

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

Объект авторского права

УДК 577.112.386:543.632.552]:[612.1.015.4+612.015.21]:616-098-092.9

НОВОГРОДСКАЯ
Яна Иосифовна

**НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ В
ТКАНЯХ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НАРУШЕНИЙ ИХ
МЕТАБОЛИЗМА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия

Гродно, 2022

Научная работа выполнена в учреждении образования «Гродненский государственный медицинский университет»

**Научный
руководитель:**

Курбат Михаил Николаевич,

кандидат медицинских наук, доцент, заведующий
научно-исследовательской лабораторией учреждения
образования «Гродненский государственный
медицинский университет»

**Официальные
оппоненты:**

Заводник Илья Борисович,

доктор биологических наук, профессор, профессор
кафедры биохимии учреждения образования
«Гродненский государственный университет имени
Янки Купалы»

Чиркин Александр Александрович,

доктор биологических наук, профессор, профессор
кафедры химии и естественнонаучного образования
учреждения образования «Витебский государственный
университет имени П. М. Машерова»

**Оппонирующая
организация:**

учреждение образования «Полесский государственный
университет»

Защита состоится 21 декабря 2022 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.30.01 при республиканском научно-исследовательском унитарном предприятии «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 230023, г. Гродно, пл. Антония Тызенгауза, 7; e-mail: office@ibiochemistry.by, тел/факс (0152) 55-87-78.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке республиканского научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан 21 ноября 2022 года.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
кандидат биологических наук



И. П. Сутько

ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в патологии печени отводят молекулярным механизмам, связанным с нарушениями метаболизма аминокислот (АК) [Wu G., 2009; Hasegawa T. et al., 2020]. Концентрация АК в плазме крови относительно постоянна, а патологические состояния, связанные с заболеваниями печени, сопровождаются аминокислотным дисбалансом [Hasegawa T. et al., 2020]. Уровни серосодержащих АК, аминотиолов, родственных им соединений и соотношения между ними – чувствительные маркеры такого дисбаланса [Riedijk M. A. et al., 2007; Ельников Р. С. и др., 2011]. Пул свободных АК плазмы крови и их метаболизм в печени влияют на формирование фонда свободных АК, в частности, в головном мозге [Лелевич В. В., 2021].

Метаболиты метионина обладают диагностической информативностью, примером таких соединений является гомоцистеин (Нсу) [Наумов А. В., 2013; Pierozan P. et al., 2017]. При гипергомоцистеинемии обнаружено снижение активности антиоксидантных ферментов, содержания низкомолекулярных антиоксидантов, изменение экспрессии нейротрофического фактора головного мозга, фактора роста нервов, белков, являющихся маркерами созревания нейронов и астроцитов, и др. [Baydas G. et al., 2007; Болдырев А. А., 2009; Наумов А. В., 2013; Sable P. et al., 2014; Арутюнян А. В. и др., 2015; Pustygina A. V. et al., 2015]. Метаболизируется Нсу чаще всего до таурина (Тau), глутатиона (GSH) или неорганического сульфата [Brosnan J. T., Brosnan M. E., 2006]. Снижение уровня Tau при повреждении печени связано с выраженностью его проявлений, включая гибель гепатоцитов, воспаление, фиброз и жировое перерождение [Miyazaki T., Matsuzaki Y., 2014]. Tau снижает липогенез, окислительный стресс и продукцию воспалительных цитокинов [Lin C. J. et al., 2015]. Сведения о непосредственных предшественниках Tau также важны для оценки метаболических нарушений. При дефиците GSH печень становится менее устойчивой к окислительному стрессу [Ramani K. et al., 2012; Joung Y. S., 2015; Milito A. et al., 2019].

В доступной литературе имеется недостаточно сведений об уровнях Нсу и метаболитах γ -глутамильного цикла в тканях [Ueland P. M. et al., 1984; Guan X. C. et al., 2003; Belenichev I. F. et al., 2014; Kamińska A. et al., 2018] ввиду отсутствия эффективного и надежного метода определения тканевых уровней Нсу и его производных. Источник Нсу в плазме крови может быть установлен только путем его детектирования в тканях, поэтому представляется актуальной разработка метода определения аминотиолов в тканях и получение на этой основе данных о формировании фонда низкомолекулярных серосодержащих соединений (НСС) в тканях при различных метаболических нарушениях.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами

Диссертация выполнена в рамках НИР, проводимых в научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) УО «Гродненский государственный медицинский университет» (ГрГМУ): ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» подпрограмм «Диагностика и терапия заболеваний» и «Фундаментальные аспекты медицинской науки»:

- «Поиск и обоснование методов коррекции гепатотоксических эффектов ингибиторов обратной транскриптазы» (№ госрегистрации 20162733, сроки выполнения 2016-2018 гг.);

- «Изучить особенности формирования фонда низкомолекулярных серосодержащих соединений в организме при нарушениях функционирования печени» (№ госрегистрации 20190400, сроки выполнения 2019-2020 гг.);

- «Оценка тканевых особенностей и диагностической информативности фонда свободных аминокислот и их производных при экспериментальной сердечно-сосудистой патологии различного генеза и обоснование подходов к метаболической коррекции» (№ госрегистрации 20200238, сроки выполнения 2020-2021 гг.).

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности в Республике Беларусь на 2021-2025 гг., п. 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства», утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – оценить особенности формирования фонда низкомолекулярных серосодержащих соединений в тканях крыс при моделировании нарушений их метаболизма.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и внедрить в экспериментальную практику метод хроматографического определения низкомолекулярных аминотиолов в тканях.
2. Определить соотношения уровней низкомолекулярных серосодержащих соединений в тканях крыс в условиях ингибирования фолатного цикла.
3. Установить характер сдвигов в пуле низкомолекулярных серосодержащих соединений тканей крыс в условиях гипергомоцистеинемии и ингибирования фолатного цикла на ее фоне.
4. Выявить влияние острого и хронического токсического поражения печени на формирование пула низкомолекулярных серосодержащих соединений в тканях.

Объект исследования: плазма крови, ткани печени, почек и головного мозга крыс.

Предмет исследования: концентрации аминотиолов и родственных им соединений (свободных серосодержащих АК).

Выбор объекта и предмета исследования обусловлен тем, что печень – одно из основных мест синтеза и превращений гомоцистеина ввиду высокой активности транسمетилирования, реметилирования и транссульфурирования. Активны в этом отношении также почки и головной мозг. В литературе практически отсутствуют данные об уровнях гомоцистеина и других аминотиолов в тканях.

Научная новизна. Разработан новый метод хроматографического определения низкомолекулярных тиолсодержащих соединений в тканях, включая общие гомоцистеин, цистеин, цистеинилглицин, γ -глутамилцистеин и глутатион. На основании полученных данных установлены их реальные уровни в тканях печени, почек и головного мозга.

Впервые определены уровни аминотиолов в исследуемых тканях при различных нарушениях метаболизма серосодержащих АК. Установлена направленность сдвигов пула НСС в плазме крови и тканях крыс при метионин-индуцированной гипергомоцистеинемии, показаны изменения в содержании НСС в тканях при остром и хроническом токсическом поражении печени: нарушение транссульфурирования, накопление гипотаурина, таурина и глутатиона.

Проведена оценка вклада отдельных НСС и родственных им соединений в формирование их пула в различных тканях животных при экспериментальной гипергомоцистеинемии и ингибировании фолатного цикла на ее фоне, тиацетамидном циррозе печени.

Положения, выносимые на защиту

1. Новый метод хроматографического определения гомоцистеина, цистеина и метаболитов γ -глутамильного цикла по воспроизводимости, чувствительности и разрешению позволяет определять их концентрации в тканях в одной пробе. С использованием этого метода установлено, что уровень гомоцистеина в плазме крови не коррелирует с таковым в тканях печени, почек и головного мозга интактных крыс.

2. Ингибирование фолатного цикла метотрексатом путем его введения через день в течение 7 и 21 суток проявляется одновременно обеднением пула аминотиолов плазмы крови и обогащением – печени крыс; 7-суточное ингибирование фолатного цикла сопровождается повышением концентраций таурина и цистатинина, а 21-суточное – повышением уровней цистеина, цистеата и снижением – гипотаурина в ткани печени.

3. Метионин-индуцируемая гипергомоцистеинемия, а также ингибирование фолатного цикла на ее фоне вызывают нарушение метаболизма низкомолекулярных серосодержащих соединений, которое проявляется

в одновременном повышении уровней большинства из них, в наибольшей степени – гипотаурина, таурина и гомоцистеина в плазме крови, тканях печени и почек крыс. Во всех исследованных структурах головного мозга наблюдалось повышение уровней метионина, цистатионина и гипотаурина.

4. Острое поражение печени, вызванное введением этионина в течение 3 суток, приводит к изменению профиля низкомолекулярных серосодержащих соединений как в плазме крови, так и в ткани печени, накоплению субстратов реакций транссульфурирования в больших полушариях мозга крыс. Тиацетамид-индуцированный цирроз печени у крыс сопровождается активацией транссульфурирования, изменением соотношения гипотаурин/таурин в ткани печени, повышением содержания глутатиона в тканях печени и почек и снижением – в структурах головного мозга.

