolites; model organisms.*

Легочные пресноводные моллюски прудовики (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговые катушки (*Planorbarius corneus* L.) используются в различных областях биологии и медицины в качестве модельных организмов. В последние годы показан средний уровень гомологии протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков [1,2]. Целью настоящего исследования явилось установление возможности использования этих модельных организмов для изучения фармакодинамики некоторых биологически активных субстанций на ферменты системы протеолиза-антипротеолиза.

Материал и методы исследования.

Фармакодинамическое исследование проведено на первом поколении лабораторной культуры легочных пресноводных моллюсков. В работе использованы четыре биологически активных субстанции: этионин –

антиметаболит метионина (введение в ногу в дозе 1 мг/г массы моллюска), стрептозотоцин – ингибитор инсулиноцитов (введение в ногу в дозе 65 мкг/г массы моллюска), актиномицин D – ингибитор ДНК-зависимой РНК-полимеразы (введение в ногу в концентрации 1мкг/мл на 1 г массы животного) и пуромицин – ингибитор элонгации полипептидной цепи (введение в ногу в концентрации 20 мкг/мл на 1 г массы моллюска). Активность ферментов системы протеолиза-антипротеолиза изучали через 3, 12, 24 и 48 часов. Определение протеолитической активности в гемолимфе и ткани гепатопанкреаса проводили с использованием в качестве субстрата стабильного в растворе низкомолекулярного хромогенного соединения БАПНА (N-α-бензоил-D,L-аргинин-паранитроанилид) и выражали в ммоль/(л×с). Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА) и антипротеолитической активности (антипротеазный ингибитор – АПИ и α2-макроглобулин – α2-МГ) проводили с помощью ранее описанных методов [2]. В предварительных опытах было установлено оптимальное время инкубирования ферментативных реакций – 20 часов. В гемолимфе интактных легочных пресноводных моллюсков активность трипсиноподобных протеиназ находилась в пределах 10,3-13,5 ммоль/(л×с), а в ткани гепатопанкреаса – 26,4-80,6 ммоль/(кг×с). Для исследования антипротеолитической активности были выявлены оптимальные величины pH инкубационной среды, которые составили для АПИ pH 3,8, а для α2-МГ pH 3,0. Величины активности антипротеолитической активности ферментов у легочных пресноводных моллюсков были в гемолимфе АПИ 6,0-8,2 г/л, α2-МГ 7,3-10,2 г/л, а в гепатопанкреасе – АПИ – 5,9-6,4 г/л, α2-МГ – 5,96-10,3 г/л [2].

Полученные результаты и обсуждение.

Этионин является антиметаболитом и антагонистом метионина. Он предотвращает включение аминокислот в белки и препятствует использованию клетками аденозинтрифосфата (АТФ). Из-за этих фармакологических эффектов этионин очень токсичен и является сильнодействующим канцерогеном [3]. После введения этионина через 3 часа активность протеолиза в гемолимфе прудовика повышалась в гемолимфе в 1,6 раза, а в гемолимфе катушки роговой – в 3,4 раза по сравнению с контролем. Затем следовало ее снижение к 48 часам в 1,3 раза у прудовиков и в 2,1 раза у роговых катушек. В гепатопанкреасе прудовиков активность трипсиноподобных протеиназ изменялась волнообразно с двумя пиками активности через 3 часа в 12,5 раза и через 24 часа в 14,4 раза. В гепатопанкреасе роговых катушек этионин вызывал повышение активности трипсиноподобных протеиназ в интервале 3-24 часа в 3 раза по сравнению с контролем. В гемолимфе прудовиков было обнаружено снижение активности ингибиторов протеолиза в интервале 3-48 часов после введения этионина с максимальным снижением значений АПИ в 1,9 раза через 24 часа и α2-МГ в 1,37 раза через 12 часов. В гепатопанкреасе прудовиков активность ингибиторов

протеиназ после снижения повышалась с максимальными значениями через 48 часов после введения этионина (активность АПИ в 2,7 раза, а α2-МГ – в 5 раз). Аналогичные изменения величин ингибиторов протеиназ были выявлены после введения этионина в гемолимфе и гепатопанкреасе роговых катушек. Таким образом, выявлены следующие общие тренды в динамике активности трипсиноподобных протеиназ в гемолимфе и гепатопанкреасе после введения этионина: 1) активность трипсиноподобных протеиназ преимущественно повышается в гемолимфе и гепатопанкреасе в интервале 3-24 часа с тенденнцией к нормализации через 48 часов; 2) антипротеолитическая активность в гемолимфе снижается в интервале 3-24 часа с тенденцией к нормализации через 48 часов; 3) антипротеолитическая активность в гепатопанкреасе обоих видов моллюсков закономерно возрастает к 48 часам после введения этионина.

Стрептозотоцин представляет собой соединение глюкозамин - нитрозомочевина. Как и другие алкилирующие агенты из класса нитрозомочевины, он токсичен для клеток, вызывая повреждение ДНК, хотя другие механизмы также могут вносить свой вклад. Повреждение ДНК вызывает активацию PARP (поли АДФ-рибоза полимераза), что, вероятно, более важно для индукции диабета, чем само повреждение ДНК. Стрептозотоцин подобно глюкозе транспортируется в клетку с помощью транспортного белка глюкозы GLUT2, но не распознается другими переносчиками глюкозы. Это объясняет его относительную токсичность для бета-клеток, поскольку эти клетки имеют относительно высокие уровни GLUT2 [4]. После однократного введения стрептозотоцина наблюдались две фазы гипергликемии: первая в интервале 1-4 часа, вероятно, связана с уменьшением концентрации инсулина в плазме, а вторая (финальная, устойчивая) развивалась через 24-36 часов с лабораторными признаками диабета. В гемолимфе легочных пресноводных моллюсков протеолитическая активность после введения стрептозотоцина через 24 и 48 была достоверно выше контрольного уровня. При этом у прудовиков активность ферментов протеолиза увеличивалась в 1,5 раза на вторые сутки, а у роговых катушек активность ферментов протеолиза возрастала в 6 раз через 24 часа и в 7 раз через двое суток. В гепатопанкреасе введение стрептозотоцина привело к повышению трипсиноподобной активности у прудовиков в 4,7 раза, а у роговых катушек в 1,7 раза через 24 часа. Затем последовало уменьшение величин трипсиноподобной активности через 48 часов в 5,5 и 1,7 раза, соответственно. В гемолимфе обоих видов легочных пресноводных моллюсков после введения стрептозомицина через 1 и 2 суток активность антипротеолитических ферментов снижалась, а в гепатопанкреасе повышалась.

Актиномицин D ингибирует клеточную пролиферацию путём образования стабильного комплекса с ДНК и нарушения ДНК-зависимого синтеза РНК (транскрипции). Ранее считалось, что актиномицин интеркалирует в ДНК по стэкинговому типу. Это верно лишь при избытке субстанции. При малых

концентрациях (мкМ) антибиотик связывается с расплетенными участками, к которым имеет в 100 раз большее сродство, чем к двойной спирали [5]. После однократного введения актиномицина D активность трипсиноподобных протеиназ в гемолимфе прудовика повышалась дважды в 1,3 раза через 12 и 48 часов. В гемолимфе роговых катушек активность этих ферментов была повышена во все сроки наблюдения с максимумом в 4,8 раза через 48 часов. В гепатопанкреасе как прудовиков, так и роговых катушек наблюдалось повышение активности трипсиноподобных протеиназ с максимальными значениями через 48 часов, превышающими контроль в 5,6 раза у прудовиков и в 2,5 раза у роговых катушек. Антипротеолитическая активность закономерно снижалась на протяжении всего двухсуточного периода наблюдения у обоих видов легочных пресноводных моллюсков в 1,3-1,6 раза. Оценивая тренды изменений ферментов протеолиза и антипротеолиза у прудовиков и роговых катушек после введения актиномицина D, следует отметить отсутствие признаков нормализации активности протеолитических ферментов протеолиза и антипротеолиза через 48 часов наблюдения.

Пуромицин – антибиотик пуринового ряда, продуцируемый бактериями *Streptomyces alboniger*. Является ингибитором синтеза белков на уровне трансляции. По химическому строению пуромицин сходен с аминоацил-тРНК. Он взаимодействует с А-центром пептидил-тРНК с образованием пептидил-пуромицина. Последний не несет на себе триплета антикодона и таким образом тормозит элонгацию растущей пептидной цепи, вызывая преждевременную терминацию синтеза белка. Пуромицин оказывает одинаково эффективное ингибирующее действие на синтез белков как у прокариота, так и у эукариота [6]. После однократного введения пуромицина в гемолимфе прудовиков через 3 часа найдено снижение трипсиноподобной активности в 3,7 раза с последующим повышением, но не достигающим контрольных величин через 48 часов. У роговых катушек трипсиноподобная активность гемолимфы на протяжении первых суток наблюдения превышала контрольные значения в 1,5 раза. В гепатопанкреасе прудовиков наблюдалось повышение активности трипсиноподобных протеиназ на протяжении 48 часов (в 1,9 раза выше контрольных значений). В гепатопанкреасе роговых катушек также отмечаено повышение трипсиноподобных протеиназ (в 1,6 раза выше контрольных значений). Активность антипротеолитических ферментов в гемолимфе у прудовиков снижалась через 3 часа после введения пуромицина в 1,4 раза и затем постепенно повышалась к 48 часам наблюдения, но не достигала контрольных значений. Активность этих ферментов в гепатопанкреасе прудовиков снижалась в интервале 3-12 часов и затем сохранялась на пониженном уровне до 48 часов наблюдения. В гепатопанкреасе роговых катушек введение пуромицина вызвало снижение активности АПИ через 3 часа с последующим повышением активности к 48 часам наблюдения; активность α2-МГ постепенно снижалась во

все периоды наблюдения до минимального значения по сравнению с контролем в 1,3 раза через 48 часов.

Заключение.

Таким образом, легочные пресноводные моллюски оказались удобными модельными организмами для оценки катаболических процессов, вызванных введением биологически активных субстанций, оказывающих повреждающее действие на биохимические процессы обмена глюкозы и процессы биосинтеза белков. Установлено, что на все использованные в работе субстанции-антиметаболиты у легочных пресноводных моллюсков была выявлена однотипная реакция ферментов системы протеолиза-антипротеолиза – повышение активности трипсиноподобных протеаз и снижение активности антипротеазного ингибитора и α2-макроглобулина. Некоторые количественные различия в степени изменения активности протеолитических и антипротеолитических ферментов между двумя видами моллюсков, возможно, связаны с различиями у них механизмов транспорта кислорода в гемолимфе – у прудовиков медь содержащим гемоцианином, а у роговых катушек – железо содержащим гемоглобином. Эти отличия могут быть использованы при анализе протеасомного АТФ-зависимого пути деградации белков в клетках живых организмов. Легочные пресноводные моллюски по этическим соображениям, стоимости, удобству содержания, возможности доставки субстанции прямо к клеткам-мишеням из-за отсутствия сосудистых стенок превосходят модельные организмы млекопитающих. Эти организмы имеют тканевые аналоги большинства органов млекопитающих, что позволяет моделировать различные патологические процессы.

Список литературы

1. А.А. Чиркин, Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А.А. Чиркин [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хім. навук. - 2021. - Т. 57, №. 2. - С. 206-221.

2. А.А. Чиркин, Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов: монография / А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова. – Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022. – 124 с.

