

ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНЫЙ СТАТУС СИСТЕМЫ КОФЕРМЕНТА А ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ И ВВЕДЕНИИ РЕДОКС-МОДУЛИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

Гуринович В. А., Семенович Д. С., Катковская И. Н.,
Канунникова Н. П., Мойсеёнок А. Г.

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно,
val@bioch.basnet.by

Введение. Исследования последних лет в области кофермента ацетилирования (КоА) открыли патогенетическую роль биосинтеза КоА в нейродегенеративной патологии [4] и феномен КоА-илирования белков в процессе инициирования окислительного или метаболического стресса [3]. Более того, система КоА в целом рассматривается как сигнальная или буферная в редокс-сигналинге для защиты редокс-чувствительных тиолов от необратимого окисления [2, 5].

Цель работы – определение тиоловой (КоА-SH) и дисульфидной (КоА-S-S-КоА) форм КоА, а также ацетил-КоА в печени белых мышей, у которых вызывали системное воспаление и окислительный стресс (ОС) внутрибрюшинным введением бактериального липополисахарида (ЛПС) на 6 ч.

Методы исследования. В качестве протективных средств использовали предшественники биосинтеза КоА – пантенол (ПЛ) или пантетин (ПТ), а также N-ацетилцистеин (АЦЦ), соответственно, в дозах 200 мг/кг или 100 мг/кг на протяжении 7 суток до назначения ЛПС.

Для определения содержания КоА и ацетил-КоА в тканях применяли ВЭЖХ на приборе «Agilent 1260 Infinity II» («Agilent Technologies», США). Гомогенизацию образцов ткани печени и головного мозга белых мышей осуществляли на холоду с 0,6 М HClO_4 в соотношении 1:6 и 1:5, соответственно. Гомогенаты центрифугировали при 16000 g, 20 мин., +4°C, полученные хлорные супернатанты доводили до pH 6-7 с 5 М K_2CO_3 , аликвоту супернатанта обрабатывали дитиотрейтолом (ДТТ) до конечной

концентрации 5 мМ, пробы замораживали при -20°C и перед анализом фильтровали через фильтры с размером пор 0,45 мкм. Пробы при хроматографии сохраняли в термостате при +6°C. Анализ проводили на колонке «Poroshell 120 EC-C18» 3,0×150 мм и размером частиц 2,7 мкм и градиента растворов: А – 50 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 5, В – смесь раствора А и ацетонитрила в объемном соотношении 80:20. Скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин. Время удерживания составило для КоА и ацетил-КоА 13,74 и 15,62 мин., соответственно. Регистрацию пиков осуществляли на диодно-матричном детекторе при 260 нм [1].

Результаты и их обсуждение. Судя по результатам традиционного теста, характеризующего перекисидацию липидов при развитии ОС, содержание тиобарбитуратреагирующих соединений в ткани печени не претерпело изменений под воздействием ЛПС, но их уровень значительно снижался в случае предварительного назначения АЦЦ. Если одновременно вводился ПТ, наблюдалось падение S-глутатионилированных белков. Для системы КоА в печени введение воспалительного агента не оказалось «тропным» фактором, тогда как назначение АЦЦ и его композиции с ПЛ или ПТ, или предварительно перед инъектированием ЛПС имело драматические последствия.

Как следует из представленной таблицы, наблюдалось многократное увеличение фракции КоА-SH при курсовом назначении АЦЦ, которое было менее выраженным в результате введения ЛПС на фоне предшественников КоА. Суммарный уровень кофермента (после обработки проб с ДТТ) и фракция его дисульфидных форм оставались стабильными. Отмечен более чем 7-кратный подъем фракций ацетил-КоА.

Анализ структурных изменений в системе КоА показывает, что соотношение фракций КоА-SH/КоА-S-S-КоА возрастает при введении ЛПС и АЦЦ и, в меньшей мере, – при назначении композиций. Соотношение ацетил-КоА/КоА-SH, чрезвычайно важное в метаболической регуляции [2, 4, 5], оказалось наиболее высоким при назначении ЛПС на фоне композиции АЦЦ+ПТ.