Личный вклад соискателя

Автором совместно с научным руководителем определены цель, задачи, методы и объем исследования, разработан его дизайн. Моделирование ингибирования фолатного цикла, экспериментальной гипергомоцистеинемии, а также тиацетамидного поражения печени осуществлено соискателем самостоятельно. Моделирование нарушения обмена серосодержащих АК этионином осуществлено совместно с заведующим кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии имени С. И. Гельберга ГрГМУ, доктором мед. наук, профессором В. М. Шейбаком. Определение содержания свободных АК и аминотиолов осуществлено соискателем самостоятельно при методической помощи ведущего научного сотрудника НИЛ ГрГМУ, канд. биол. наук, доцента Е. М. Дорошенко. Определение активностей аминотрансфераз, γ -глутамилтранспептидазы, ферментов промежуточного обмена НСС, концентраций общего билирубина, цистатионин- β -синтазы, метионаденозилтрансферазы выполнено соискателем лично. Гистологические и электронно-микроскопические исследования структуры печени проведены совместно с сотрудниками НИЛ ГрГМУ, канд. биол. наук Р. И. Кравчук и канд. биол. наук, доцентом О. Б. Островской. Математическая обработка, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка публикаций осуществлена автором самостоятельно. Основные научные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично и представлены в статьях. Вклад соискателя в опубликованные работы составляет 81,35%.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Основные положения работы представлены в виде докладов на IV, V, VI республиканских научно-практических конференциях с международным участием «Современные достижения молодых ученых в медицине» (Гродно, 2017-2019); III Международном симпозиуме «Метаболический синдром:

эксперимент, клиника, терапия» (Гродно, 2017); 3rd Congress of Polish Biosciences BIO2018 «Through interdisciplinary approach into new solutions» (Гданьск, 2018); итоговых научно-практических конференциях «Актуальные проблемы медицины» (Гродно, 2018-2022); XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2018); научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 60-летию УО «Гродненский государственный медицинский университет» (Гродно, 2018); II Белорусском биохимическом конгрессе «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 2018); X и XII республиканских научно-практических конференциях с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины» (Гомель, 2018, 2020); 1-й белорусско-польско-литовской научной конференции «Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм» (Гродно, 2018); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований к клинической практике. Традиции и перспективы» (Тюмень, 2019); научно-практических конференциях с международным участием «Актуальные проблемы биохимии» (Гродно, 2019, 2021); LXXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной медицины и фармации» (Минск, 2020); XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2020); Республиканской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В. Т. Парамея (Гродно, 2021).

Результаты исследования внедрены в учебный процесс учреждений высшего образования Республики Беларусь (5 актов внедрения): ГрГМУ и УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы». Утверждено 6 рационализаторских предложений, получен патент на изобретение.

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликованы 44 работы объемом 13,07 авторского листа, в том числе 13 статей в рецензируемых научных изданиях, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, объемом 8,11 авторского листа (из них 3 статьи в журналах РФ), 22 статьи – в сборниках конференций объемом 4,18 авторского листа; 9 тезисов докладов объемом 0,78 авторского листа. Опубликовано 23 работы в единоличном авторстве объемом 4,47 авторского листа. Имеется 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация имеет традиционную структуру, написана на русском языке и включает следующие разделы: «Перечень сокращений и обозначений», «Введение», «Общая характеристика работы», 5 глав, излагающих результаты собственных исследований, «Заключение», «Список использованных источников», «Приложение». Полный объем диссертации составляет 180 страниц компьютерного текста, основной текст размещен на 131 странице, включающей 43 рисунка и 17 таблиц, занимающих 36 страниц. Список использованных источников объемом 33 страницы включает 314 источников, из которых 68 русскоязычных, 246 – на иностранных языках, а также 44 публикации автора.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования. *Моделирование ингибирования фолатного цикла.* В эксперименте использованы 48 крыс-самцов (220-240 г). Фолатный цикл ингибировали метотрексатом (МТХ), который вводили внутривентриально (в/вр), 0,1 мг/кг через день [Пронько П. С. и др., 2013] 7 и 21 сутки (крыс декапитировали через 24 ч после последнего введения), либо однократно 0,1 мг/кг на срок 24 ч и 7 суток.

Моделирование гипергомоцистеинемии и ингибирования фолатного цикла на ее фоне. Использовали 27 крыс-самцов (200-250 г). Внутривентриально (в/ж) вводили L-метионин (3 г/кг·сут, 21 сутки) [Медведев Д. В. и др., 2014], для ингибирования фолатного цикла – МТХ (0,1 мг/кг, в/вр) через день в течение всего эксперимента.

Моделирование острого токсического поражения печени с нарушением обмена серосодержащих АК. Эксперименты выполнены на 30 крысах-самках (120-140 г). В первом эксперименте вводили L-этионин (2,5% в/вр) в суммарной дозе 375 мг/кг трехкратно через каждые 2,5 ч [Нефёдов Л. И. и др., 1988]. Во втором эксперименте этионин вводили в/вр (375 мг/кг в сутки) двукратно через каждые 12 ч в течение 3 суток.

Моделирование хронического токсического поражения печени осуществляли на 36 крысах-самках (165-220 г) путем в/вр введения тиоацетамида (ТАА) через день по 200 мг/кг [Aydin A. F. et al., 2010] в течение 4 и 12 недель. Печень отдельной группы интактных крыс перфузировали [Коптяева К. Е. и др., 2018] с целью исключения влияния примеси крови на уровень Нсу в исследуемой ткани.

Контрольные животные во всех моделях получали количества жидкостей, эквивалентные опытным. Плазму крови получали центрифугированием гепаринизированной крови. Исследуемые ткани (печень, почки и структуры головного мозга [Glowinsky J., Iversen L. L., 1966]) извлекали и замораживали

в жидком азоте. Правую боковую долю печени забирали для гистологических исследований.

Определение свободных АК в плазме крови и тканях осуществляли методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [Дорошенко Е. М. и др., 2017]. Предметом дальнейшего анализа были концентрации Тау, цистеата (CA), цистеинсульфината (CSA), гомоцистеата (HCA), серина (Ser), глицина (Gly), гипотаурина (HrTau), α -аминобутирата (aABA), метионина (Met) и цистатионина (Ctn).

Определение аминотиолов в тканях методом ВЭЖХ с использованием условий, оптимизированных для плазмы крови [Дорошенко Е. М. и др., 2017], оказалось невозможным ввиду интерференции неизвестных соединений и пика Hcy. Чтобы получить достаточное разрешение пика Hcy, использовали сорбент, допускающий нулевую концентрацию органического модификатора (Zorbax SB C₁₈, 2,1×300 мм). Ткани гомогенизировали в 0,15 М KCl, содержащем 1 мМ N-ацетилцистеина (NAC, внутренний стандарт) и 12 г/л ТСЕР, в соотношении 1:5. Пробы инкубировали при комнатной температуре 30 мин [Krijt J. et al., 2001]. Белки осаждали 10% трихлоруксусной кислотой. Аминотиолы дериватизировали SBD-F (0,17 мг/мл) в 0,075 М Na-боратном буфере (pH 9,5) 1 ч при 60°C [Durand P. P. et al., 1996; Ubbink J. B. et al., 1991, в собственной модификации], нейтрализовали 0,2 М HClO₄. Для калибровки использовали смесь стандартов Hcy, GSH, цистеина (Cys), цистеинилглицина (CysGly), γ -глутамилцистеина (gGluCys). Элюирование 0,18 М Na-фосфатным буфером, pH 3,5; с 26 мин – градиент 70% ацетонитрила 0-25% (27 мин). Детектирование по флуоресценции, 379/510 нм. Порядок элюирования (рисунок 1): Cys, Hcy, CysGly, gGluCys, GSH, NAC.

Аналитический выход для Hcy составил 103,7±4,9%. Уровень Hcy в отмытой от крови печени статистически значимо не отличался от такового в неперфузированной печени (0,73±0,067 и 0,80±0,068 нмоль/г, соответственно). *Определение аминотиолов в плазме крови* выполнено с помощью укороченной версии метода их определения в тканях [17].

Для подтверждения поражения печени выполняли гистологические и электронно-микроскопические исследования [Reynolds E. S., 1963; Волкова О. В., Елецкий Ю. К., 1982]. Активность каталазы определяли с молибдатом аммония [Королук М. А. и др., 1988], трансаминаз (АлАТ и АсАТ) – кинетически; содержание общего билирубина – по Йендрашику, диеновых (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК) – по поглощению при 233 и 278 нм, соответственно [Камышников В. С., 2000]. Малоновый диальдегид (МДА) определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [Bartosz G., 2003], церулоплазмин – по методу Равина [Камышников В. С., 2000], эндогенный сероводород – по реакции с N,N-диметил-*p*-фенилендиамином в

присутствии FeCl_3 [Norris E. J. et al., 2011]. Активность цистатионин- β -синтазы, цистатионин- γ -лиазы, цистеинаминотрансферазы и тиосульфатдифенилтрансферазы определяли фотометрически по реакции с N,N-диметил-*p*-фенилендиамин [Zaichko N. V. et al., 2014; Banerjee R., 2015]. Концентрации метионаденозилтрансферазы, цистатионин- β -синтазы в плазме крови определяли методом ИФА (наборы Rat Mat1a, Rat Cbs, Wuhan Fine Biotech Co.).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Парные сравнения проводили *t*-критерием Стьюдента для независимых выборок после контроля нормальности критерием Шапиро-Уилка, сравнение более двух групп – однофакторным дисперсионным анализом с критерием Тьюки. При отклонении распределения от нормального достоверность различий проверяли по Манну-Уитни либо Краскелу-Уоллису. Гомогенность дисперсий контролировали тестом Левена. Для анализа взаимосвязи переменных применяли корреляционный анализ. Для выявления наиболее значимых признаков, оказывающих влияние на пул исследуемых соединений, проводили дискриминантный анализ [Реброва О. Ю., 2002].