3. N. Shivapurkar, Hypomethylation of DNA in ethionine-fed rats / N.N. Shivapurkar, J, W. Mary, A. Lionel // Carcinogenesis. – 1984. – Vol. 5 (8). – P. 989–992.

4. T. Szkudelski, The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // Physiol. Res. – 2001. – Vol. 50 (6). – P. 537–546.

5. H.M. Sobell, (August 1985). Actinomycin and DNA transcription / H.M. Sobell // Proc. Nat. Acad. Sci. USAmerica. – 1985. – Vol. 82 (16). – P. 5328–5331.

6. S. Pestka, Inhibitors of ribosome functions / S.Pestka // Annu. Rev. Microbiol. – 1971. - Vol. 25. – P. 487–562.

УЛЬТРАСТРУКТУРА СИНАПСОВ И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СОМАТОСЕНСОРНОЙ ОБЛАСТИ НЕОКОРТЕКСА КРЫС В НЕОНАТАЛЬНЫЙ И ЮВЕНИЛНЫЙ ПЕРИОДЫ ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Шишко Тамара Тимофеевна
к.б.н., научный сотрудник, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН
Санкт-Петербург
tamarashishko46@gmail.com

Целью настоящей работы явилось изучение ультраструктуры синапсов и плотности их распределения в соматосенсорной области неокортекса у крыс в неонатальный и ювенильный периоды в норме и после воздействия острой перинатальной гипоксии. В работе был использован метод электронной микроскопии. Воздействие гипоксии на мозг осуществляли в течении 1 часа на 2-е постнатальные сутки в специальной камере с содержанием кислорода в дыхательной смеси равной 8%. Установлено, что после перинатальной гипоксии в соматосенсорной области неокортекса крыс происходит задержка формирования синаптических структур и уменьшение количества везикулярных синаптических пузырьков в пресинаптической области. Также отмечается уменьшение плотности распределения синапсов по сравнению с контролем, что может служить показателем снижения активности нейронов.

Ключевые слова: *синапс; неокортекс; перинатальная гипоксия; неонатальный период и ювенильный периоды.*

ULTRASTRUCTURE OF SYNAPSE AND THEIR DISTRIBUTION IN THE SOMATOSENSORY AREA OF THE RATS NEOCORTEX IN THE NEONATAL AND JUVENILE PERIODS AFTER PERINATAL HYPOXIA

Shishko Tamara Timofeevna
C.B.Sc., scientist I. P. Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg
tamarashishko46@gmail.com

The aim of this work was to study the ultrastructure of synapses and the density of their distribution in the somatosensory area of the neocortex in rats in the neonatal and juvenile periods in the norm and after exposure to acute perinatal hypoxia. The method of electron microscopy was used in the work. The effect of hypoxia on the brain was carried out for 1 hour on the 2nd postnatal day in a special chamber with an oxygen content in the respiratory mixture equal to 8%. It has been established that after perinatal hypoxia in the somatosensory area of the neocortex of rats, the formation of synaptic structures is delayed and the number of vesicular synaptic vesicles in the presynaptic area decreases. There is also a decrease in the distribution density of synapses compared to the control, which can serve as an indicator of a decrease in neuronal activity.

Keywords: *synapse; neocortex; perinatal hypoxia; neonatal and juvenile periods*.

Развитие головного мозга во время раннего постнатального периода и воздействие в это время перинатальной гипоксии, приводящей, как правило, к развитию нейральной патологии относятся к числу актуальных медицинских и социальных проблем. Синаптические контакты являются ключевыми структурными элементами, определяющими функциональное состояние центральной нервной системы. Морфологические характеристики синаптических терминалей, плотность их распределения в нейропиле могут служить важными нейроанатомическими параметрами, изменяющимися при развитии патологических процессов и нейропсихических заболеваний. Известно, что количество и размер синапических структур коррелируют с активностью высвобождения нейромедиаторов [1]. Плотность распределения синаптических контактов на телах пирамидных нейронов отражает функциональное состояние неокортекса. Так, их снижение в разных областях коры отмечается при нарушении когнитивных функций, психоэмоциональной сферы, тревожности, болезни Альцгеймера и шизофрении и т.д. [2].

Целью настоящей работы явилось изучение ультраструктуры синапсов и плотности их распределения в соматосенсорной области неокортекса у крыс в неонатальный и ювенильный периоды в норме и после воздействия острой перинатальной гипоксии.

Материал и методы исследования.

Исследование проведено на крысах линии Wistar, в работе использовались модели недоношенной беременности человека и энцефалопатии новорожденных. Воздействие гипоксии на мозг осуществляли в течении 1 часа на 2-е постнатальные сутки в специальной камере с содержанием кислорода в дыхательной смеси равной 8%. В работе изучали соматосенсорную область на 5, 10 и 20 (П5, П10 и П20) постнатальные сутки. Было использовано 2 группы животных: (1) контрольные животные (n=8 на каждый срок исследования); и (2) животные, подвергавшиеся воздействию гипоксии (n=8 на каждый срок исследования). Морфологический анализ состояния синаптических контактов проводили на 80-100 изображениях, полученных на каждый срок исследования как контрольных, так и экспериментальных животных. Для электронномикроскопического исследования фрагменты соматосенсорной области неокортекса крыс фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1М фосфатном буфере (ph 7,4) с добавлением сахарозы, дополнительно фиксировали 2% раствором тетроксида осмия и заключали в эпон. Готовили полутонкие срезы и ориентировали блок на III и IV слои, где присутствуют нормохромные пирамидные нейроны. Ультратонкие срезы получали на ультратоме ЛКВ-3, которые помещали на сетки и контрастировали 1,5%

раствором уранилацетата и цитратом свинца. Ультратонкие срезы анализировали под электронным микроскопом фирмы Tecnai G2Spirit (FEJ. Германия) при ускоренном напряжении 70кВ.

Результаты исследования.

В неонатальный период (на П5 и П10) в соматосенсорной области неокортекса крыс в пресинаптической части синапсов, как у контрольных, так и подопытных животных происходит постепенное увеличение количества синаптических пузырьков, не связанных с пресинаптической мембраной. Это может свидетельствовать о начале формирования синаптических контактов, однако, количество везикулярных пузырьков у этих групп животных отличается. У крыс, переживших перинатальную гипоксию, наблюдается появление лишь одиночных синаптических пузырьков, не связанных с пресинаптической мембраной. Было обнаружено, что к ювенильному возрасту (П20) имеет место процесс слияния синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной. У контрольных животных синаптические терминали заполнены большим количеством синаптческих пузырьков, где их значительная часть соприкасается и частично сливается с пресинаптической мембраной. На этом сроке развития впервые выявлено уплотнение постсинаптической мембраны, что указывает на завершение процесса созревания синаптических контактов.

У животных, подвергавшихся перинатальной гипоксии, в пресинаптической зоне присутствуют лишь одиночные синаптические пузырьки, соприкасающиеся или частично сливающиеся с пресинаптической мембраной, представляя менее зрелые синаптические структуры, по сравнению с контролем.

Наблюдения показали, что к концу неонатального периода (П10) в соматосенсорной области неокортекса у крыс воздействие перинатальной гипоксии приводит к уменьшению количества синаптических пузырьков, не связанных с пресинаптической мембраной, а также к сокращению количества пузырьков, связанных с пресинаптической мембраной, и уменьшению плотности распределения синапсов к ювенильному возрасту (П20). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что гипоксия на ранних сроках неонатального развития вызывает замедление созревания синаптических структур и задержку синаптогенеза в целом, а также может являться отражением нарушения созревания нейронов неокортекса.

Структурные нарушения синаптических контактов после воздействия повреждающих факторов были отмечены другими исследователями [3]. Эти отклонения выражались в замедлении формирования синаптических структур, уменьшении количества везикулярных синаптических пузырьков и снижении плотности распределения синаптических контактов, что являлось причиной изменения активности разных типов нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-015-00052/22.

Список литературы

1. N. Holderith, Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. / N. Holderith, A. Zorincz //Nature Neuroscience– 2012. – Vol.14, N6.-P.988-997

2. S.W. Scheff, Alzheimers disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. /S W.Scheff, D A.Price // Journal of Alzheimers disease: JAD (3Supl). –2006.–Vol.9,N3.-P.101-115

3. P.A. Janni, Ethanol inhibits development of dendrites and synapses in rat hippocampal pyramidal neuron cultures/ P A. Janni, T A Lindsley //Brain Res Dev Brain Res. -2000.- Vol.12, N2. -P.233-243

ЭФФЕКТ ЛУПАНОВОГО ТРИТЕРПЕНОИДА, БЕТУЛИНА, НА АКТИВНОСТЬ ПАРАОКСОНАЗЫ 1 СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У КРЫС

Шляхтун Алексей Генрихович
заведующий отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно,
shlyahtun@ibiochemistry.by
Сутько Ирина Петровна
к.б.н., старший научный сотрудник отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно,
irina_sutsko@list.ru
Радута Елена Францевна
старший научный сотрудник отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно,
e.raduta@ibiochemistry.by
Букша Екатерина Витальевна
младший научный сотрудник отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно,
kasper@ibiochemistry.by
Богдевич Евгений Валерьянович
инженер отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно,
hazi94@mail.ru

Целью работы была оценка влияния бетулина на активность параоксоназы 1 сыворотки крови при сахарном диабете 2 типа у крыс. В работе использованы методы экстракции для получения бетулина и спектрофотометрические методы для оценки активностей ферментов и определения концентрации метаболитов в тканях животных. Впервые показано, что бетулин увеличивает активность сывороточной параоксоназы у здоровых животных и при экспериментальном сахарном диабете 2 типа у крыс.

Ключевые слова: *бетулин; параоксоназа; сахарный диабет 2 типа*

THE EFFECT OF THE LUPAN TYPE TRITERPENOID, BETULIN, ON THE ACTIVITY OF SERUM PARAOXONASE 1 IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN RATS

Shlyahtun Alexej Genrihovich
head of the laboratory of biologically active compounds, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno,
shlyahtun@ibiochemistry.by

Sutsko Irina Petrovna,
C.B.Sc., Senior researcher, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno,
irina_sutsko@list.ru
Raduta Elena Francevna,
Senior researcher, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno,
e.raduta@ibiochemistry.by
Buksha Ekaterina Vitalievna,
Junior researcher, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno,
kasper@ibiochemistry.by
Bogdevich Evgeni Valerianovich,
Senior engineer, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno,
hazi94@mail.ru

The aim of the work was to evaluate the effect of betulin on the activity of serum paraoxonase 1 in type 2 diabetes mellitus in rats. The extraction methods were used to obtain betulin from outer layer of birch bark. Common spectrophotometric methods were used to assess the activity of the enzymes and determine the concentration of metabolites in the animal tissues. It has been shown that betulin significantly increases the activity of serum paraoxonase in healthy animals and rats with type 2 diabetes.

Keywords: *betulin; serum paraoxonase; paraoxonase 1; type 2 diabetes mellitus*

Одним из самых частых осложнений сахарного диабета как первого, так и второго типов (СД2) является атеросклероз – хроническое заболевание артерий, возникающее вследствие нарушения липидного обмена и сопровождающееся отложением холестерина и некоторых фракций липопротеидов в интиме сосудов. Манифестация атеросклероза при сахарном диабете проявляется микро- и макроангиопатими, начинающими каскад патологических изменений в органах и тканях. Через 15-20 лет после манифестации сахарного диабета микроангиопатии наблюдаются у всех больных СД2, а у 30 % из них наблюдаются гнойно-некротические осложнения.