Таблица – Содержание КоА-SH, дисульфидов КоА и ацетил-КоА в хлорнокислых супернатантах, содержащих 5 мМ дитиотрейтол (ДТТ), печени мышц после введения ПЛ, АЦЦ и ПТ и ЛПС, нмоль/г, $M \pm SD$

Группы	КоА-SH	КоА-SH+ДТТ	КоА-S-S-КоА	Ацетил-КоА
Контроль	27,05±10,69	193,60±10,57	61,95±27,29	2,74±1,25
ЛПС	49,13±16,20	124,40±25,19	37,65±10,09	2,08±1,99
АЦЦ	88,86±30,01* [#]	196,40±118,60	69,12±41,35	7,04±5,14
АЦЦ+ЛПС	46,88±25,63 ^Δ	142,90±43,39	48,00±22,76	10,93±3,05
АЦЦ+ПЛ+ЛПС	37,86±15,79 ^Δ	123,40±35,53	42,77±13,26	10,82±3,40
АЦЦ+ПТ+ЛПС	61,19±9,35	179,60±47,73	65,31±26,59	16,65±11,08* [#]

Примечание – ** – $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль»;
– $p < 0,05$ по отношению к группе «ЛПС»; ^Δ – $p < 0,05$ по отношению к группе «АЦЦ» (ANOVA, тест Тьюки)

Выводы. Оценивая эффекты системного воспаления и введения редокс-модуляторов, необходимо отметить доминирующее воздействие на уровень КоА-SH, хотя по соотношению фракций моноэффекты введения ЛПС и АЦЦ были весьма близки. Определенным биомаркером метаболических последствий назначения данных эффекторов стало увеличение активности ацетилхолинэстеразы в плазме крови только у животных, получивших курс инъекций АЦЦ.

Литература

1. Гуринович В. А., Дорофей Д. С. Соотношение уровня КоА-SH и короткоцепочечных ацил-КоА в миокарде белых крыс при иммобилизационном стрессе // Эксперим. и клинич. фармакол. Матер. межд. науч.-практич. конф., Гродно, ГрГМУ. – 2011. – С. 49-53.
2. Мойсеёнок А. Г. Модуляция редокс-потенциала клеток – функция системы биосинтеза СоА? // В кн.: Биологические функции пантотеновой кислоты. Пантотеновая кислота и мозг. Новые возможности метаболической и диетической терапии: матер. межд. симпоз., Гродно, 28 июня 2013 г.; отв. ред.: член-корр. А. Г. Мойсеёнок. – Гродно, 2013. – С. 43-45.
3. Aloum L., Brimson C. A., Zhyvoloup A. et al. Coenzyme A and protein CoAlation levels are regulated in response to oxidative stress and

during morphogenesis in Dictyostel. discoideum // Bioch. Biophys. Res. Com. – 2019. – Vol. 511, № 2 – P. 294-299.

4. Di Meo I., Carecchio M., Tiranti V. Inborn errors of coenzyme A metabolism and neurodegeneration // J. Inherit. Metab. Dis. – 2019. – Vol. 42, № 1. – P. 49-56.

5. Gout I. Coenzyme A: a protective thiol in bacterial antioxidant defence // Bioch. Soc. Trans. – 2019. – Vol. 47, № 1 – P. 469-476.

УСТРОЙСТВО ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА С ПОМОЩЬЮ «ДЕФИЦИТА ВРЕМЕНИ»

Гусакова Е. А., Городецкая И. В.

Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет, Беларусь
elena-gusakova83@mail.ru

Введение. Согласно современным представлениям, основным механизмом развития стресс-реакции являются отрицательные эмоции, формирующиеся за счет невозможности достижения полезного приспособительного результата [1].

Для моделирования стресса у лабораторных животных разработано множество методик, в которых используются факторы разной природы: иммобилизация, физические, химические, социальные и др. Современные условия жизни определяют особую актуальность такого стрессора, как дефицит времени. Однако по результатам проведенного нами анализа литературы, экспериментальные методики для моделирования данного вида стресса отсутствуют.

Цель – разработать устройство для моделирования эмоционального стресса у лабораторных животных путем создания дефицита времени.

Методы исследования. Эксперимент выполнен на 30 белых беспородных крысах-самцах массой 220-240 г. Стресс моделировали по методике «дефицита времени» [2]. Предложенное нами устройство состоит из пластиковой емкости и широкого прозрачного гофрированного полиуретанового шланга, который распола-