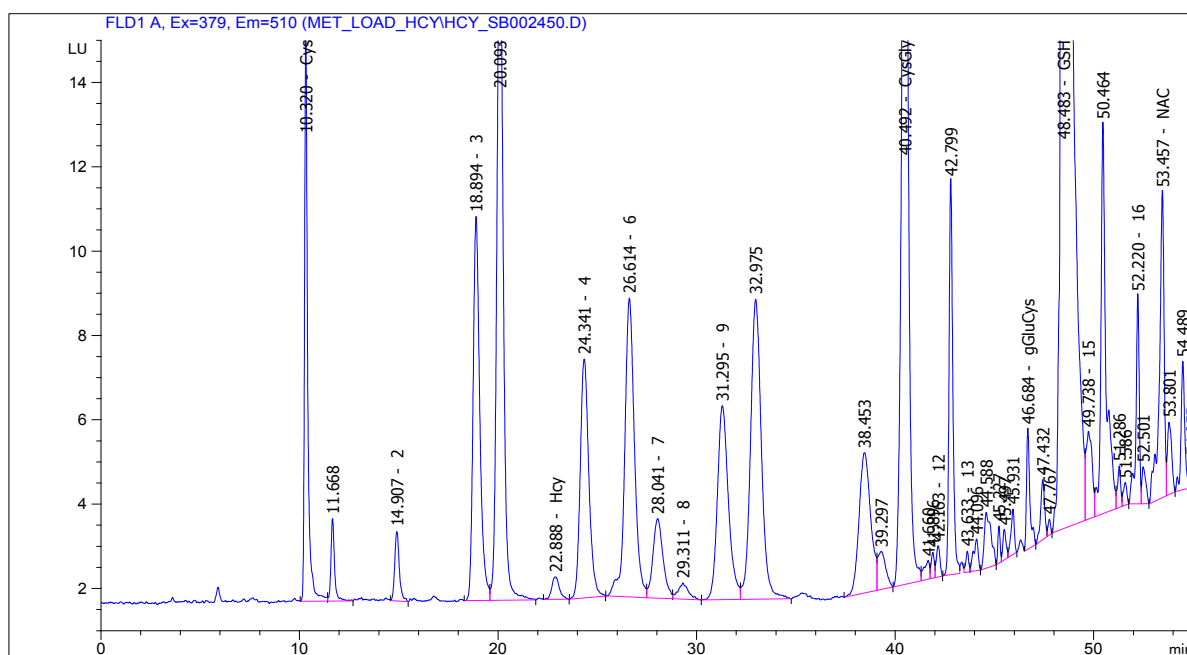


Рисунок 1 – Хроматограмма общих Hcy, Cys, CysGly, gGluCys и GSH ткани печени

Метаболические изменения при ингибировании фолатного цикла.

При однократном введении MTX изменения в пуле НСС тканей были незначительными.

В плазме крови крыс длительное введение MTX (7 и 21 сутки) вызывало снижение уровней ключевых продуктов γ -глутамильного цикла: Cys (в 2,3 и 4,7 раза, соответственно; здесь и далее $p < 0,05$, различаются средние значения, если не указано иное), gGluCys, CysGly и GSH в обеих опытных группах. Кроме того, у животных, получавших MTX в течение 21 суток, снижалось

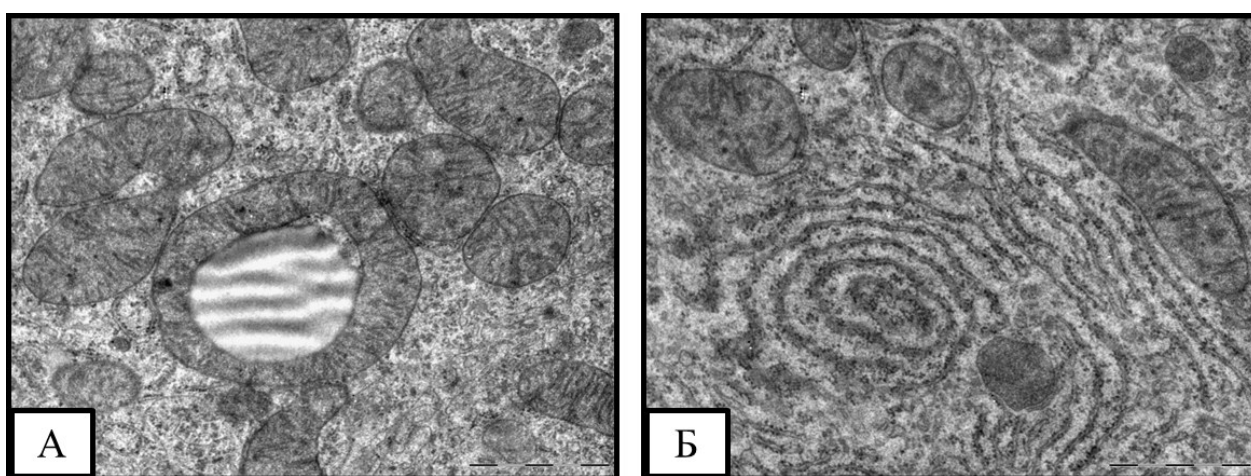
содержание Hcy. При 7- и 21-суточном введении MTX в плазме крови повышались уровни Gly, Met, Tau и снижался уровень Ctn. Так как MTX может ингибировать не только фолатзависимые реакции [Wang Y.-C., Chiang E.-P. I., 2011], можно предположить, что высокие уровни Met объясняются ингибированием метионинаденозилтрансферазы. Повышение уровней Tau и Met по сравнению с контролем указывало на более значимую роль транссульфурирования Hcy и его превращения в Tau, но не в GSH, чем реметилирования. Сниженный уровень GSH в плазме крови может быть связан с его расходом. При 7-суточном введении MTX, кроме указанных изменений, в плазме крови повышался уровень Ser. Полиглутаматы MTX могут ингибировать метилентетрагидрофолатредуктазу [Cronstein B. N., Aune T. M., 2020], что возможно объясняет изменение уровней Ser и Gly.

В ткани печени при 7-суточном ингибировании фолатного цикла повышались уровни Ctn, Hcy, Tau, а также продуктов γ -глутамильного цикла (CysGly, gGluCys и GSH). Это позволяет предположить, что нарушено реметилирование Hcy и транссульфурирование, но активен синтез GSH и Tau. При 21-суточном воздействии MTX наблюдались схожие изменения, а также повышение уровней СА и исследуемых аминотиолов (Cys, CysGly, gGluCys и GSH). При этом только через 21 сутки значимо снижался уровень HpTau и повышался – СА в ткани печени, что указывает на изменение относительной значимости конечных этапов синтеза Tau, а рост его уровня через 7 суток введения MTX мог быть проявлением антиоксидантных свойств Tau [Нефёдов Л. И., 1999].

Влияние гипергомоцистеинемии на концентрации серосодержащих аминокислот и аминотиолов в тканях. Длительное введение L-метионина (3 г/кг·сут, 21 сутки) вызывало гипергомоцистеинемию. В плазме крови повышались уровни Met, HpTau (более чем в 5 раз), GSH, Tau (в 1,9 раза) и снижались уровни Ser и Gly. При этом концентрация цистатионин- β -синтазы увеличилась; развивались ультраструктурные изменения в печени, включающие формирование «митохондриальных сфероидов», полей гранулярной эндоплазматической сети с концентрической ориентацией цистерн в виде замкнутых колец (рисунок 2), а также индукция фиброзных процессов в печени.

В ткани печени крыс после длительной нагрузки метионином наблюдалось повышение уровней HCA, Hcy (медианное значение – в 4,2 раза), Ctn (более чем в 5 раз), CSA, HpTau (медианное значение – более чем в 10 раз), GSH, Tau, а также снижение уровней Ser и Gly. Это позволяет предположить, что основные нарушения транссульфурирования происходили на этапе второй реакции. Нагрузка метионином снижает экспрессию и активность цистатионин- γ -лиазы [Aruoma O. I. et al., 1988], активность метионинсинтазы и повышает –

метионаденазолтрансферазы, бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансферазы и цистатионин- β -синтазы в печени [Fukada S. et al., 2006], поэтому одного трансульфурирования может быть недостаточно для удаления Hcy. Первая реакция трансульфурирования может быть ограничена доступностью Ser, но не активностью цистатионин- β -синтазы [Majtan T. et al., 2018]. Нами наблюдалось именно снижение уровня Ser на фоне снижения уровня Gly как в плазме крови, так и в ткани печени и структурах головного мозга крыс. Причиной низкого уровня Gly может быть его активное расходование на образование Ser и/или GSH. В ткани печени, как и в плазме крови, отмечалось более выраженное повышение уровня HpTau по сравнению с Tau. Это может быть связано со снижением активности флавиносодержащей монооксигеназы 1 и/или повышением активности цистеиндиоксигеназы [Stipanuk M. H. et al., 2008].



А) Замкнутый митохондриальный сфероид; Б) Многочисленные цистерны гранулярной эндоплазматической сети в виде замкнутых колец

Рисунок 2 – Ультраструктурные изменения в печени крыс при метионин-индуцируемой гипергомоцистеинемии

В ткани почек крыс метиониновая нагрузка вызывала снижение уровня Ser и повышение уровней Met, Ctn, Hcy (более чем в 9 раз) и gGluCys. Эти изменения, как и в ткани печени, могут быть обусловлены высокой активностью цистатионин- β -синтазы, однако скорость трансульфурирования была недостаточной для такого уровня Hcy, так как повышение уровня aABA было менее выраженным (в 2,5 раза). При этом уровень Cys не изменялся, но повышался уровень HSA. В ткани почек на фоне гипергомоцистеинемии синтез Tau осуществлялся, вероятно, преимущественно за счет декарбоксилирования СА, так как его рост (в 1,9 раза) был меньшим, чем HpTau (медианный уровень – в 5,8 раза). Уровни CSA и Tau повышались более чем в 2 раза.

Значимая корреляционная связь между уровнем Hcy плазмы и его уровнем в тканях печени и почек отсутствовала как в контроле, так и в опытной группе.