В связи со способностью снижать проявления атерогенеза в последние годы интенсивно исследуется роль и функции сывороточного фермента параоксоназы 1 типа (К.Ф. 3.1.8.1, PON1) в патогенезе сердечно-сосудистой патологии. PON1 принадлежит к семейству арилдиалкилфосфатаз, которые являются Ca^{2+}-зависимыми ферментами и проявляют широкую субстратную специфичность к лактонам, липопероксидам и другим классам соединений. Установлено, что уровни белка PON1, параоксоназная, арилестеразная и

лактоназная активности в сыворотке значительно снижены при атеросклерозе, СД2, ожирении и других заболеваниях липидного и углеводного обменов [1].

Увеличение уровня активности PON1 может рассматриваться как один из способов защиты сосудов при развитии атеросклероза. В этой связи огромный интерес представляет поиск субстанций, обладающих активирующим действием на каталитическую активность PON1 и исследование ангиопротекторного действия этих соединений. Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния бетулина на активность параоксоназы 1 в сыворотке крови крыс при моделировании СД2.

Материалы и методы исследований. В работе использовали 4-нитрофенилацетат (Sigma N8130), O,O-диэтил-O-п-нитрофенилфосфат (Sigma D9286). Все прочие реактивы имели квалификацию не ниже, чем «хч». Буферные растворы готовили с использованием деионизированной воды, полученной на деионизаторе Merk Millipore Direct Q3 (США). Бетулин выделяли из коры *Betula pendula Roth.* как описано ранее [2].

Для исследования влияния бетулина на активность PON1 сыворотки крови при СД2 у крыс. использовали 80 крыс-самцов линии Wistar. Животные содержались в пластиковых клетках по 8 в каждой в комнате с контролируемым уровнем освещенности, температурой и влажностью. По 12 животных были использованы как контрольная группа и группа Бетулин. Эти экспериментальные группы содержались на стандартном рационе вивария. Оставшиеся животные использованы для моделирования СД2. Для этого крысы содержались на высокожировой диете (45 % калорий за счет животных жиров) на протяжении 10 недель, а через 2 и 4 недели животные получали внутрибрюшинные инъекции стрептозотоцина (STZ) в дозе 25 мг/кг/раз в виде раствора в Na-цитратном буфере, pH 4,4. У крыс еженедельно оценивали уровни гликемии при помощи тест-полосок и глюкометра Roche Diabets care Accu-Check Active (Германия) согласно инструкциям производителя. Через 2 недели после последнего введения STZ в крови животных определяли уровни глюкозы и отбирали животных с уровнем глюкозы не менее 12 ммоль/л. В тот же день проводили оральный глюкозотолерантный тест путем введения 40% раствора глюкозы в дозе 2 г/кг *per os*. После чего, проводили определение уровней глюкозы в крови животных в фоне (0мин, сразу после введения глюкозы), через 30, 60 и 120 мин. Полученные значения использовали для расчетов площадей под кривой «концентрация уровней глюкозы в крови – время». Экспериментальные группы формировали по значениям гликемии в качестве ведущего признака. Сформировали 3 дополнительные группы животных: СД2 + в/ж вода по 1мл/кг, начиная с 42 дня эксперимента; СД2 + в/ж суспензия бетулина в дозе 50 мг/кг/сут, начиная с 42 дня; СД2 + в/ж суспензия бетулина в дозе 100 мг/кг/сут, начиная с 42 дня эксперимента. Крысы соответствующих групп получали бетулин на протяжении 4 недель. Всего сформировано 5 групп: Контроль (12

животных), Бетулин (12), СД2 (12), СД2+Бетулин 50 мг/кг/сут (10), СД2+Бетулин 100 мг/кг/сут (10).

По окончанию эксперимента крыс эвтаназировали под эфирным наркозом. Определение концентраций гликированного гемоглобина (HbA1c) и инсулина в пробах сыворотки крови крыс проводилась с использованием ИФА-наборов реагентов Cusabio (КНР). Арилэстеразную активность PON1 в сыворотке крови определяли с использованием 4-нитрофенилацетата в качестве субстрата [3]. Параоксоназная активность PON1 в сыворотке крови определялась с использованием в качестве субстрата диэтил-п-нитрофенилфосфата [4]. При определении параоксоназной активности образцы сыворотки предварительно преинкубировали на протяжении 10 мин с раствором физостигмина (5 мкМ) для ингибирования холинэстераз.

Результаты исследования. Животные, содержавшиеся на высокожировой диете и получавшие инъекции STZ, через 6 недель от начала эксперимента проявляли признаки выраженного СД2. Наблюдалась выраженная гипергликемия (концентрация глюкозы в крови – 12,1±1,7 ммоль/л, n=22) и нарушение толерантности к глюкозе (увеличение площадей под кривой «концентрация уровней глюкозы– время» на 53,2 %, до 26,7±5,1 ммоль×ч/л).

Через 10 недель содержания в группе животных «СД2» препрандиальные уровни глюкозы повышались до 13,4±1,10 ммоль/л; свидетельством развития стойкой гипергликемии является увеличение уровней гликогемоглобина на 71,9 % по сравнению с контрольными животными (5,7±0,29 % *vs* 9,8±0,43 %, p <0,001). Подтверждением развития инсулинорезистентности у животных стало увеличение уровней инсулина в сыворотке крыс в 2,8 раза по сравнению с контрольными. Помимо нарушений углеводного обмена у диабетических животных отмечено развитие дислипидемии – значительно повышались уровни общего холестерола (на 73,8 %, 4,31±0,49 *vs* 7,49±0,75 ммоль/л, p <0,01) и триацилглицеролов (на 167,6 %, 0,71±0,05 *vs* 1,90±0,10 ммоль/л, p <0,01) по сравнению с контрольной группой.

Арилэстеразная и параоксоназная активности сыворотке крови крыс в группе СД2 были ниже, чем в контрольной группе животных на 52,4 % и 40,1 % соответственно (таблица). В целом полученные данные согласуются с данными литературы и могут свидетельствовать о развитии атеросклеротичесого повреждения сосудов [5].

Введение бетулина на протяжении 4 недель животным с СД2 приводило к значимому увеличению арилэстеразной и параоксоназной активностей в сыворотке крови крыс. При этом эффект был дозозависим – увеличение арилэстеразной активности сыворотки в группах животных, получавших бетулин в дозах 50 и 100 мг/кг/сут, происходило на 79,0 % и 114,8 %, а параоксоназной – на 55,0 % и 76,5 % соответственно, по сравнению с группой СД2.

Таблица 1 – Влияние введения бетулина на активность PON1 в сыворотке крови крыс с СД2

Показатели	Группы				
	Контроль	Бетулин	СД2	СД2+ Бетулин 50	СД2+ Бетулин 100
Арилэстеразная активность, мкмоль/мин/мл	82,2±3,2	96,5±5,2 [a]	39,1±3,2 [a]	70,0±4,1 [b]	84,0±2,6 [b]
Параоксоназная активность, нмоль/мин/мл	162,3±7,8	194,5±13,7[a]	97,14±10,8 [a]	150,6±11,4 [b]	171,5±7,1 [b]

Примечание – a – p <0,05 по отношению к контрольной группе, b – p <0,05 по отношению к группе СД2

Введение здоровым животным бетулина на протяжении 4 недель в дозе 100 мг/кг/сут также сопровождалось незначительным, на 15-20 %, повышением и арилэстеразной, и параоксоназной активностей по сравнению с контрольной группой животных. Наблюдаемый эффект позволил выдвинуть гипотезу о возможном прямом активирующем действии бетулина на активность PON1 в сыворотке, однако инкубирование сыворотки крови крыс *in vitro* с различными концентрациями бетулина (до 1 мкг/мл, в 3 раза выше физиологических [6]) не оказывало значимого влияния на активность фермента.

Выводы. Впервые показано, что бетулин дозозависимо увеличивает активность сывороточной параоксоназы у здоровых животных и при экспериментальном сахарном диабете 2 типа у крыс. Введение бетулина крысам с СД2 в дозах 50–100 мг/кг/сут на протяжении 4 недель приводило к увеличению активности PON1 в сыворотке до контрольных значений. Возможным объяснением наблюдаемого в эксперименте эффекта бетулина на активность сывороточной PON1 является усиление ее экспрессии, так как исследования *in vitro* не подтверждают прямого действия бетулина на активность PON1.

Список литературы

1. Paraoxonase-1 as a regulator of glucose and lipid homeostasis: impact on the onset and progression of metabolic disorders / M. J. Meneses [et al.] // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 20, Iss. 16. – Article ID: 4049. doi: 10.3390/ijms20164049.

2. Betulin/2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex: physicochemical characterization and hepatoprotective activity / V. Buko [et al.] // Journal of Molecular Liquids. – 2020. – Vol. 309. – Article ID: 113118. doi: 10.1016/j.molliq.2020.113118.

3. L. A Haagen, new automated method for phenotyping arylesterase (EC 3.1.1.2) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by

phenyl acetate / L. Haagen, A. Brock // Europ J Clin Chem Clinical Biochem. – 1992. – Vol. 30. – P. 391–395. doi: 10.1515/cclm.1992.30.7.391.

4. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase / C. E. Furlong [et al.] // Anal Biochem. – 1989. – Vol. 180. – P. 242–247. doi: 10.1016/0003-2697(89)90424-7.

5. The effect of grape seed extracts on serum paraoxonase activities in streptozotocin-induced diabetic rats / A. Kiyici [et al.] // J Med Food. – 2010. – Vol. 13, Iss. 3. – P. 725–728. doi: 10.1089/jmf.2009.0232.

6. S. A Jäger, preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba* cortex) / S. Jäger, M. N. Laszczyk, A. Scheffler // Molecules. – 2008. – Vol. 13, Iss. 12. – P. 3224–3235. doi: 10.3390/molecules13123224.

ВЛИЯНИЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ БИОСИНТЕЗА НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА НА АКТИВНОСТИ СИСТЕМ МЕТАБОЛИЗМА СПИРТОВ И АЛЬДЕГИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ТЯЖЕЛОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Шляхтун Алексей Генрихович
заведующий отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно
shlyahtun@ibiochemistry.by
Букша Екатерина Витальевна
младший научный сотрудник отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно
kasper@ibiochemistry.by
Богдевич Евгений Валерьянович
инженер отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно
hazi94@mail.ru
Радута Елена Францевна
старший научный сотрудник отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно
e.raduta@ibiochemistry.by
Сутько Ирина Петровна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник отраслевой лабораторией биологически активных веществ ГП «Институт биохимии НАН Беларуси», г. Гродно
irina_sutsko@list.ru

Целью работы была оценка влияния метаболических предшественников НАД – никотинамида, никотинамидрибозида и никотинамидмононуклеотида на активности систем метаболизма спиртов и альдегидов в печени крыс при моделировании тяжелой острой алкогольной интоксикации. В работе использованы методы синтетической химии для получения предшественников биосинтеза НАД и спектрофотометрические методы для оценки активностей ферментов. Впервые показано, что предшественники биосинтеза НАД предотвращают снижение активности основных ферментов окисления этанола и ацетальдегида при острой алкогольной интоксикации.