В исследованных структурах головного мозга крыс нагрузка метионином вызывала повышение уровней Met, Ctn и HpTau. Степень повышения уровня Ctn уменьшалась в ряду: большие полушария > гипоталамус > стриатум > мозжечок > средний мозг. Вероятно, активность цистатионин-β-синтазы не снижалась, на что указывал и рост уровня аАВА во всех исследованных структурах головного мозга. Степень повышения уровня Met уменьшалась в ряду: стриатум (более чем в 4 раза) > мозжечок > средний мозг > гипоталамус > большие полушария; уровня HpTau – стриатум > большие полушария > гипоталамус > средний мозг > мозжечок. Значительное повышение уровня HpTau во всех исследованных структурах головного мозга на фоне сравнительно меньшего роста уровня Tau, возможно, обусловлено теми же механизмами, что и в тканях печени и почек.

При введении МТХ (0,1 мг/кг, 21 сутки) на фоне метиониновой нагрузки сохранялись высокие уровни Hcy и других серосодержащих АК в плазме крови, тканях печени и почек, где также отмечались сдвиги в показателях транссульфурирования (повышение уровня Hcy более чем в 3 и 5 раз, Ctn более чем в 7 и 3 раза, но снижение – Ser более чем в 5 и 1,5 раза, соответственно) и синтеза Tau (резкий рост уровня HpTau (медианное значение – более чем в 100 раз и 20 раз, соответственно) на фоне незначительного повышения уровня Tau. Концентрация метионаденозилтрансферазы в плазме крови снижалась, но повышались содержание цистатионин-β-синтазы и активность АлАТ. Это согласуется с данными, указывающими на высокую активность цистеиндиоксигеназы и ингибирование цистеинсульфинатдекарбоксилазы при нагрузке метионином [Нефёдов Л. И., 1999].

Корреляции между уровнями Hcy в плазме крови, с одной стороны, и тканях печени и почек, с другой, при ингибировании фолатного цикла на фоне гипергомоцистеинемии также отсутствовали.

В различных отделах головного мозга крыс ингибирование фолатного цикла МТХ на фоне гипергомоцистеинемии сопровождалось ростом уровней серосодержащих АК. В мозжечке регистрировался наиболее интенсивный рост уровня HpTau, в гипоталамусе – Ctn, в стриатуме – Met, а в больших полушариях, среднем мозге и гипоталамусе повышалось содержание Tau.

По результатам дискриминантного анализа, для всех трех исследуемых тканей различия между контролем и опытными группами наблюдались вдоль корня 1, а между опытными группами – корня 2 (кроме головного мозга) (рисунок 3). Во всех случаях имела высокая связь уровня HpTau с этим корнем: положительная в ткани печени и отрицательная – почек, а взаимное расположение групп для этих тканей вдоль корня 2 было противоположным, что согласуется с более высокими уровнями HpTau в тканях в группе с ингибированием фолатного цикла на фоне метиониновой нагрузки. Полного

разграничения опытных групп между собой в головном мозге, в отличие от остальных тканей и плазмы крови, по корню 2 не наблюдалось. Таким образом, более высокий уровень НpTau позволяет разграничить группу с ингибированием фолатного цикла от группы без таковой на фоне метионин-индуцируемой гипергомоцистеинемии.

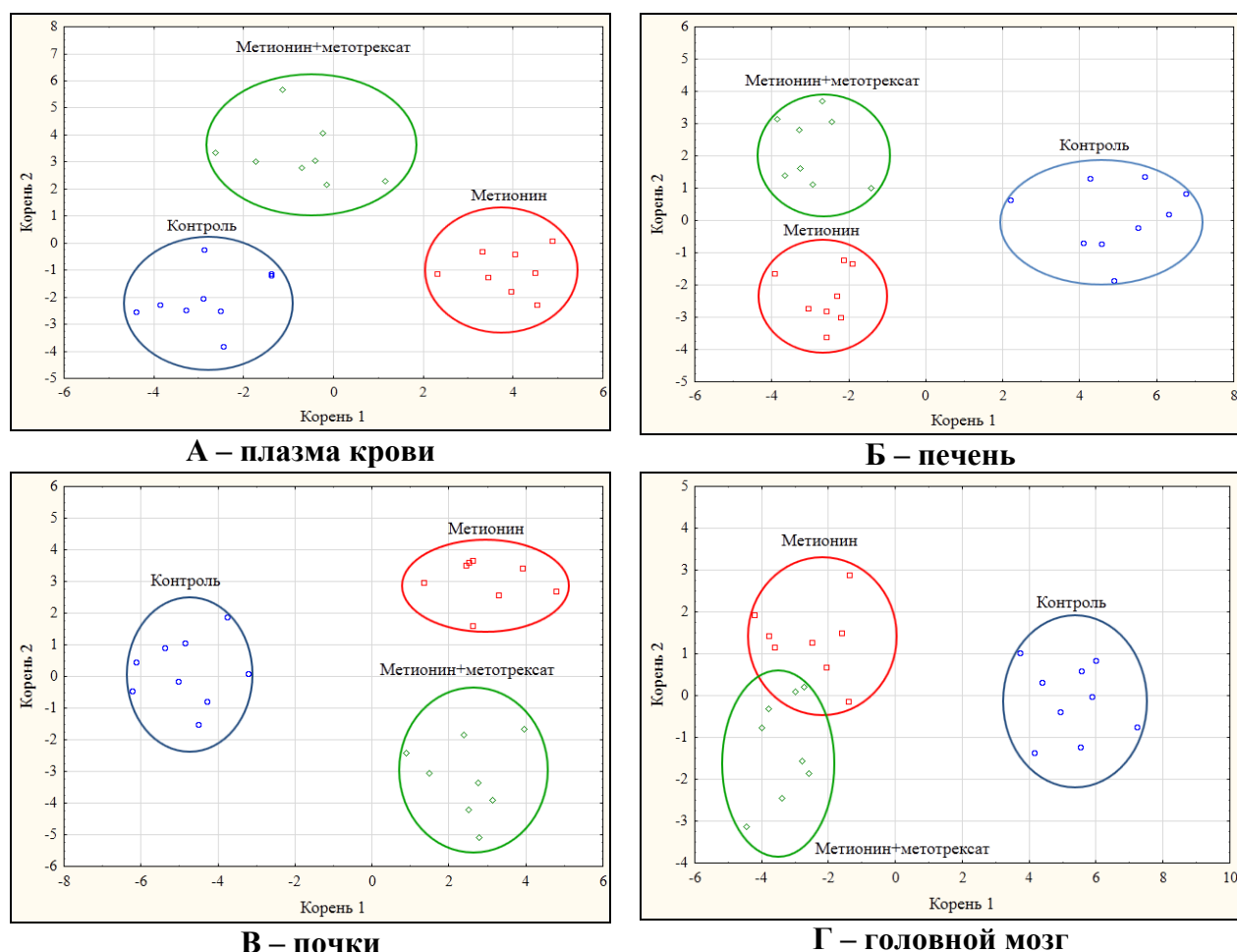


Рисунок 3 – Проекция реализаций на плоскости двух главных компонент

Пул серосодержащих аминокислот и их дериватов в тканях крыс при остром и хроническом токсическом поражении печени. Серосодержащие аминокислоты и аминотиолы плазмы крови и тканей крыс после введения этионина. Введение этионина (375 мг/кг в сутки, 1 и 3 суток) привело к структурным изменениям в печени крыс, характерным для умеренного острого гепатита. Активность АлАТ увеличивалась при его суточном введении, а АсАТ – при трехсуточном. В связи с большей выраженностью метаболических отклонений для дальнейшего анализа выбрана последняя модель, в которой повышались уровни Нсу, Cys, gGluCys, GSH, а также НpTau, Tau, Ser и Gly в плазме крови (рисунок 4).

В ткани печени введение этионина вызывало снижение уровня Нсу и повышение уровней НСА, НpTau (более чем в 3 раза), GSH (в 1,3 раза),

а также Ser и Gly (рисунок 5). Повышение уровней Ser и Gly могло быть связано с торможением синтеза S-аденозилметионина и снижением использования Ser в транссульфурировании. Повышение уровня HpTau говорит об активном функционировании цистеиндиоксигеназного пути.

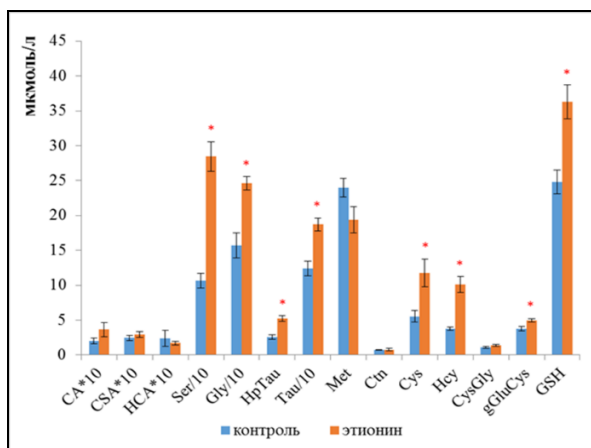


Рисунок 4 – Уровни НСС и родственных им соединений в плазме крови крыс после введения этионина

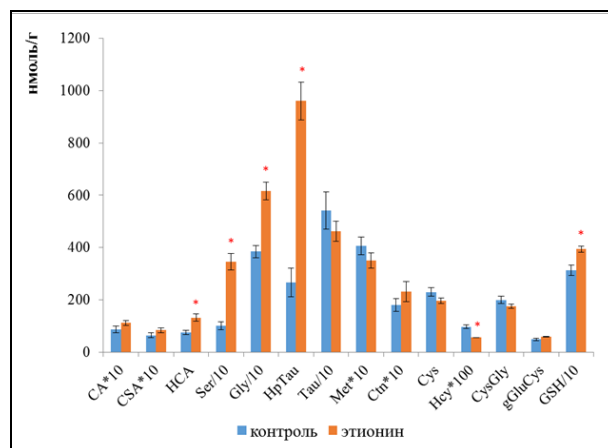


Рисунок 5 – Уровни НСС и родственных им соединений в ткани печени крыс после введения этионина

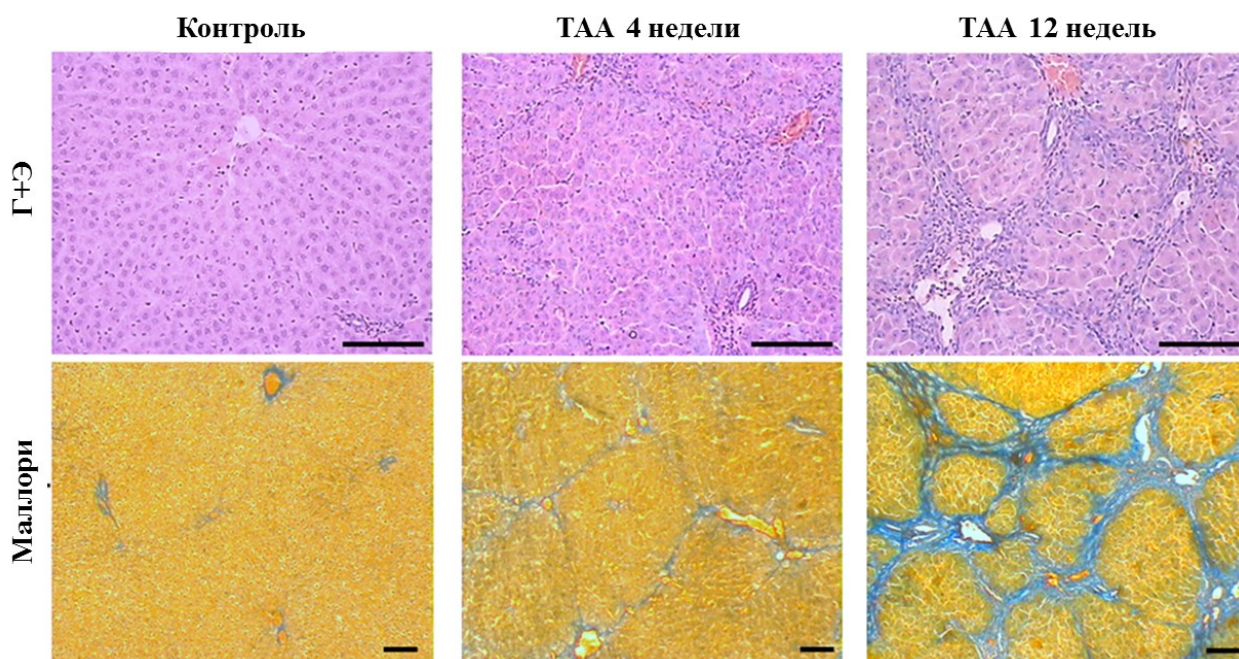
В ткани почек крыс после трехсуточного введения этионина повышался уровень Ser, снижались – Cys и gGluCys. Это указывает на нарушение превращений Cys, синтеза GSH и/или трансметилирования.

В больших полушариях головного мозга снижался уровень Met, повышались – Hcy и Ctn. Так как активность цистатионин-β-синтазы в головном мозге выше, чем γ-цистатиназы [Наумов А. В., 2013], повышение уровня Ctn, которое наблюдалось также в стриатуме, среднем мозге и мозжечке, могло быть вызвано низкой активностью последней. Уровень Ser повышался в среднем мозге, гипоталамусе и мозжечке, HpTau – во всех исследованных структурах мозга.

Корреляция между уровнями Hcy в исследованных тканях и плазме крови в данной модели отсутствовала. Однако после суточного введения этионина в дозе 375 мг/кг имела место корреляция уровней Hcy в плазме и больших полушариях ($r=0,97$).

Фонд свободных аминокислот в тканях крыс при экспериментальном тимоацетамидном поражении печени. Через 12 нед. введения ТАА развивался мелкоузловой цирроз печени с выраженным фиброзом и перестройкой дольковой структуры (рисунок 6).

ТАА-цирроз печени вызывал нарушение антиоксидантно-прооксидантного баланса в плазме крови: повышение уровней ДК и ТК, активности каталазы и снижение уровня церулоплазмينا. Содержание МДА, активности трансаминаз оставались в пределах контрольных значений.



Верхний ряд – окраска гематоксилином и эозином; нижний ряд – окраска по Маллори.
Мерный отрезок равен 100 мкм

Рисунок 6 – Гистологическая картина печени крыс при введении ТАА

Через 12 нед. введения ТАА в плазме крови повышалось содержание общего билирубина, а также Tau, Met и CysGly (рисунок 7), цистатионин- β -синтазы и эндогенного сероводорода. Дискриминантным анализом установлено, что в плазме крови наиболее информативными для дискриминации групп являлись уровни Ser, Gly, Tau и GSH (лямбда Уилкса = 0,02747; $p < 0,00001$).

В ткани печени при 12-недельном введении ТАА зарегистрировано снижение уровней CA, CSA, Tau и повышение – Ser, Gly, Cys, CysGly, gGluCys, GSH (в 1,2 раза) и HpTau (более чем в 4 раза) (рисунок 8). Активности цистатионин- β -синтазы и цистеинаминотрансферазы значимо не изменялись, а цистатионин- γ -лиазы – повышалась по сравнению с контролем. Повышение уровней Gly, Ser и Cys в ткани печени, возможно, связано с влиянием ТАА на транссульфирование. Повышение уровня GSH может объясняться индукцией субъединиц γ -глутамилцистеинсинтетазы под действием ТАА [Lu S. C. et al., 1990]. Уровни Met, Hcy и Ctn, активность цистатионин- β -синтазы при 12-недельном введении ТАА соответствовали контролю. Снижение уровней Tau, CA и CSA указывает на нарушение заключительных этапов синтеза Tau: декарбоксилирования CA и/или окисления HpTau, но не на низкую активность цистеиндиоксигеназы, так как уровень HpTau повышен значительно сильнее, чем уровень Cys. По результатам дискриминантного анализа наибольший вклад в общее различие групп вносили уровни aABA, Ser, CA и HCA (лямбда Уилкса = 0,00633; $p < 0,00001$).

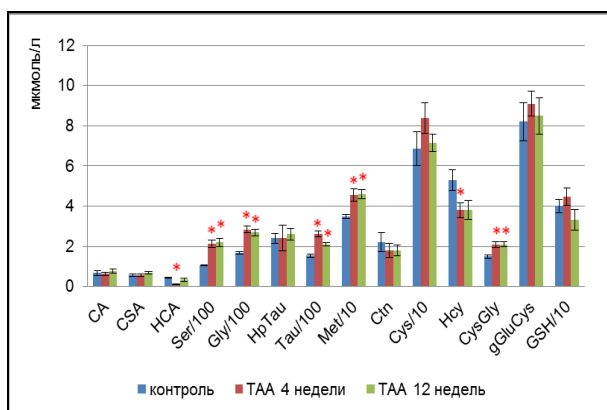


Рисунок 7 – Уровни НСС и родственных им соединений в плазме крови после введения ТАА

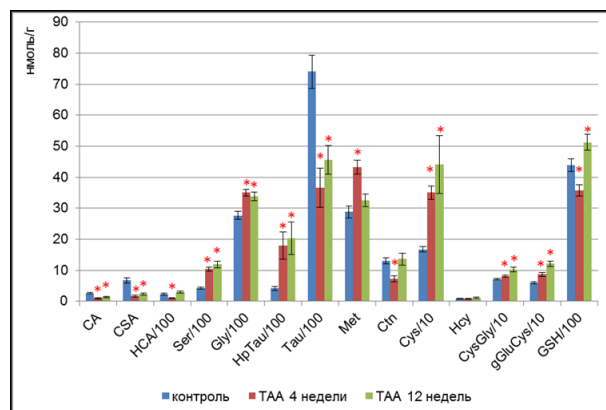


Рисунок 8 – Уровни НСС и родственных им соединений в ткани печени после введения ТАА

В ткани почек при ТАА-циррозе печени наблюдалось повышение содержания GSH, что указывает на активацию его синтеза, как и в ткани печени. Повышение уровня aABA (более чем в 6 раз) говорит об активации транссульфурирования. Реметилирование Hcy и синтез Tau в ткани почек не ингибировались, так как уровни Met, Hcy, Cys, CA, CSA, HpTau и Tau значительно не изменялись. Для дискриминации групп в ткани почек крыс наиболее информативными были уровни GSH, gGluCys, aABA, Gly и Ser (лямбда Уилкса = 0,00973; $p < 0,00001$).

В больших полушариях головного мозга крыс введение ТАА в течение 12 нед. приводило к повышению уровней Tau и снижению – Hcy (более чем в 2 раза). При этом содержание Ctn и Cys значительно не изменялось. Снижались концентрации GSH, gGluCys (более чем в 10 раз) и повышались – CysGly на фоне неизменного уровня Gly. В больших полушариях головного мозга наиболее информативными для дискриминации групп были уровни gGluCys, aABA, CysGly, Tau, Ser, CA, HCA и Cys (лямбда Уилкса = 0,0007; $p < 0,00001$). В мозжечке повышались уровни Ser, Met, Ctn, снижались – Cys и Hcy (более чем в 2 раза), gGluCys (более чем в 10 раз), GSH и CSA. Повышение уровня Met и снижение уровня Hcy может говорить о нарушении трансметилирования. Как и в больших полушариях, концентрации метаболитов γ -глутамильного цикла (особенно gGluCys) снижались. В среднем мозге наблюдался рост уровней CSA и Tau. В гипоталамусе повышались уровни Ser и Ctn, в стриатуме – HpTau. Уровень Tau в мозжечке, гипоталамусе и стриатуме не изменялся.