Ключевые слова: *Алкогольная интоксикация; никотинамид; никотинамидрибозид; никотинамидмононуклеотид; алкогольдегидрогеназа; альдегиддегидрогеназа*

PROPHYLACTIC ADMINISTRATION OF NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PRECURSORS PREVENTS THE ACTIVITY OF

ALCOHOL AND ALDEHYDE METABOLIZING ENZYMES IN THE RAT'S LIVER DECREASED BY ACUTE SEVERE ALCOHOL INTOXICATION

Shlyahtun Alexej Genrihovich
head of the laboratory of biologically active compounds, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno
shlyahtun@ibiochemistry.by
Buksha Ekaterina Vitalievna
Junior researcher, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno
kasper@ibiochemistry.by
Bogdevich Evgeni Valerianovich
Senior engineer, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno
hazi94@mail.ru
Raduta Elena Francevna
Senior researcher, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno
e.raduta@ibiochemistry.by
Irina Sutsko
C.B.Sc., Senior researcher, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno
irina_sutsko@list.ru

The aim of the work was to evaluate the effect of metabolic precursors of nicotinamide adenine dinucleotide, namely, nicotinamide, nicotinamide riboside, and nicotinamide mononucleotide on the activity of alcohol and aldehyde metabolizing enzymes in the liver of rats during acute alcohol poisoning. Methods of synthetic chemistry were used to obtain nicotinamide riboside and nicotinamide mononucleotide. Spectrophotometric techniques were used to investigate the activity of alcohol and acetaldehyde metabolizing enzymes. It was shown that nicotinamide riboside and nicotinamide mononucleotide prevent a decrease in the activity of the main enzymes of ethanol and acetaldehyde oxidation during acute alcohol intoxication.

Keywords: *alcohol intoxication; nicotinamide; nicotinamide riboside; nicotinamide mononucleotide; alcohol dehydrogenase; aldehyde dehydrogenase*

Метаболизм этанола и ацетальдегида в гепатоцитах сопровождается активной наработкой восстановленной формы никотинамиддинуклеотида (НАДН) и дефицитом окисленной формы кофермента. Внутриклеточный дисбаланс НАД/НАДН оказывает глубокое влияние на основные метаболические пути, которые требуют окисленной формы кофермента или ингибируются НАДН, в частности подавляется ряд ключевых ферментов

гликолиза, цикла лимонной кислоты, пируватдегидрогеназая реакция, β-окисление жирных кислот и др., в том числе, и системы метаболизма этанола и ацетальдегида.

В качестве способа устранения дисбаланса НАД/НАДН при алкогольной интоксикации нами предложено использовать метаболические предшественники для его синтеза в гепатоцитах *de novo*. В качестве предшественников биосинтеза НАД изучены никотинамид (НА), никотинамидрибозид (НР) и никотинамидмононуклеотид (НМН). Литературные данные о том, что НР и НМН исследовались при алкогольной интоксикации, отсутствуют.

Цель работы заключалась в оценке влияния профилактического введения предшественников биосинтеза никотинамидадениндинуклеотида на активности систем метаболизма спиртов и альдегидов в печени крыс при тяжелой алкогольной интоксикации

Материалы и методы. В работе использовали реактивы квалификации не ниже «хч». Для моделирования алкогольной интоксикации использован этиловый спирт марки «Люкс». Все буферные растворы готовили на деионизированной воде, полученной на системе водоподготовки Hydrolab Ultra (Польша). При пробоподготовке использовалась центрифуга Heraeus Biofuge Pico (США) с охлаждаемым ротором (4ºС). Спектрофотометрирование проб проводилось в лунках стандартных 96-луночных планшетов в 2 повторностях на BMG Spectrostar Nano (Германия) и Thermo Scientific Multiscan Sky (США).

Для синтеза НР использовали метод Haynes с соавт., заключающийся в гликозилировании НА при помощи 2,3,5-три-О-ацетил-D-рибофуранозилхлорида в НР [1]. Для синтеза НМН использовали метод Visscher и Schwartz [2] в модификации Liu [3], заключающийся в частичном гидролизе β-НАД. Полученные НР и НМН исследовали хроматографически для подтверждения чистоты продукта (НР – 98,2 % и НМН – 96,8 %) и методами ИК-Фурье-спектроскопии для подтверждения подлинности.

Исследование действия предшественников НАД на активности систем метаболизма спиртов и альдегидов проведено на самцах крыс линии Wistar массой 180–220 г. Животные были разделены на 5 экспериментальных групп по 10 особей в каждой. Соединения вводились животным профилактически, за 2 часа до введения этанола, остро, разово, в дозах 4,1 ммоль/кг, что эквивалентно 500 мг/кг НА. Препараты вводились внутрижелудочно в виде взвеси в 2 % крахмале. Тяжелую острую алкогольную интоксикацию (АИ) у крыс вызывали внутрибрюшинным однократным введением раствора этанола в дозе 10 г/кг. Контрольная группа животных получала вместо препарата 2 % раствор крахмала, а вместо этанола эквиобъемные количества физиологического раствора хлорида натрия. Через 2 часа после введения этанола животные были эвтаназированы путем декапитации. Печень выделяли без перфузии на льду (0–4 ºС). Ткани в течение 3 мин после эвтаназии замораживали в жидком азоте.

Образцы хранились при –82 °С до исследования. Биохимические исследования ткани печени проводили в 10ь % гомогенатах, которые готовили на 1,15 % растворе KCl, содержащем 50 мМ Трис-HCl, pH 7,4. Активность алкогольдегидрогеназы (АДГ) в ткани печени оценивали по методу Nakajima и соавт. в нашей модификации [4]. Активность альдегиддегидрогеназы (АльДГ) определялась по методу Tottmar с соавт. [5] в митохондриальной (активность АльДГ с низкой Км) и постмитохондриальной фракциях (активность АльДГ с высокой Км). Активности АДГ и АльДГ выражали в нмоль НАДН/мин/мг белка. Активность каталазы, фермента минорного пути окисления этанола, определяли по методу Hadwan [6], и выражали в ед/мин/мг белка. Концентрацию белка в пробах определяли по метолу Bradford [7]. При работе с животными соблюдались этические нормы, принятые в международной практике биомедицинских исследований.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием GraphPad Prism v.8.1. Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для выявления значимости отличий между группами использовали дисперсионный анализ и тест средневзвешенного Тьюки. Различия считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 %. Данные в таблицах представлены в виде M ± m, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего.

Результаты исследований. Известно, что основная часть употребляемого этанола метаболизируется в печени до ацетальдегида тремя ферментными системами – АДГ (более 90-95 % экзогенного алкоголя), микросомальной этанол-окисляющей системой (до 10 %) и каталазой (2-3 %). Окисление ацетальдегида – основного метаболита этанола, до ацетата, сопровождается значительной наработкой НАДН, как в цитозоле, так и в митохондриях гепатоцитов, так как АльДГ с низкой Км к ацетальдегиду локализована внутримитохондриально. Накопление в митохондриях НАДН при окислении ацетальдегида снижает активность цитратсинтазы, оксоглутаратдегидрогеназы и др. ферментов, снижает продукцию АТФ и нарушает процессы митохондриального дыхания, кроме того, индуцирует наработку активных форм кислорода.

В случае чрезмерного употребления алкоголя или при алкогольном отравлении накопление НАДН в гепатоцитах приводит к снижению активности систем окисления этанола, накоплению ацетальдегида, который на порядок более токсичен, чем этанол.

Установлено, что АИ сопровождалась снижением активности АДГ в печени на 33,0 % по сравнению с контрольной группой, активность АльДГ с высокой Км к ацетальдегиду у животных практически не изменялась, в то же время активность АльДГ с низкой Км к ацетальдегиду (митохондриальной) у животных была ниже почти в 2 раза, чем у контрольных животных (таблица).

Таблица 1 – Влияние предшественников биосинтеза НАД на активности ферментов метаболизма спиртов и альдегидов в печени крыс при АИ

Группы	Активность АДГ	Активность АльДГ		Активность каталазы
		С высокой Км	С низкой Км	
Контроль	6,47±0,40	7,80±1,20	9,64±1,21	165,2±11,3
АИ	4,33±0,24[a]	6,62±1,20	4,91±1,22[a]	158,3±10,1
НА+АИ	4,26±0,53[a]	7,82±1,12	5,31±1,20[a]	170,6±9,38
НР+АИ	6,61±0,52[b]	7,62±1,23	7,28±0,98	171,6±10,1
НМН+АИ	6,56±0,33[b]	7,31±0,82	9,70±0,84	172,5±10,2

* Примечание – a – p <0,05 по отношению к контрольной группе, b – p <0,05 по отношению к группе АИ.

В группах крыс, получавших НР и НМН до алкогольной интоксикации, активности АДГ сохранялись на уровне контрольной группы. У животных, получавших НА активность АДГ находилась на уровне группы «АИ». Предварительное введение животным НР сопровождалось увеличением активностей митохондриальной АльДГ из печени крыс на 48 %, по сравнению с группой ТАИ, однако не достигало контрольных величин. Активность митохондриальной альдегиддегидрогеназы в печени крыс под влиянием предварительного введения НМН оставалась на уровне контрольных значений (таблица). Активность каталазы в ткани печени при АИ не изменялась, в том числе под влиянием вводимых субстанций.

Полученные данные указывают на защитное действие предшественников биосинтеза НАД на системы метаболизма этанола и ацетальдегида у крыс при острой алкоголизации. Наиболее эффективными протекторами в этом отношении в условиях эксперимента выступили НР и НМН, в то время как НА не оказывал значимого действия на активности АДГ и АльДГ.

Список литературы

1. Codehydrogenases. Part II. A synthesis of nicotinarnide nucleotide / L. J. Haynes [et al.] // J. Chem. Soc. – 1957. – P. 3727–3732. doi: 10.1039/JR9570003727.

2. J. Visscher, Selective cleavage of pyrophosphate linkages / J. Visscher, A. W. Schwartz // Nucleic Acids Res. – 1992. – Vol. 20, Iss. 21. – P. 5749–5752. doi: 10.1093/nar/20.21.5749.

3. R. Liu, A novel preparation of nicotinamide mononucleotide / R. Liu, J. Visscher // Nucleosides Nucleotides. – 1994. – Vol. 13, Iss. 5. – P. 1215–1216. doi: 10.1080/15257779408011891.

4. Активность систем метаболизма спиртов и альдегидов печени крыс при тяжелой алкогольной интоксикации и коррекции комбинацией сукцината

натрия, ацетилцистеина и ресвератрола / А. Г. Шляхтун [и др.] // Веснік ГрДУ імя Я. Купалы. Сер. 5. – 2021. – Т. 11. – № 3. – С. 126–132.

5. O. Tottmar, The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenase in rat liver / O. Tottmar, H. Pettersson, K. H. Kiessling // Biochem. J. – 1973. – Vol. 135. – P. 577–586. doi: 10.1042/bj1350577a.

6. M. H. Hadwan, Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissue / M. H. Hadwan // BMC Biochem. – 2018. – Vol. 19, Iss. 1. – Article ID: 7. doi: 10.1186/s12858-018-0097-5.

7. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

ПЕРСПЕКТИВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДЕКСОВ ВОСПАЛЕНИЯ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ В ДИАГНОСТИКЕ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Шпаковский Александр Юрьевич
студент 3 курса лечебного факультета Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
shpakovskiy@mail.ru
Мурашко Дарья Игоревна
аспирант кафедры биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
dashamurashka@mail.ru
Таганович Анатолий Дмитриевич
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
taganovich@bsmu.by

Определить целесообразность использования отношений нейтрофилов к лимфоцитам (NEUT/LYMPH), лимфоцитов к моноцитам (LYMPH/MONO), тромбоцитов к лимфоцитам (PLT/LYMPH) и С-реактивного белка к альбуминам (CRP/ALB) в оценке распространенности немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ). Материалы и методы. Определение концентрации С-реактивного белка и концентрации альбуминов в сыворотке крови 89 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМКРЛ) проводили в биохимическом анализаторе AU680 (Beckman Coulter, США). Анализ клеточного состава крови выполнен на гематанализаторе SysmexXE-5000 (SysmexGroup, Япония). Результаты. Показатели LYMPH/MONO, PLT/LYMPH, CRP/ALB у пациентов с I-II стадией НМКРЛ отличаются от здоровых людей. CRP/ALB существенно возрастает у пациентов с поздними стадиями НМКРЛ по сравнению с ранними. LYMPH/MONO, напротив, снижается по мере увеличения распространенности опухоли.

Ключевые слова: *индексы воспаления, немелкоклеточный рак легкого.*

PROSPECTS FOR DETERMINATION OF INFLAMMATORY INDICES IN THE BLOOD OF PATIENTS IN THE DIAGNOSIS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Shpakovskiy Alexander Yurievich
3d year student of the faculty of general medicine, Belarusian State Medical University, Minsk
shpakovskiy@mail.ru
Murashka Darya Iharayna,
Aspirant of the department of biological chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk

dashamurashka@mail.ru
Tahanovich Anatoly Dmitrievich
Dr.M.Sc., professor, head of the department of biological chemistry,
Belarusian State Medical University, Minsk
taganovich@bsmu.by

Target. To determine the appropriateness of using the ratios of neutrophils to lymphocytes (NEUT/LYMPH), lymphocytes to monocytes (LYMPH/MONO), platelets to lymphocytes (PLT/LYMPH) and C-reactive protein to albumin (CRP/ALB) in assessing the prevalence of non-small cell lung cancer (NSCLC) Materials and methods. Determination of the concentration of C-reactive protein and the concentration of albumin in the blood serum of 89 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) was carried out in a biochemical analyzer AU680 (Beckman Coulter, USA). Analysis of the cellular composition of the blood was performed on a SysmexXE-5000 hemoanalyzer (SysmexGroup, Japan).

Results. Indicators of LYMPH/MONO, PLT/LYMPH, CRP/ALB in patients with stage I-II NSCLC differ from healthy people. CRP/ALB is significantly increased in patients with advanced NSCLC compared to early stages. LYMPH/MONO, on the other hand, decreases as the extent of the tumor increases.

Keywords: *indices of inflammation, non-small cell lung cancer.*

В структуре заболеваемости раком легкого большую часть занимает немелкоклеточный рак (НМКРЛ) [1]. Существует потребность в поиске доступных и информативных биомаркеров НМКРЛ. В последние годы изучаются перспективы использования неспецифических индексов воспаления в оценке распространенности злокачественных новообразований, в том числе, НМКРЛ [2, 3].

Материалы и методы: Материалами для исследования послужила кровь 89 пациентов с НМКРЛ при поступлении их в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период 2019-2021 гг. В качестве группы контроля обследованы 30 человек без онкологической патологии.

Определение концентрации С-реактивного белка и концентрации альбуминов в сыворотке крови проводили в биохимическом анализаторе AU680 (Beckman Coulter, США). Анализ клеточного состава крови выполнен на гемanализаторе SysmexXE-5000 (SysmexGroup, Япония). Были рассчитаны отношения нейтрофилов к лимфоцитам, лимфоцитов к моноцитам, тромбоцитов к лимфоцитам, С-реактивного белка (CRP) к альбуминам (ALB).

Статистическая обработка полученных данных производилась в программе IBM SPSS Statistics 23 (США). Поскольку распределение значений показателей в исследуемых выборках не соответствовало Гауссовому, использовались методы непараметрической статистики. Рассчитывались

медиана и интерквартильный размах (25%-75%) для каждой выборки. Для оценки различия между сравниваемыми группами использовались непараметрические критерии H Краскелла-Уоллиса (уровень значимости – 0,05) и U Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Силу взаимосвязи между показателями и характеристиками опухоли оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (R).

Результаты.

Отношение нейтрофилов к лимфоцитам периферической крови (NEUT / LYMPH) у пациентов с I и II стадиями НМКРЛ существенно не отличалось от здоровых людей (таблица 1). При III-IV стадиях заболевания его значения увеличивались и были выше, чем в контрольной группе и у пациентов с I-II стадиями заболевания. Отношения тромбоцитов к лимфоцитам периферической крови у пациентов с I-II стадией заболевания была ниже, чем в группе контроля, однако при III-IV его стадиях вновь возрастала. Отношение лимфоцитов к моноцитам (LYMPH / MONO) снижалось по сравнению со здоровыми людьми уже при I-II стадиях НМКРЛ и было еще ниже при III и IV его стадиях. Отношение С-реактивного белка к альбуминам (CRP / ALB), напротив, демонстрировало существенный рост уже при I-II стадиях НМКРЛ и еще больше возрастало при III-IV его стадиях.

Результаты корреляционного анализа подтверждают наличие отрицательной (у LYMPH / MONO) и положительной (у CRP / ALB) связи средней силы между соответствующими воспалительными индексами и стадиями НМКРЛ.

Таблица 1 – Значения воспалительных индексов у пациентов с НМКРЛ

Показатель	Здоровые	I-II стадии	III-IV стадии	R
NEUT / LYMPH	1,64 [1,38; 2,3]	1,89 [1,308; 2,28]	2,28[1,2] [1,535; 3,298]	0,239
LYMPH / MONO	4,43 [3,79; 5,05]	3,4[1] [2,62; 4,55]	2,64[1,2] [2,1; 3,75]	-0,343
PLT / LYMPH	140,8 [111,0; 152,8]	100,5[1] [83,1; 132,0]	140,7[2] [106,2; 187,5]	-
CRP / ALB	0,002 [0,0012; 0,0034]	0,01[1] [0,003; 0,02]	0,03[1,2] [0,001; 0,08]	0,419

Примечание. [1] – статистически значимая разница по сравнению со здоровыми людьми;[2] – статистически значимая разница по сравнению с I-II стадиями НМКРЛ; R – коэффициент корреляции Спирмена.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют, что некоторые воспалительные индексы (LYMPH / MONO, CRP / ALB) существенно изменяются по сравнению со здоровыми людьми уже при ранних стадиях

НМКРЛ и еще больше – в поздний период заболевания. Перспективой для дальнейших исследований является анализ диагностических параметров вышеназванных показателей с тем, чтобы оценить целесообразность их определения в крови пациентов с целью уточнения распространенности НМКРЛ.

Список литературы

1. H. Sung, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung [et al.] // CA Cancer j. clin. – 2021. – Vol.71, №3 – P. 209-249.

2. B. Akinci Ozyurek, Prognostic Value of the Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) in Lung Cancer Cases / B. Akinci Ozyurek // Asian Pac J Cancer Prev. – 2017. – Vol. 18, №5. – P. 1417-1421.

3. J.U. Lim, Elevated pretreatment platelet-to-lymphocyte ratio is associated with poor survival in stage IV non-small cell lung cancer with malignant pleural effusion / J. U Lim // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9: 4721.

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЭЛЕКТРОФИЛЬНЫЕ ФРАГМЕНТЫ, ДЛЯ НОВЫХ БЕЛКОВЫХ МЕТОК

Яковец Полина Сергеевна
ассистент, стажер м.н.с., БГУ, химический факультет, Минск
yakov.polina.42@gmail.com
Фалетров Ярослав Вячеславович
к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник, НИИ ФХП БГУ, Минск
yaroslav82@tut.by
Шкуматов Владимир Макарович
д.б.н., профессор, заведующий лабораторией, НИИ ФХП БГУ, Минск
biopharm@bsu.by

Целью данной работы являлся дизайн и синтез структур на основе галогенпроизводных анилина, дополнительно содержащих электрофильные фрагменты, позволяющие модифицировать белки по функциональным аминокислотам, что потенциально может использоваться для изучения структуры и функций белков [1], в протеомике и дизайне ковалентных ингибиторов [2]. Биоортогональные атомы галогенов в составе молекул могут упростить анализ с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения, ЯМР ^{19}F и $^{79}Br/^{81}Br$ [3], рентгеноструктурных исследований [4], а введение флуорофорной 7-нитробензоксадиазольной группы позволяет проводить биологические исследования с использованием флуоресценции в качестве аналитического сигнала. Для дополнительного анализа потенциала синтезированных соединений в качестве новых лекарств или флуоресцентных зондов, претендующих на использование in vivo, была проведена первичная оценка биологических свойств на клетках дрожжей и исследовано взаимодействие соединений с бычьим сывороточным альбумином методом спектрофлуориметрического титрования.

Ключевые слова: *галогензамещенные анилины; биоортогональные электрофильные фрагменты; NBD; флуоресценция; дрожжи; бычий сывороточный альбумин; спектрофлуориметрическое титрование.*

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF COMPOUNDS CONTAINING ELECTROPHILIC FRAGMENTS FOR NEW PROTEIN LABELS

Yakovets Polina Sergeevna
assistant, junior research fellow, BSU, Chemistry Department, Minsk
yakov.polina.42@gmail.com
Faletrov Yaroslav Vycheslavovich
C.Ch.Sc., associate professor, lead researcher, Research Institute for Physical Chemical Problems of the BSU, Minsk

yaroslav82@tut.by
Shkumatov Vladimir Makarov
C.B.Sc., professor, head of the laboratory, Research Institute for Physical Chemical Problems of the BSU, Minsk
biopharm@bsu.by

The aim of this work was the design and synthesis of structures based on aniline halogen derivatives, additionally containing electrophilic fragments, which make it possible to modify proteins according to functional amino acids, which can potentially be used to study the structure and functions of proteins [1], in proteomics, and in the design of covalent inhibitors [2]. Bioorthogonal halogen atoms in molecules can simplify analysis using high-resolution mass spectrometry, ^{19}F and $^{79}Br/^{81}Br$ NMR [3], X-ray diffraction studies [4], and the introduction of a fluorophore 7-nitrobenzoxadiazole group makes it possible to conduct biological studies using fluorescence as an analytical signal. In order to further analyze the potential of the synthesized compounds as new drugs or fluorescent probes that can be used in vivo, an initial assessment of the biological properties was carried out using yeast cells and the interaction of the compounds with bovine serum albumin was studied by spectrofluorimetric titration.

Keywords: *halogenated anilines; bioorthogonal electrophilic fragments; NBD; fluorescence; yeast; bovine serum albumin, spectrofluorimetric titration.*

Скрининг на основе фрагментов (FBDD – Fragment-based drug discovery) является одним из эффективных подходов поиска новых лекарственных веществ. При таком методе структура целевых молекул воссоздается путем комбинации отдельных фрагментов с учетом сайтов и аффинности их связывания с белком-рецептором.

С целью синтеза и *in vitro* оценки биологических свойств нами были составлены следующие структуры соединений, содержащие электрофильный фрагмент -CH_2-Br, способный селективно реагировать с тиолами (рисунок 1).