Корреляция между уровнями Hcy в тканях печени, почек, структурах головного мозга и плазме крови при ТАА-индуцированном циррозе печени отсутствовала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработан новый метод хроматографического определения низкомолекулярных тиолсодержащих соединений (гомоцистеина, цистеина, цистеинилглицина, γ -глутамилцистеина и глутатиона), обладающий высокой чувствительностью, воспроизводимостью и разрешающей способностью, позволяющими осуществлять их количественное определение в животных тканях. Преимуществами метода являются разделение пиков всех аналитов до базовой линии и низкие потери: аналитический выход для цистеина $97,3 \pm 15,1\%$; для гомоцистеина – $103,7 \pm 4,9\%$; для глутатиона – $95,5 \pm 14,0\%$ [5; 17; 45].

2. Однократное введение метотрексата (0,1 мг/кг) через 24 часа не вызывает существенных сдвигов в пулах низкомолекулярных серосодержащих соединений плазмы крови, ткани почек и структурах головного мозга крыс. При этом в ткани печени общее количество аминотиолов увеличивается за счет глутатиона (повышался на 29% на фоне снижения содержания цистеина и цистеинилглицина на 48 и 23%, соответственно, здесь и далее $p < 0,05$). Через 7 суток после однократного введения метотрексата (0,1 мг/кг) развивается гипергомоцистеинемия, в ткани печени повышается уровень γ -глутамилцистеина на 23%, в ткани почек – содержание цистеинсульфината на 63% и таурина на 25%. При этом в исследованных структурах головного мозга (большие полушария, мозжечок, стриатум, гипоталамус, средний мозг) происходят разнонаправленные изменения в содержании низкомолекулярных серосодержащих соединений, но более выраженные сдвиги их уровней наблюдаются через 24 часа.

Многократное введение метотрексата (0,1 мг/кг через день в течение 7 и 21 суток) вызывает обеднение пула аминотиолов плазмы крови, преимущественно за счет снижения уровней цистеина, цистеинилглицина, γ -глутамилцистеина и глутатиона, но повышает содержание цистеинилглицина, γ -глутамилцистеина, глутатиона и гомоцистеина в ткани печени. При этом в ткани печени через 7 суток повышаются уровни таурина на 127% и цистатионина на 54%, а через 21 сутки снижается уровень гипотаурина на 48% и повышается содержание цистеиновой кислоты на 51% [1; 2; 6; 14–16; 25; 35–37].

3. Длительное введение метионина (3 г/кг, 21 сутки) сопровождается повышением уровней большинства низкомолекулярных серосодержащих соединений в плазме крови, тканях печени и почек, наиболее выражен рост уровня гипотаурина (в 5,2; 12,1 и 5,8 раза, соответственно), таурина (в 1,9; 1,7 и 2,0 раза, соответственно) и гомоцистеина (в 3,8; 4,2 и 9,8 раза, соответственно). При этом во всех исследованных структурах головного мозга повышаются уровни метионина, цистатионина, α -аминомасляной кислоты и гипотаурина.

Ингибирование фолатного цикла метотрексатом на фоне длительного введения метионина не изменяет направленность этих нарушений. Однако в плазме крови, тканях печени и почек резко повышается уровень гипотаурина (в 19,4; 147,0 и 23,8 раза, соответственно). Во всех исследованных структурах головного мозга повышаются также уровни метионина, цистатинина и гипотаурина [3; 4; 7–9; 19–24; 26; 28; 38; 39; 41].

4. Введение этионина (375 мг/кг в течение 1 и 3 суток) вызывает морфологические изменения в печени крыс, характерные для острого гепатита. Через 1 сутки после введения этионина в плазме крови повышаются уровни цистатинина на 174% и таурина на 48%. Общей чертой в тканях печени и почек является повышение уровня глутатиона (на 51 и 83%, соответственно) и снижение содержания его предшественника – цистеина (на 39 и 35%, соответственно), в плазме крови и больших полушариях головного мозга – повышение уровня гомоцистеина (на 90 и 67%, соответственно). Введение этионина в течение 3 суток вызывает большее количество сдвигов в пуле низкомолекулярных серосодержащих соединений, чем его суточное введение, наиболее постоянными из которых является повышение уровня гипотаурина в плазме крови, тканях печени, почек и исследуемых структурах головного мозга [10; 18; 29; 42–44].

5. Введение тиацетамида (200 мг/кг через день в течение 12 недель) вызывает развитие мелкоузлового цирроза печени, сопровождающегося повышением в плазме крови суммарного количества свободных аминокислот, содержания диеновых/триеновых конъюгатов, цистатинин-β-синтазы, эндогенного сероводорода, общего билирубина, активности каталазы и γ-глутамилтранспептидазы. При этом в плазме крови и структурах головного мозга повышается общее количество низкомолекулярных серосодержащих соединений (преимущественно таурина и цистеинилглицина), а в тканях почек и печени наблюдается повышение содержания глутатиона (в 2,8 и 1,2 раза, соответственно) и гипотаурина (в 14,6 и 4,8 раза, соответственно). В ткани печени активируется транссульфурирование (повышение активности цистатинин-γ-лиазы и уровня цистеина) и тормозится синтез таурина на уровне окисления гипотаурина (повышение уровня гипотаурина на 384% и снижение содержания цистеата на 46%, цистеинсульфината на 66% и таурина на 38%) [11–13; 27; 30–34; 40].

6. Как у интактных животных, так и при нарушениях метаболизма низкомолекулярных серосодержащих соединений различного генеза (введение метотрексата, этионина, тиацетамида и высоких доз метионина) уровни гомоцистеина ни в одной из исследованных тканей (печень, почки, головной мозг) не коррелируют с таковым в плазме крови, кроме головного мозга при 24-часовом воздействии этионина в дозе 375 мг/кг [7; 9; 10; 13; 29; 42].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. При определении общих аминотиолов в тканях с помощью ВЭЖХ рекомендуется объединить гомогенизацию ткани и восстановление тиолов, использовать подвижную фазу с pH 3,5, сорбент, допускающий нулевую концентрацию органического модификатора; контролировать аналитический выход, а также осуществлять регенерацию предколонок. Для определения предшественников таурина методом ВЭЖХ рекомендуется оптимизированный профиль градиентного элюирования (удостоверения на рационализаторские предложения от 26.04.2013 № 1643, от 23.05.2014 № 1668-1670, патент на изобретение № 23647 [45]).

2. Данные о пуле серосодержащих АК и родственных соединений в плазме крови и ткани печени при экспериментальной гипергомоцистеинемии, а также о способе моделирования тиацетамидного поражения у крыс используются в учебном процессе (внедрено в ГрГМУ, 2 акта внедрения от 09.06.2020).

Сведения о разработанном методе хроматографического определения низкомолекулярных аминотиолов, о влиянии метотрексата и этионина на уровни низкомолекулярных серосодержащих соединений в тканях крыс используются в учебном процессе (внедрено в ГрГМУ и УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», акты внедрений от 22.11.2018, 24.12.2021, 29.04.2021, 27.05.2021, соответственно).

Вышеизложенные сведения рекомендуются к более широкому использованию при проведении научных исследований, разработке способов метаболической коррекции и в учебном процессе учреждений высшего образования.

3. Способ моделирования гипергомоцистеинемии путем введения этионина может быть рекомендован при разработке способов лечения заболеваний печени (удостоверение на рационализаторское предложение от 10.06.2019 № 1800).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, соответствующих п. 19

Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий

1. **Новгородская, Я. И.** Влияние антогониста фолиевой кислоты метотрексата на концентрации серосодержащих соединений в плазме крови крыс / **Я. И. Новгородская**, М. Н. Курбат // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 5: Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2018. – Т. 8, № 2. – С. 133–140.

2. **Новгородская, Я. И.** Влияние метотрексата на пул низкомолекулярных серосодержащих соединений в головном мозге крыс / **Я. И. Новгородская**, М. Н. Курбат, Е. М. Дорошенко // Нейрохимия. – 2019. – Т. 36, № 2. – С. 164–169.

3. **Новгородская, Я. И.** Сравнительная характеристика пула серосодержащих аминокислот в структурах головного мозга интактных крыс / **Я. И. Новгородская**, М. Н. Курбат // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы. – 2019. – Т. 46. – С. 232–240.

4. Морфологические изменения в печени крыс при гипергомоцистеинемии / **Я. И. Новгородская**, Р. И. Кравчук, О. Б. Островская, М. Н. Курбат // Гепатология и гастроэнтерология. – 2019. – Т. 3, № 1. – С. 93–98.

5. Дорошенко, Е. М. Лабораторно-диагностическая технология одновременного определения в пробе анализируемого материала (ткани, биологической жидкости) гомоцистеина и других физиологически активных аминотиолов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е. М. Дорошенко, **Я. И. Новгородская** // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2020. – Т. 9. – № 1–2. – С. 135–143.

6. **Новгородская, Я. И.** Изменения в фонде серосодержащих соединений плазмы крови и печени крыс при ингибировании фолатного цикла метотрексатом / **Я. И. Новгородская**, М. Н. Курбат // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рецензир. ежегод. сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: С. П. Рубникович, В. Я. Хрыщанович. – Минск: ИВЦ Минфина, 2020. – Вып. 10. – С. 364–368.

7. **Новгородская, Я. И.** Эффекты гипергомоцистеинемии на показатели пула низкомолекулярных серосодержащих соединений в печени крыс / **Я. И. Новгородская**, Е. М. Дорошенко, М. Н. Курбат // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 11–16.

8. **Новгородская, Я. И.** Изменение концентраций серосодержащих аминокислот в головном мозге после метиониновой нагрузки в эксперименте / **Я. И. Новгородская**, Е. М. Дорошенко, М. Н. Курбат // Известия НАН Беларуси. Серия медицинских наук. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 461–469.

9. **Новгородская, Я. И.** Сравнительный анализ пула серосодержащих аминокислот в плазме крови и печени крыс и гистологическая структура печени после ингибирования фолатного цикла на фоне длительного введения метионина / **Я. И. Новгородская**, Р. И. Кравчук, О. Б. Островская // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 5: Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2020. – Т. 10, № 3. – С. 150–158.

10. **Новгородская, Я. И.** Эффекты этионина на тканевые уровни гомоцистеина и других серосодержащих соединений у крыс / **Я. И. Новгородская**, В. М. Шейбак, О. Б. Островская // Новости медико-биологических наук. – 2020. – Т. 20, № 4. – С. 55–61.

11. Способ моделирования экспериментального тиацетамидного поражения печени у крыс / **Я. И. Новгородская**, О. Б. Островская, Р. И. Кравчук, Е. М. Дорошенко, И. Э. Гуляй, А. Ю. Алещик, С. Я. Шалесная, М. Н. Курбат // Гепатология и гастроэнтерология. – 2020. – Т. 4, № 1. – С. 90–95.

12. **Новгородская, Я. И.** Показатели фонда свободных аминокислот и их дериватов в плазме крови и печени крыс при введении тиацетамида / **Я. И. Новгородская**, М. Н. Курбат // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2021. – Т. 19, № 6. – С. 679–685.

13. **Новгородская, Я. И.** Гомоцистеин и другие серосодержащие соединения в тканях крыс при тиацетамидном поражении печени / **Я. И. Новгородская** // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2021. – Т. 20, № 2. – С. 12–17.

Материалы научных конференций

14. **Новгородская, Я. И.** Содержание гомоцистеина в плазме крови крыс при 7-суточном воздействии метотрексата [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Современные достижения молодых ученых в медицине : сборник статей IV Республиканской научно-практической конференции с международным участием, 24 ноября 2017 г. / ГрГМУ ; редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 164–167. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

15. **Новгородская, Я. И.** Влияние фолатного дефицита на уровни серосодержащих соединений в среднем мозге крыс [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы медицины : материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (25-26 января 2018 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. В. А. Снежицкий. – Гродно, 2018. – С. 566–569. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

16. **Новгородская, Я. И.** Влияние метотрексата на уровни свободных аминокислот в мозжечке крыс [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Проблемы и перспективы развития современной медицины : сборник научных

статей X Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых (г. Гомель, 3-4 мая 2018 года) / ГомГМУ ; А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2018. – С. 889–891. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

17. Дорошенко, Е. М. Метод определения аминотиолов, включая показатели гамма-глутамильного цикла, в плазме крови [Электронный ресурс] / Е. М. Дорошенко, **Я. И. Новгородская** // Материалы республиканской с международным участием научно-практической конференции, посвященной 60-летию Гродненского государственного медицинского университета (28 сентября 2018 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. В. А. Снежицкий. – Гродно, 2018. – С. 280–283. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

18. Влияние этионина на уровень гомоцистеина и серосодержащих производных аминокислот в плазме крови крыс [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская**, М. Н. Курбат, Е. М. Дорошенко, А. Ю. Павлюковец, В. М. Шейбак // Материалы республиканской с международным участием научно-практической конференции, посвященной 60-летию Гродненского государственного медицинского университета (28 сентября 2018 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. В. А. Снежицкий. – Гродно, 2018. – С. 599–602. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

19. **Новгородская, Я. И.** Уровень серосодержащих аминокислот в плазме крови крыс после метиониновой нагрузки [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы медицины : материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции (25 января 2019 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. В. А. Снежицкий. – Гродно, 2019. – С. 417–419. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

20. **Новгородская, Я. И.** Пул серосодержащих соединений в коре больших полушарий крыс при гипергомоцистеинемии [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы биохимии : сборник материалов научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию создания кафедры биологической химии ГрГМУ (31 мая 2019 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. В. В. Лелевич. – Гродно, 2019. – С. 229–232. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

21. **Новгородская, Я. И.** Фонд низкомолекулярных серосодержащих соединений в мозжечке крыс после метиониновой нагрузки [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Современные достижения молодых ученых в медицине 2019: сборник материалов конференций VI Республиканской научно-практической конференции с международным участием, 29 ноября 2019 г. / ГрГМУ ; редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред.) и др. – Гродно, 2019. – С. 190–193. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).

22. **Новгородская, Я. И.** Низкомолекулярные серосодержащие соединения в некоторых отделах головного мозга крыс после метиониновой нагрузки [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Современные достижения молодых ученых в медицине 2019 : сборник материалов VI Республиканской научно-практической конференции с международным участием, 29 ноября 2019 г. / ГрГМУ ; редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2019. – С. 193–197. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

23. **Новгородская, Я. И.** Превращения серосодержащих аминокислот в мозге крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы медицины : сб. материалов итоговой научно-практической конференции (24 января 2020 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. В. А. Снежицкий. – Гродно: 2020. – С. 517–520. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

24. **Новгородская, Я. И.** Влияние экспериментальной метиониновой нагрузки на пул серосодержащих аминокислот в почках крыс [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы медицины : сб. материалов итоговой научно-практической конференции (24 января 2020 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. В. А. Снежицкий. – Гродно: 2020. – С. 520–523. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

25. **Новгородская, Я. И.** Морфологические изменения в печени крыс после ингибирования фолатного цикла / **Я. И. Новгородская** // Инновации в медицине и фармации – 2020 : материалы дистанционной научно-практической конференции студентов и молодых ученых / БГМУ ; под. ред. С. П. Рубникова, В. Я. Хрыщановича. – Минск, 2020. – С. 627–631.

26. **Новгородская, Я. И.** Региональные особенности пула низкомолекулярных серосодержащих соединений в головном мозге крыс после ингибирования фолатного цикла на фоне метиониновой нагрузки / **Я. И. Новгородская** // Биохимия и молекулярная биология. Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященный 95-летию основателя института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси академика Ю.М. Островского. – 2020. – Вып. 4. – С. 163–167.

27. **Новгородская, Я. И.** Состояние прооксидантно-антиоксидантной системы при экспериментальном моделировании гепатита/цирроза печени у крыс [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская**, П. К. Кременовский // Проблемы и перспективы развития современной медицины : сборник научных статей XII Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых (г. Гомель, 8 октября 2020 г.): 8 т. / ГомГМУ ; А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель, 2020. – Т. 5. – С. 60–62. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

28. **Новгородская, Я. И.** Серосодержащие аминокислоты и аминотиолы почек крыс после ингибирования фолатного цикла на фоне метиониновой нагрузки / **Я. И. Новгородская** // Студенческая медицинская наука XXI века. V Форум молодежных научных обществ : материалы XX междунар. науч.-практ. кон. студентов и молодых ученых и V Форума молодеж. науч. обществ (Витебск, 28-29 окт. 2020 г.) / ВГМУ ; под ред. А. Т. Щастного. – Витебск, 2020. – С. 94–97.

29. **Новгородская, Я. И.** Гомоцистеин и другие серосодержащие аминокислоты в периферических тканях крыс после введения этионина / **Я. И. Новгородская**, В. М. Шейбак // Здоровье человека в XXI веке. XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием: Сборник научных статей. Казань, 28-29 октября 2020 г. / Под общей редакцией профессора Ксембаева С. С. – Казань, 2020. – С. 291–294.

30. **Новгородская, Я. И.** Роль центральных механизмов при хронической тиацетамидной интоксикации [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы медицины : сб. материалов итоговой научно-практической конференции (28-29 января 2021 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. Е. Н. Кроткова. – Гродно, 2021. – С. 626–629. – 1 электрон. опт. диск. (CD-ROM).

31. **Новгородская, Я. И.** Нарушения метионинового цикла в печени крыс после длительного введения тиацетамида [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы медицины : сб. материалов итоговой научно-практической конференции (28-29 января 2021 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. Е. Н. Кроткова. – Гродно, 2021. – С. 629–632. – 1 электрон. опт. диск. (CD-ROM).

32. **Новгородская, Я. И.** Пул свободных аминокислот в тканях крыс при введении тиацетамида [Электронный ресурс] // **Я. И. Новгородская**, П. К. Кременовский // Сборник материалов республиканской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященного 100-летию со дня рождения Парамея Владимира Трофимовича, 29 апреля 2021 г. / ГрГМУ ; редкол.: Е. Н. Кроткова (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2021. – С. 59–61. – 1 электрон. опт. диск. (CD-ROM).

33. **Новгородская, Я. И.** Метаболические изменения в почках крыс после длительного введения тиацетамида [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы биохимии : сборник материалов научно-практической конференции с международным участием / ГрГМУ ; В. В. Лелевич (отв. ред.), А. Г. Виницкая, И. О. Леднева. – Гродно, 2021. – С. 194–197. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

34. **Новгородская, Я. И.** Аминотиолы тканей головного мозга крыс при экспериментальном циррозе печени [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы медицины : сб. материалов итоговой научно-

практической конференции (27 января 2022 г.) / ГрГМУ ; отв. ред. С. Б. Вольф. – Гродно, 2022. – С. 207–210. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

Тезисы сообщений на научных конференциях

35. **Новгородская, Я. И.** Уровни серосодержащих аминокислот в коре больших полушарий крыс при фолатном дефиците / **Я. И. Новгородская** // Мечниковские чтения – 2018 : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 25-26 апреля 2018 года / под ред. А. В. Силина, С. В. Костюкевича. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2018. – С. 76.

36. **Новгородская, Я. И.** Уровни серосодержащих соединений в плазме крови крыс в условиях фолатного дефицита / **Я. И. Новгородская** // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье : тезисы XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2018. – С. 306–308.