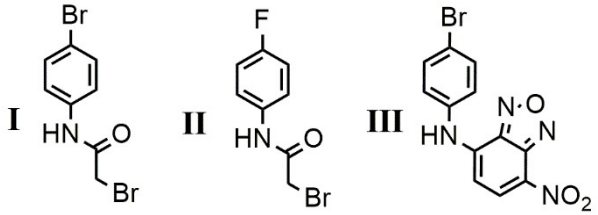


Рисунок 1 – Структуры целевых соединений.

Кратко: для синтеза 2-бром-N-(4-бромфенил) ацетамида (I) и 2-бром-N-(4-фторфенил) ацетамида (II) навеску 4-броманилина или 4-фторанилина растворяли в ацетонитриле, содержащем дополнительно триэтиламин. В полученный раствор при перемешивании на ледяной бане из изопропанола, замороженного жидким азотом, добавляли по каплям раствор

бромацетилбромида в ацетонитриле. Реакционную смесь перемешивали на протяжении 1 часа. Полноту превращения оценивали по ТСХ. Продукт очищали колоночной хроматографией (элюировали сначала бензолом, по мере приближения целевой фракции к выходу из колонки элюировали хлороформом). Выход составил 69% для соединения I и 63% для II. Структуры соединений I и II подтверждены с помощью ^{1}H-ЯМР и частично с помощью масс-спектрометрии. ^{1}H ЯМР 5–10 %-ных растворов синтезированных соединений в диметилсульфоксиде (DMSO-d6) проводили на приборе Bruker Avance-500 (Германия) с рабочей частотой 500 МГц. Химические сдвиги измеряли по шкале δ сигнала остаточных протонов в DMSO (δ = 2.50 м.д.). Соединение I: ^{1}H NMR: δ = 10.52 (s, 1H, NH), 7.57 – 7.54 (m, 2H, 2CH-benzene), 7.53 – 7.50 (m, 2H, 2CH-benzene), 4.03 (s, 2H, CH_2); ESI-MS: m/z $[M]^+$ теор. для $C_8H_7Br_2NO$: 291+293+295, найдено: 291+293. Соединение II: ^{1}H NMR: δ = 10.45 (s, 1H, NH), 7.62 – 7.58 (m, 2H, 2CH-benzene), 7.19 – 7.15 (m, 2H, CH, 2CH-benzene), 4.03 (s, 2H, CH_2).

Для синтеза N-(4-бромфенил)-7-нитробензофуразан-4-амина (III) к 4-броманилину и гидрокарбонату натрия, растворенным в метаноле, добавляли по каплям при перемешивании раствор NBD-Cl в ацетонитриле. Полученную смесь выдерживали 1 час. Выход составил 71%.

Для микробиологического исследования были подготовлены растворы полученных соединений с концентрацией 3 мМ.

В работе использовали дрожжи *Yarrowia lipolytica.* Дрожжи выращивали при 30 °С со встряхиванием 200 об/мин. на стандартной среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% петона и 2% глюкозы) в течение 24 часов в микробиологических планшетах на 24 лунки. В свежевыращенную суспензию одного из штаммов дрожжей по каплям добавляли воду до плотности $1*10^7$ клеток/мл.

Для исследования влияния 2-бром-N-(4-бромфенил) ацетамида (I), 2-бром-N-(4-фторфенил) ацетамида (II) и N-(4-бромфенил)-7-нитробензофуразан-4-амина (III) на рост дрожжей 10 мл клеточной суспензии смешивали с 20 мкл исходного 3 мМ раствора одного из полученных соединений в этаноле. Смесь встряхивали при 200 об/мин. и 30 °С в течение 24 часов.

Ингибирование роста дрожжей *Yarrowia lipolytica* произошло в лунках с 2-бром-N-(4-бромфенил)ацетамидом (I) и N-(4-бромфенил)-7-нитробензофуразан-4-амином (III), на основании чего был сделан вывод, что данные соединения обладают противогрибковой активностью по отношению к дрожжам *Yarrowia lipolytica*. В лунке с раствором 2-бром-N-(4-фторфенил) ацетамида (II) подавление роста дрожжей было не значительным.

Исследования взаимодействия альбумина, основного белка плазмы крови млекопитающих, участвующего в транспорте лекарств и метаболитов, ценны как часть оценки биологических свойств новых потенциальных лекарств или флуоресцентных зондов.

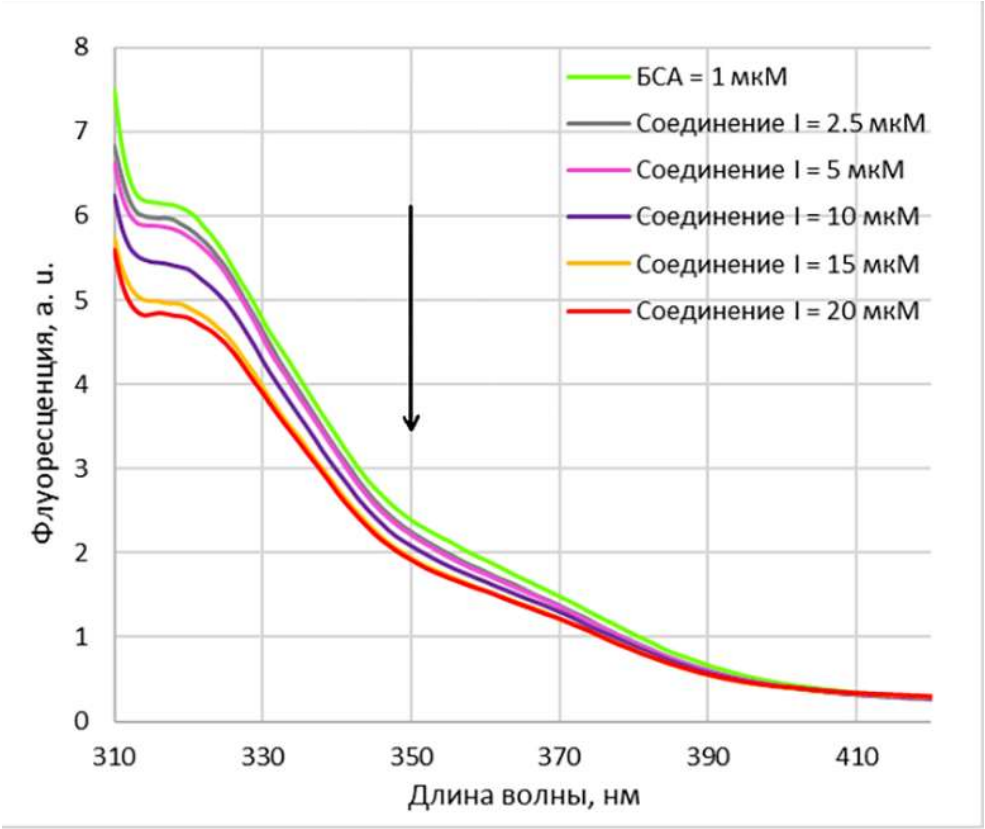


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции, полученные при взаимодействии БСА с 2-бром-N-(4-бромфенил) ацетамидом (I) при длине волны возбуждения 295 нм.

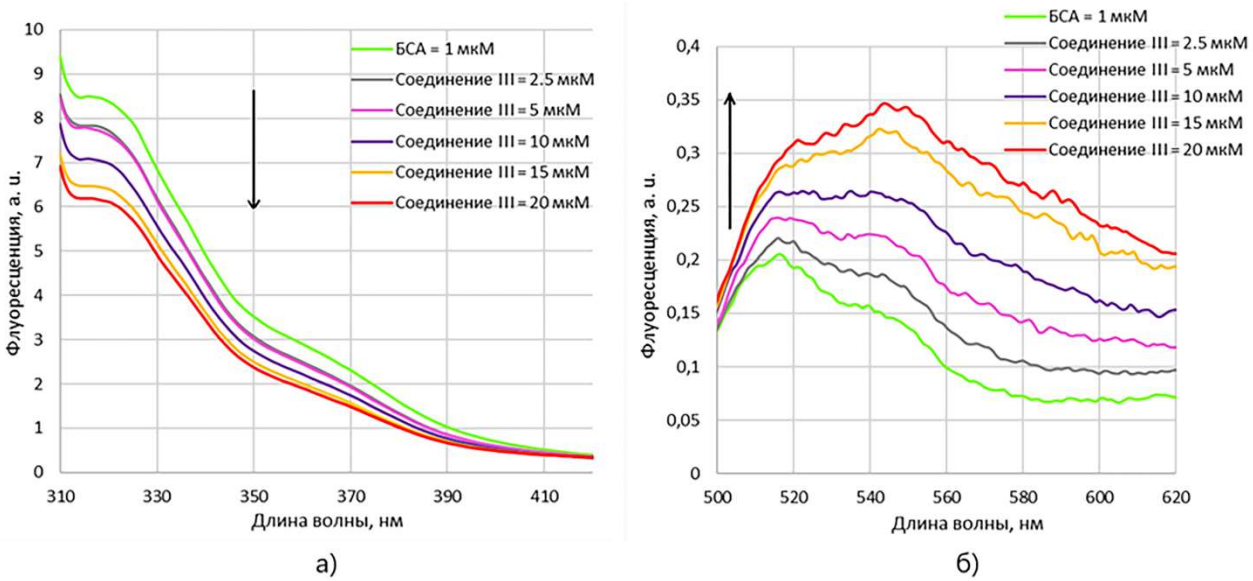


Рисунок 3 – Спектры флуоресценции, полученные при взаимодействии БСА с N-(4-бромфенил)-7-нитробензофуразан-4-амином (**III**) при: а) длине волны возбуждения 295 нм, б) длине волны возбуждения 460 нм.

Для исследования связывания соединений I и III с бычьим сывороточным альбумином (БСА) *in vitro* было проведено прямое титрование, в ходе которого определяли изменение собственной флуоресценции БСА (за счет двух остатков Trp и двадцати остатков Tyr), а также изменение флуоресценции группы NBD при связывании с гидрофобными сайтами БСА. Титрование проводили с использованием 10 мМ бикарбонатного буфера на спектрофлуориметре SolarCM2203, работающем при параметрах по умолчанию, за исключением щелей в 10 нм. Для проведения титрования были приготовлены 1 мМ растворы соединений I и III в этаноле. Спектры испускания регистрировали с использованием возбуждения как при 295 нм (БСА), так и при 460 нм (NBD).

При прямом титровании спектр 1 мкМ раствора БСА в буфере принимался за нулевую линию, после чего к нему прибавляли по порциям два раза по 5 мкл, затем три раза по 10 мкл раствора одного из полученных соединений и наблюдали за изменением спектра.

Полученные спектры флуоресценции при титровании соединениями I и III бычьего сывороточного альбумина показаны на рисунках 2–3.

На спектрах заметно увеличение флуоресценции полученных соединений (возбуждение при 460 нм) с увеличением их концентрации при титровании соединениями БСА, а также тушение собственной флуоресценции триптофана (возбуждение при 295 нм) при связывании с лигандом.

Таким образом, в ходе работы был получен ряд соединений, содержащих фрагмент -CH_2-Br, биоортогональные атомы галогена и флуорофорную NBD-группу. Синтезированные соединения потенциально могут применяться в молекулярных зондах, в то же время некоторые из них обладают противогрибковой активностью, что открывает перспективы для дальнейших исследований.

Работа проведена при поддержке гранта ГПНИ № г.р. 20210560 (Я.В.Фалетров, В.М. Шкуматов), а также гранта Министерства Образования № 20220695.