37. **Novogrodskaya, Y.** Methotrexate-induced inhibition of amino acid transport via the gamma-glutamine cycle (GGC) / **Ya. Novogrodskaya**, M. Kurbat// 3rd Congress of Polish Biosciences BIO2018 «Through interdisciplinary approach into new solutions» (Gdansk, 18-21.09.2018). – Gdansk, 2018. – P. 100.

38. **Новгородская, Я. И.** Уровни серосодержащих аминокислот и их дериватов в печени крыс в условиях метиониновой нагрузки [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Сборник материалов конференции студентов и молодых ученых, посвященный 95-летию со дня рождения профессора Обухова Геннадия Алексеевича, 25-26 апреля 2019 г. / ГрГМУ ; редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2019. – С. 352–353. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

39. **Новгородская, Я. И.** Серосодержащие аминокислоты печени крыс после ингибирования фолатного цикла на фоне длительного введения метионина / **Я. И. Новгородская** // Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2020 : сборник тезисов докладов LXXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых / БГМУ ; под редакцией А. В. Сикорского, В. Я. Хрышчановича. – Минск, 2020. – С. 125.

40. **Новгородская, Я. И.** Соматические индексы некоторых внутренних органов у крыс при длительном воздействии тиацетамида / **Я. И. Новгородская**, Е. И. Баранова // Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2020 : сборник тезисов докладов LXXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых / БГМУ ; под редакцией А. В. Сикорского, В. Я. Хрышчановича. – Минск, 2020. – С. 895.

41. **Новгородская, Я. И.** Активность трансаминаз в плазме крови крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии и ингибировании фолатного

цикла на её фоне [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская**, Е. И. Баранова // Сборник материалов конференции студентов и молодых ученых, посвященный 80-летию со дня рождения профессора Болтрукевича Станислава Ивановича, май 2020 г. / ГрГМУ ; редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2020. – С. 374–375. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

42. **Новгородская, Я. И.** Уровни гомоцистеина и других серосодержащих аминокислот в больших полушариях крыс после введения этионина [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская** // Сборник материалов конференции студентов и молодых ученых, посвященный 80-летию со дня рождения профессора Болтрукевича Станислава Ивановича, май 2020 г. / ГрГМУ ; редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2020. – С. 375–376. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

43. **Новгородская, Я. И.** Характер и выраженность сдвигов серосодержащих аминокислот в некоторых отделах мозга после введения этионина [Электронный ресурс] / **Я. И. Новгородская**, П. К. Кременовский // Сборник материалов конференции студентов и молодых ученых, посвященный 80-летию со дня рождения профессора Болтрукевича Станислава Ивановича, май 2020 г. / ГрГМУ ; редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2020. – С. 376–377. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

44. **Новгородская, Я. И.** Анализ фонда серосодержащих аминокислот в некоторых отделах мозга крыс после введения этионина / **Я. И. Новгородская** // Мечниковские чтения – 2020 : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием 3 июня 2020 года / под ред. А. В. Силина, С. В. Костюкевича. Ч. 1. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2020. – С. 75–76.

Патент на изобретение

45. Способ определения гомоцистеина и других тиолсодержащих соединений в животных тканях: пат. ВУ № 2364 / **Я. И. Новгородская**, Е. М. Дорошенко. – Оpubл. 28.02.2022.

РЭЗІЮМЭ

Наваградская Яна Іосіфаўна

Нізкамалекулярныя серазмяшчальныя злучэнні ў тканках пацукоў пры мадэляванні парушэнняў іх метабалізму

Ключавыя словы: серазмяшчальныя амінакіслоты, амінатыёлы, плазма крыві, печань, ныркі, галаўны мозг

Мэта работы: ацаніць асаблівасці фарміравання фонду нізкамалекулярных серазмяшчальных злучэнняў у тканках пацукоў пры мадэляванні парушэнняў іх метабалізму.

Метады даследавання: ВЭВХ, ІФА, спектрафотаметрычныя, марфалагічныя.

Выкарыстаная апаратура: ВЭВХ-храматограф Agilent 1200, ІФА-аналізатар, спектрафотометры.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Прапанаваны новы спосаб храматаграфічнага вымярэння гомацыстэіну, цыстэіну і метабалітаў γ-глутамільнага цыклу ў тканках. Упершыню ўстаноўлены пазаяпчоначнае паходжанне ўзроўню гомацыстэінэміі і накіраванасць зрухаў пулу нізкамалекулярных серазмяшчальных злучэнняў у плазме крыві і тканках пацукоў пры інгібіраванні фалатнага цыклу, метыянін-індукаванай гіпергомацыстэінэміі, паказаны змены ў змяшчэнні нізкамалекулярных серазмяшчальных у тканках пры таксічным паражэнні печані: парушэнне транссульфуравання, назапашванне гіпатаурыну, таурыну і глутатыёну. Праведзена ацэнка ўнёску асобных нізкамалекулярных серазмяшчальных злучэнняў і роднасных ім злучэнняў у фарміраванне іх пулу ў тканках жывёл пры эксперыментальнай гіпергомацыстэінэміі і інгібіраванні фалатнага цыклу на яе фоне, тыёацэтамідным паражэнні печані.

Рэкамендацыі па выкарыстанню. Метад вымярэння гомацыстэіну і іншых амінатыёлаў у тканках можна выкарыстоўваць як аснову для вывучэння метабалізму нізкамалекулярных серазмяшчальных злучэнняў пры паталагічных станах і распрацоўкі метадаў метабалічнай карэкцыі захворванняў печані. Матэрыялы прадстаўленага даследавання могуць быць выкарыстаны ў адукацыйным працэсе ў медыцынскіх і біялагічных установах вышэйшай адукацыі.

Галіна прымянення: біяхімія, эксперыментальная медыцына.

РЕЗЮМЕ

Новгородская Яна Иосифовна

Низкомолекулярные серосодержащие соединения в тканях крыс при моделировании нарушений их метаболизма

Ключевые слова: серосодержащие аминокислоты, аминотиолы, плазма крови, печень, почки, головной мозг

Цель работы: оценить особенности формирования фонда низкомолекулярных серосодержащих соединений в тканях крыс при моделировании нарушений их метаболизма.

Методы исследования: ВЭЖХ, ИФА, спектрофотометрические, морфологические.

Использованная аппаратура: ВЭЖХ-хроматограф Agilent 1200, ИФА-анализатор, спектрофотометры.

Полученные результаты и их новизна. Предложен новый способ хроматографического определения гомоцистеина, цистеина и метаболитов γ -глутамильного цикла в тканях. Впервые установлено внепеченочное происхождение уровня гомоцистеинемии и направленность сдвигов пула низкомолекулярных серосодержащих соединений в плазме крови и тканях крыс при ингибировании фолатного цикла, метионин-индуцированной гипергомоцистеинемии, показаны изменения в содержании низкомолекулярных серосодержащих соединений в тканях при токсическом поражении печени: нарушение транссульфурирования, накопление гипотаурина, таурина и глутатиона. Проведена оценка вклада отдельных низкомолекулярных серосодержащих и родственных им соединений в формирование их пула в тканях животных при экспериментальной гипергомоцистеинемии и ингибировании фолатного цикла на ее фоне, тиацетамидном поражении печени.

Рекомендации по использованию. Метод определения гомоцистеина и других аминотиолов в тканях можно использовать как основу для изучения метаболизма низкомолекулярных серосодержащих соединений при патологических состояниях и разработке методов метаболической коррекции заболеваний печени. Материалы представленного исследования могут использоваться в образовательном процессе в медицинских и биологических учреждениях высшего образования.

Область применения: биохимия, экспериментальная медицина.

SUMMARY

Novogrodskaya Yana

Low-molecular weight sulfur-containing compounds in tissues of rats in experimental disturbances of their metabolism

Key words: sulfur-containing amino acids, aminothiols, blood plasma, liver, kidney, brain

Purpose of the study: assessment of specific features of formation of the pool of low-molecular weight sulfur-containing compounds in tissues of rats under experimental disturbances of their metabolism.

Methods of the study: HPLC, ELISA, spectrophotometry, morphological.

Equipment used: Agilent 1200 HPLC-system, ELISA analyzer, spectrophotometers.

Obtained results and their novelty: A novel method for chromatographic determination of homocysteine, cysteine and metabolites of γ -glutamyl cycle in tissues was elaborated. Extrahepatic origination of the homocysteinemia was established and shifts in the pool of low-molecular weight sulfur-containing compounds in the blood plasma and tissues of rats in inhibition of folate cycle, methionine-induced hyperhomocysteinemia were shown. Changes in the tissue content of low-molecular weight sulfur-containing compounds in toxic liver injury were disturbances in transsulfuration, accumulation of hypotaurine, taurine, and glutathione. The contribution of certain low-molecular weight sulfur-containing and related compounds in the formation of their pool in animal tissues in experimental hyperhomocysteinemia with inhibition of folate cycle as well as in thioacetamide liver injury was estimated.

Recommendations for application. Method of determination of homocysteine and other aminothiols in tissues can be used as a basis for investigation of low-molecular weight sulfur-containing compounds metabolism and development of approaches to metabolic correction of liver diseases. Materials of the study can be used in educational process in medical and biological institutions of higher education.

Area of application: biochemistry, experimental medicine.

Научное издание

Новгородская Яна Иосифовна

**НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ
СОЕДИНЕНИЯ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ
НАРУШЕНИЙ ИХ МЕТАБОЛИЗМА**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия

Подписано в печать 16.11.2022.

Формат 60x84/16. Бумага офсетная.

Гарнитура Таймс. Цифровая печать.

Усл.-печ. л. **1,86**. Уч.-изд. л. **1,56**. Тираж **68 экз.** Заказ **140**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет».
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно.