Список литературы

1. M. H. Akabas, Cysteine modification: probing channel structure, function and conformational change / M. H. Akabas // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2015. – № 869 – p. 24–54.

2. S. Wu, Cysteinome: The first comprehensive database for proteins with targetable cysteine and their covalent inhibitors / S. Wu [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 2016. – V. 478, № 3. – P. 1268–1273.

3. C.T. Gee, Protein-observed (19)F-NMR for fragment screening, affinity quantification and druggability assessment / C. T. Gee // Nat Protoc. – 2016. – V. 11, № 8. – P.1414–1427.

4. M.O. Zimmermann, Halogen-enriched fragment libraries as chemical probes for harnessing halogen bonding in fragment-based lead discovery / M. O. Zimmermann [et al.] // Future Med Chem. – 2014. – V. 6, № 6. – P. 617–639.

5. Я. В. Фалетров, Взаимодействие нитробензоксадиазольных производных пиперазина и анилина с бычьим сывороточным альбумином *in silico* и *in vitro* / Я. В. Фалетров [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Химия. – 2021. – № 2. – С. 25–35.

6. Я. В. Фалетров, Новые липофильные конъюгаты флуоресцирующего NBD-пиперазина: синтез, *in silico* взаимодействие с липидным бислоем и цитохромами Р450 / Я. В. Фалетров [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2022. – Т. 58, № 1. – С. 62–67.

ОГЛАВЛЕНИЕ

THE ALANINE AMINOTRANSFERASE, ASPARTATE AMINOTRANSFERASE, AND TOTAL BILIRUBIN LEVELS IN OVERWEIGHT PATIENTS
Ali Adeeb Hussein Ali **3**

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ДИПЕПТИДНОГО ЛИГАНДА TSPO РЕЦЕПТОРА ГД-23 И ЕГО D-L-ДИАСТЕРЕОМЕРА ГД-25 НА МОДЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА IN VITRO
Антипова Татьяна Алексеевна
Николаев Сергей Владимирович
Деева Ольга Алексеевна
Гудашева Татьяна Александровна **7**

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КЛЕЙ К УБИКВИТИНЛИГАЗНОМУ КОМПЛЕКСУ $CRL4^{CRBN}$
Баньковский Андрей Алексеевич
Ринейская Ольга Николаевна **13**

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ГЕМОЛИМФЕ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ
Бородина Екатерина Сергеевна
Махотин Родион Аркадьевич
Осипенко Татьяна Алексеевна
Пацевич Ольга Юрьевна
Шило Дорофея Дмитриевна
Сандаков Дмитрий Борисович
Сидоров Александр Викторович **19**

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДГЕЗИИ ФОТОКОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ФИКСАЦИИ НЕСЪЕМНОГО РЕТЕЙНЕРА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ПРОТРАВЛИВАНИЯ ЭМАЛИ ЗУБОВ
Бутвиловский Александр Валерьевич
Алшарифи Али Абдолхади Меджбел
Бутвиловский Валерий Эдуардович **25**

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF 4-((7-ETHYL-3,7-DIHYDRO-3-METHYL-1H-PURINE-2,6-DIONE-8-YL)AMINO)PROPANOIC, BUTANOIC AND HEXANOIC ACIDS UNDER INHIBITION OF SUPEROXIDE DISMUTASE BY NITROGEN ACTIVE FORMS
Galitsa Vadim Vyacheslavovich
Dyuzhikova Tatyana Nikolaevna
Galitsa Irina Vladimirovna **30**

ПОЛУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО 7-НИТРОБЕНЗОКСАДИАЗОЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ВАНКОМИЦИНА
Глинская Лилия Игоревна
Кузьменок Анастасия Сергеевна
Фалетров Ярослав Вячеславович
Шкуматов Владимир Макарович **35**

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ НАПИТКИ: СОСТАВ, ВЛИЯНИЕ НА ОРГАНИЗМ
Глинский Станислав Павлович
Юзефович Ольга Николаевна **39**

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОГО КОНТЕНТА С ЭЛЕМЕНТАМИ ДИСТАНЦИОННОГО И СМЕШАННОГО ОБУЧЕНИЯ В ОБРАЗОВАТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ
Гольцев Михаил Всеволодович
Белая Ольга Николаевна
Кухаренко Людмила Валентиновна
Гольцева Марина Владимировна
Гузелевич Ирина Александровна **45**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОТВАРА ЛИСТЬЕВ ГИНОСТЕММЫ ПЯТИЛИСТНОЙ (GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM) НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
Губич Оксана Игоревна
Грамотнева Валерия Алексеевна **51**

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДОКСОРУБИЦИН-ФУЛЛЕРЕНОЛОВЫХ АГЕНТОВ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
Дикусар Евгений Анатольевич
Акишина Екатерина Александровна
Пушкарчук Александр Леонидович
Безъязычная Татьяна Владимировна
Солдатов Александр Геннадьевич
Кутень Семен Адамович
Стёпин Святослав Генрихович
Низовцев Александр Павлович
Килин Сергей Яковлевич
Кульчицкий Владимир Адамович
Поткин Владимир Иванович **56**

МЕТОДОЛОГИЯ ПОИСКА СОВРЕМЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
Дикусар Евгений Анатольевич
Акишина Екатерина Александровна
Стёпин Святослав Генрихович
Кульчицкий Владимир Адамович
Поткин Владимир Иванович **61**

ПРОИЗВОДНОЕ 7-НИТРОБЕНЗОКСАДИАЗОЛ-4-ИЛ ОРТО-ФЕНИЛЕНДИАМИНА В КАЧЕСТВЕ НОВОГО МНОГОЦЕЛЕВОГО ЛИГАНДА ДЛЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ: ОЦЕНКА IN SILICO
Завалинич Виктория Алексеевна
Фалетров Ярослав Вячеславович
Шкуматов Владимир Макарович **66**

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА СКОРОСТЬ МИГРАЦИИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ
Зорина Татьяна Евгеньевна
Кравченко Ирина Евгеньевна
Ермилова Татьяна Игоревна
Шман Татьяна Викторовна
Кустов Андрей Владимирович
Березин Дмитрий Борисович
Зорин Владимир Петрович **72**

ЛАКТОФЕРРИН СНИЖАЕТ КОНЦЕНТРАЦИЮ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ, МАРКЕРОВ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА И НЕТОЗА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ АКТИВАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ *EX VIVO*
Иванов Виктор Андреевич
Галкина Наталья Владимировна
Максимов Дмитрий Игоревич
Горбунов Николай Петрович
Костевич Валерия Александровна
Соколов Алексей Викторович
Островский Евгений Михайлович
Гусев Сергей Андреевич
Панасенко Олег Михайлович **78**

ИЗМЕНЕНИЕ ХЕМОТАКСИСА В-ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ ПОД ВЛИЯНИЕМ АЗИТРОМИЦИНА
Кадушкин Алексей Геннадьевич
Таганович Анатолий Дмитриевич
Мовчан Людмила Викторовна
Зафранская Марина Михайловна
Шман Татьяна Викторовна **84**

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕСТНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ
Калиниченко Алексей Павлович
Гривенко Сергей Геннадиевич
Умеров Эрвин Энверович **90**

ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ И КЛИК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ NBD-АЗИДОАНИЛИНА И ГЕКСИНА
Карпушенкова Вероника Сергеевна
Фалетров Ярослав Вячеславович
Шкуматов Владимир Макарович **95**

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ БЕЗРЕЦИДИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С III СТАДИЕЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО
Ковганко Николай Николавеич
Таганович Анатолий Дмитриевич
Прохорова Виолетта Игоревна
Мурашко Дарья Игоревна
Колб Александр Владимирович
Готько Оксана Владимировна **99**

АНТИВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ ВИРУСА SARS-COV-2)
Колбас Наталья Юрьевна
Колбас Елизавета Александровна **106**

МУТАЦИОННОЕ ДАВЛЕНИЕ В ГЕНАХ СЕМЕЙСТВА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА
Колесник Дарья Леонидовна
Акуневич Анастасия Александровна **111**

ЭНТАЛЬПИИ СГОРАНИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ 4′-ЦИКЛОГЕКСИЛАЦЕТОФЕНОНА В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ
Контява Ольга Викторовна
Блохин Андрей Викторович
Черепенников Михаил Борисович **117**

ТЕПЛОЕМКОСТЬ И ПАРАМЕТРЫ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ 4′-ЦИКЛОГЕКСИЛАЦЕТОФЕНОНА В КОНДЕНСИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ
Контява Ольга Викторовна
Блохин Андрей Викторович
Черепенников Михаил Борисович **122**

MITOCHONDRIAL RESPIRATORY FUNCTION IN THE HEPATIC TISSUE OF ETHANOL-EXPOSED MICE: ROLE OF MELATONIN
Kurhaluk Natalia Nikolaevna
Tkachenko Halina Mihailovna **128**

BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN THE LIVER OF MICE WITH SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME
Kurhaluk Natalia Nikolaevna
Halina Tkachenko **134**

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АКТИВИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ С ЛЕЙКОЦИТАМИ
Кухаренко Людмила Валентиновна
Гольцев Михаил Всеволодович
Белая Ольга Николаевна **141**

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРОМБИНА С ПОЛИСАХАРИДАМИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА
Лаппо Даниил Дмитриевич
Просмыцкая Юлия Сергеевна
Савицкая Татьяна Александровна **145**

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ТОНИЗИРУЮЩИХ НАПИТКОВ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА ИСХОДЯ ИЗ СОДЕРЖАНИЯ В НИХ АЛКАЛОИДОВ ПУРИНОВОГО РЯДА
Лапчук Анастасия Алексеевна
Бондарец Ольга Александровна **151**

СИНТЕЗ МОНОКРИСТАЛЛОВ БОРАТОВ ВАНАДИЯ И ХРОМА
Латушко Сергей Игоревич
Латушко Татьяна Викторовна **157**

ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И СИМУЛЯЦИИ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ В ПРОЦЕССЕ ОБУЧЕНИЯ СТУДЕНТОВ НА КАФЕДРЕ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
Лахвич Фёдор Фёдорович
Ринейская Ольга Николаевна **162**

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO
Литвинова Татьяна Михайловна
Церковский Дмитрий Александрович
Мазуренко Александр Николаевич
Демидова Светлана Анатольевна **167**

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЛИГОПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ С3А КОМПОНЕНТА СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА
Макаревич Денис Александрович
Бруякин Сергей Дмитриевич **173**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОРБЦИИ БИЛИРУБИНА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ УГЛЕРОДА В СРАВНЕНИИ С НЕПОКРЫТЫМ УГОЛЬНЫМ СОРБЕНТОМ
Макаревич Денис Александрович
Рябцева Татьяна Владимировна
Ковганко Николай Николаевич
Штемплюк Роман Георгиевич **179**

ВЫЯВЛЕНИЕ РЕАКЦИЙ АВТОНОМНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА ПРЕДЪЯВЛЕНИЕ ЗАПАХА И ВКУСА МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ДО И ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
Матвеенко Ульяна Денисовна **185**

ЭФФЕКТЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ МОНОПРОБИОТИКОВ В МОДЕЛИ ПЕНТИЛЕНТЕТРОЗОЛОВОГО ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗА
Мелик-Касумов Тигран Беглярович
Жабинская Алеся Александровна
Чуприна Алеся Вадимовна
Колыхан Степан Александрович
Корнеева Марина Александровна **190**

ВЛИЯНИЕ ОФЛОКСАЦИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИНДЕКСОВ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ В КРОВИ ЦЫПЛЯТ
Моисеева Анна Анатольевна
Присный Андрей Андреевич
Скворцов Владимир Николаевич **198**

ПОКАЗАТЕЛИ РЕДОКС-ЛАНДШАФТА БАЗАЛЬНЫХ ЯДЕР БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА ПРИ АЛЮМИНИЕВОМ НЕЙРОТОКСИКОЗЕ И МОДУЛИРОВАНИИ БИОСИНТЕЗА КОФЕРМЕНТА А
Мойсеёнок Андрей Георгиевич
Семенович Дмитрий Сергеевич
Лукиенко Елена Петровна
Канунникова Нина Павловна **203**

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ КОМБИНИРОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ РЕЦЕПТОРОВ CXCR1, CXCR2 И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО
Мурашко Дарья Игоревна
Таганович Анатолий Дмитриевич
Ковганко Николай Николаевич **209**

БИОКОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И СЕРЕБРА
Мусская Ольга Николаевна
Крутько Евгений Николаевич
Крутько Валентина Константиновна
Кулак Анатолий Иосифович **215**

РОЛЬ КИНУРЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОБУЧЕНИИ И ПАМЯТИ У ДРОЗОФИЛЫ ПРИ СТРЕССОРНОЙ РЕАКЦИИ НА ОСЛАБЛЕНИЕ ГЕОМАГНИТНОГО ПОЛЯ
Никитина Екатерина Александровна
Яковлева Раиса Владимировна
Щеголев Борис Федорович **221**

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЕРМЕНТА CATHEPSIN A ЧЕЛОВЕКА И МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ
Пинчук Полина Юрьевна
Чиркин Александр Александрович **225**

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ M21R И K48R УВЕЛИЧИВАЮТ СРОДСТВО ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА К ЕГО РЕЦЕПТОРУ
Побойнев Виктор Витольдович
Козел Владислав Александрович
Козел Александр Ромуальдович **230**

ЗАКОНОМЕРНОСТИ В КОНТАКТАХ, ФОРМИРУЕМЫХ СТРУКТУРНО НЕУПОРЯДОЧЕННЫМ ФРАГМЕНТОМ БОЛЬШОГО ПРИОННОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА
Побойнев Виктор Витольдович
Хрусталёв Владислав Викторович
Ачинович Ольга Владимировна
Петрушенко Людмила Григорьевна **236**

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА IN SILICO БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО АЛКИН-ХОЛЕСТЕРИН КОНЪЮГАТА
Позняк Глеб Игоревич
Фалетров Ярослав Вячеславович
Шкуматов Владимир Макарович **242**

ПОИСК ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 – АССОЦИИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ, ПОЛУЧАВШИХ ЛЕЧЕНИЕ ПЛАЗМОЙ ИММУННОЙ, АНТИ-COVID-19
Потапнев Михаил Петрович
Карпенко Федор Николаевич
Дунаев Игорь Анатольевич
Гущина Лариса Михайловна
Максимович Алексей Владимирович
Лицкевич Павел Владимирович
Ваганова Татьяна Владимировна
Вищеня Людмила Болеславовна
Ковалева Татьяна Анатольевна
Стычневская Елена Владимировна **246**

АКТИВАЦИЯ РЕПАРАЦИИ ДНК И ПОДАВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИИ КВЕРЦЕТИНОМ И ЕГО НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМИ ФОРМАМИ ПОСЛЕ УФ-С ВОЗДЕЙСТВИЯ
Потапович Алла Ивановна
Костюк Татьяна Владимировна
Шутова Татьяна Геннадьевна
Ишутина Ольга Владимировна
Костюк Владимир Андреевич **252**

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ОКИСЛЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПОЛИМЕРОВ-НОСИТЕЛЕЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
Пристромова Юлия Игоревна
Юркштович Татьяна Лукинична
Голуб Наталья Васильевна
Костерова Раиса Ивановна **259**

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ЗАЩИТНОЙ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ АМИТРИПТИЛИНОМ
Приступа Викентий Чеславович
Сперанская Елена Чеславовна
Сперанская Ирина Сергеевна **265**

ДИНАМИКА УСПЕВАЕМОСТИ СТУДЕНТОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ НА КАФЕДРЕ ОБЩЕЙ ХИМИИ БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
Прохорова Татьяна Владимировна
Побойнев Виктор Витольдович
Хрусталёв Владислав Викторович
Латушко Татьяна Викторовна **270**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ КУРСА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ГЛАЗАМИ ИНОСТРАННЫХ УЧАЩИХСЯ (РЕЗУЛЬТАТЫ АНКЕТИРОВАНИЯ)
Ринейская Ольга Николаевна
Глинник Станислава Владимировна
Зайтуллаева Любовь Энверовна **275**

***IN SILICO* ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ РИВАРОКСОБАНА К β-КЕТОАЦИЛ[АСР]СИНТАЗЕ 3**
Ринейская Ольга Николаевна
Лахвич Фёдор Фёдорович **279**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОРБЦИИ ЦИТОКИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ТЕТРАПЕПТИДАМИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ
Рябцева Татьяна Владимировна
Таганович Анатолий Дмитриевич **285**

МИКРОБИОТА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА И СТРЕСС
Седакова Валентина Антоновна
Клебанова Наталья Александровна
Бибикова Мария Сергеевна
Клебанов Александр Владимирович **291**

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ВЫЯВИЛ ВОЗМОЖНЫЕ СВОЙСТВА КОВАЛЕНТНОГО ИНГИБИТОРА ТРЕХ ФЕРМЕНТОВ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ВЕЩЕСТВА ИКСЕРИН Д ИЗ ОБЫЧНОГО ОДУВАНЧИКА
Старовойтова Виктория Александровна
Фалетров Ярослав Вячеславович
Шкуматов Владимир Макарович **296**

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЖЕЛЕЗИСТЫХ КЛЕТОК КОЖНОГО ЭПИТЕЛИЯ *SACCOGLOSSUS MERESCHKOWSKII* (ENTEROPNEUSTA, HEMICHORDATA)
Столярова Марина Владимировна
Валькович Эрнест Иванович **301**

НОВЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СТЕРОИД 17-((NBD)-МЕТИЛАМИНО)-АНДРОСТ-5-ЕН-3β-ОЛ: СИНТЕЗ И IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО СВОЙСТВ КАК МОЛЕКУЛЯРНОГО ЗОНДА ДЛЯ БЕЛКОВ
Столярчук Анна Петровна
Фалетров Ярослав Вячеславович
Шкуматов Владимир Макарович **307**

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПСИХОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Сяхович Виталий Эдуардович
Походня Екатерина Николаевна
Голубева Татьяна Сергеевна
Докукина Татьяна Васильевна
Ходжаев Александр Валерьевич
Походня Юрий Георгиевич **312**

ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ GABAЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ
Хожай Людмила Ивановна **318**

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ GABA, И ЭКСПРЕССИЯ GAT_1 ТРАНСПОРТЕРА GABA В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ
Хожай Людмила Ивановна **323**

РОЛЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ГЕНАХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ ХРОНИЧСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ
Хотько Екатерина Александровна
Таганович Анатолий Дмитриевич
Шабаев Глеб Витальевич **329**

ОЛИГОМЕРЫ ПЕПТИДОВ SK30, DT19Y И DT19W ИЗ КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА B19 УСТОЙЧИВЫ К ЗАКИСЛЕНИЮ СРЕДЫ
Хрусталёв Владислав Викторович
Хрусталёва Татьяна Александровна
Стожаров Александр Николаевич
Шалыго Николай Владимирович
Побойнев Виктор Витольдович
Акуневич Анастасия Александровна
Харитонова Ульяна Витальевна **335**

ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДОВ DT19Y И DT19W ИЗ КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА B19
Хрусталёв Владислав Викторович
Хрусталёва Татьяна Александровна
Стожаров Александр Николаевич
Акуневич Анастасия Александровна **341**

КОНЪЮГАЦИЯ ПЕПТИДА SK30 ИЗ КАПСИДНОГО БЕЛКА ПАРВОВИРУСА B19 С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ПРЕПЯТСТВУЕТ ФОРМИРОВАНИЮ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОЙ БЕТА-СТРУКТУРЫ
Хрусталёв Владислав Викторович
Хрусталёва Татьяна Александровна
Стожаров Александр Николаевич
Акуневич Анастасия Александровна
Побойнев Виктор Витольдович
Сапон Егор Геннадьевич **347**

АМИНОКИСЛОТНЫЕ СПЕКТРЫ ГЕПАТОПАНКРЕАСА ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ АНТИМЕТАБОЛИТОВ
Чиркин Александр Александрович
Балаева-Тихомирова Ольга Михайловна
Вишневская Мария Викторовна
Дорошенко Евгений Михайлович **355**

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ПРОТЕОЛИЗ-АНТИПРОТЕОЛИЗ НА МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКАХ
Чиркин Александр Александрович
Балаева-Тихомирова Ольга Михайловна
Долматова Виктория Викторовна
Вишневская Мария Викторовна **361**

УЛЬТРАСТРУКТУРА СИНАПСОВ И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СОМАТОСЕНСОРНОЙ ОБЛАСТИ НЕОКОРТЕКСА КРЫС В НЕОНАТАЛЬНЫЙ И ЮВЕНИЛНЫЙ ПЕРИОДЫ ПОСЛЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ
Шишко Тамара Тимофеевна **367**

ЭФФЕКТ ЛУПАНОВОГО ТРИТЕРПЕНОИДА, БЕТУЛИНА, НА АКТИВНОСТЬ ПАРАОКСОНАЗЫ 1 СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У КРЫС
Шляхтун Алексей Генрихович
Сутько Ирина Петровна
Радута Елена Францевна
Букша Екатерина Витальевна
Богдевич Евгений Валерьянович **371**

ВЛИЯНИЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ БИОСИНТЕЗА НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА НА АКТИВНОСТИ СИСТЕМ МЕТАБОЛИЗМА СПИРТОВ И АЛЬДЕГИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ТЯЖЕЛОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
Шляхтун Алексей Генрихович
Букша Екатерина Витальевна
Богдевич Евгений Валерьянович
Радута Елена Францевна
Сутько Ирина Петровна **377**

ПЕРСПЕКТИВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДЕКСОВ ВОСПАЛЕНИЯ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ В ДИАГНОСТИКЕ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО
Шпаковский Александр Юрьевич
Мурашко Дарья Игоревна
Таганович Анатолий Дмитриевич **383**

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЭЛЕКТРОФИЛЬНЫЕ ФРАГМЕНТЫ, ДЛЯ НОВЫХ БЕЛКОВЫХ МЕТОК
Яковец Полина Сергеевна
Фалетров Ярослав Вячеславович
Шкуматов Владимир Макарович **387**

Научное издание

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЫ

Материалы Международной научно-практической конференции
(Минск, 28 октября 2022 г.)

Под редакцией В. В. Хрусталёва, А. Д. Тагановича, Т. А. Хрусталёвой

Ответственный за выпуск В. В. Хрусталёв
Компьютерная верстка У. В. Харитонова
Корректор У. В. Харитонова

Усл. печ. л. 47,12. Уч.-изд. л. 23,66. Тираж 20 экз.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.