

2. Бохан Н. А., Иванова С. А., Левчук Л. А. Серотониновая система в модуляции депрессивного и аддиктивного поведения. – Томск: Изд-вр «Иван Федоров», 2013. – 102 с.

3. Камскова, Ю. Г. Влияние долговременной гипокинезии на физиологические механизмы стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем: автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 03.03.01 ; 03.00.04 / Ю. Г. Камскова ; Тюмен. Гос. Ун-т. – Тюмень, 2004. – 43 с.

4. Коваленко, Е. А. Гипокинезия / Е. А. Коваленко, Н. Н Гусовский. – М.: Медицина, 1990. – 319 с.

5. Копытов, А. В. Фармакотерапия алкогольной зависимости с учетом клинико-генетических особенностей серотониновой нейромедиаторной системы / А. В. Копытов // Медицинский журнал. – 2015. – №4. – С. 70-76.

СОДЕРЖАНИЕ КОФЕРМЕНТА А В КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ – БИОМАРКЕР ДЕФИЦИТА ВИТАМИННОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ

Мойсеёнок А.Г., Омелянчик С.Н., Катковская И.Н.

ГП «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

В текущем году исполняется 75 лет выдающего события в биохимии – идентификации кофермента ацетилирования (КоА, кофермента А) кофактора многочисленных реакций активирования и переноса ацильных групп, основной метаболически активной формы пантотеновой кислоты (ПК, витамин В5, по некоторым данным В3), универсально распространенной в биологических системах. Это открытие Ф. Липмана, удостоенное Нобелевской премии, послужило основанием разработки метода определения КоА, основанного на реакции N-ацетилирования ариламинов [10, 15], в т. ч. в крови человека. Полученные результаты свидетельствовали о присутствии кофермента в кровообращении человека в количестве 3-4 единиц (соответствующих двум γПК) на 1 мл упакованных эритроцитов и внушали определенный оптимизм в применении данного анализа в клинической биохимии, в частности, для выявления В5-дефицитных состояний [15].

Это направление исследований не получило дальнейшего развития в связи с трудно выполняемой (громоздкой) процедурой предложенного метода анализа КоА по реакции ацетилирования с сульфониламидом с использованием реакций деазотирования ацетилируемого продукта реакции и недостаточной чувствительности метода [10], а также формированием концепции о малой вероятности развития недостаточности (дефицита) витамина В5 в организме человека по причине распространенного присутствия ПК в продуктах питания и частичного поступления из биоценоза кишечника. В5-витаминный статус при различных физиологических и патологических состояниях организма оценивался по содержанию ПК в сыворотке (и плазме) крови, цельной крови и моче.

До 1970-х годов биохимическое сообщество придерживалось постулата о КоА как единственной биологически активной форме пантотеновой кислоты, однако открытие 4'-фосфопантетеина, как фрагмента ацил-переносящего белка синтеза жирных кислот и комплексов синтеза антибиотиков – стало новой вехой в понимании биологических функций витамина В5, что, наряду с детализацией процесса биосинтеза КоА, открыло новые возможности получения витаминных и фармакотерапевтических препаратов на основе ПК (различные формы D-пантотенатов, D-пантенол, КоА-содержащие препараты, D-пантетин и др. Важным дополнением универсальных реакций и распространения системы КоА явилась идентификация S-сульфопроизводных пантетина (предшественника КоА) и их роли в физиологии бифидобактерий.

Настоятельная необходимость в разработке доступного широкому кругу исследователей метода анализа КоА была нами разрешена посредством использования п-аминобензальдегида – реагента для количественного определения сульфаниламидов и их ацетилированных форм. Предполагалось, что этот вариант с прямой спектрофотометрией неацетилированного субстрата (сульфаниламид, ПАБК) может быть универсальным подходом к изучению процессов ацетилирования [5]. Благодаря сотрудничеству с лабораторией гетероциклических соединений НПО «Витамины» (г. Москва) в тест-системе ацетилирования ПАБК с полу-очищенными ферментами ацетил-КоА-синтетазой и N-ацетилтрансферазой было установлено, что наряду с КоА, реакция катализируется 4'-фосфопантетеином [5], и, как было продемонстрировано в ранних исследованиях – дефосфо-КоА. Следовательно, «кофермент ацетилирования» представляется полиморфным показателем, отражающим суммарную активность 3-х метаболитов ПК, способных к образованию и N-ацетилированию субстрата ариламина. Аналогичное участие предшественников биосинтеза КоА выявлено в реакции, катализируемой холинацетилтрансферазой.

Нацеленность витаминологических исследований в нашей стране на проблему алкоголизма и злоупотребления алкоголем с начала 80-х годов и проведение Всесоюзного симпозиума «Биохимия алкоголизма» в конце 1980 г. мотивировали изучение В5 (В3)-витаминного дефицита при алкогольной патологии. В рамках координированной научной программы на базе кафедр психиатрии Гродненского и Иркутского медицинских институтов были внедрены методы анализа КоА в лейкоцитах (по N-ацетилирующей активности), сочетанные с микробиоанализом экскретируемых форм ПК. По результатам комплексных исследований была выявлена глубокая степень дефицита ПК у пациентов с алкогольным абстинентным синдромом и алкогольным делирием [4, 7].

Предварительные исследования на группе здоровых добровольцев показали, что метод анализа КоА в лейкоцитах динамически отражает поступление пантотената в кровообращение как при парентеральном, так при энтеральном назначении фармакотерапевтической дозы (рис. 1) [7].

Представленный рисунок 1 демонстрирует динамику показателя КоА на протяжении 24 ч наблюдений у здоровых лиц с максимумом увеличения

показателя к 6 ч после назначения препарата ПК. Обращает на себя внимание исходная величина содержания КоА в лейкоцитах здоровых лиц. Она составляет 0,09-0,11 нмоль/млн и не была определена как предварительная величина по причине полиморфизма коферментной активности (см. выше).

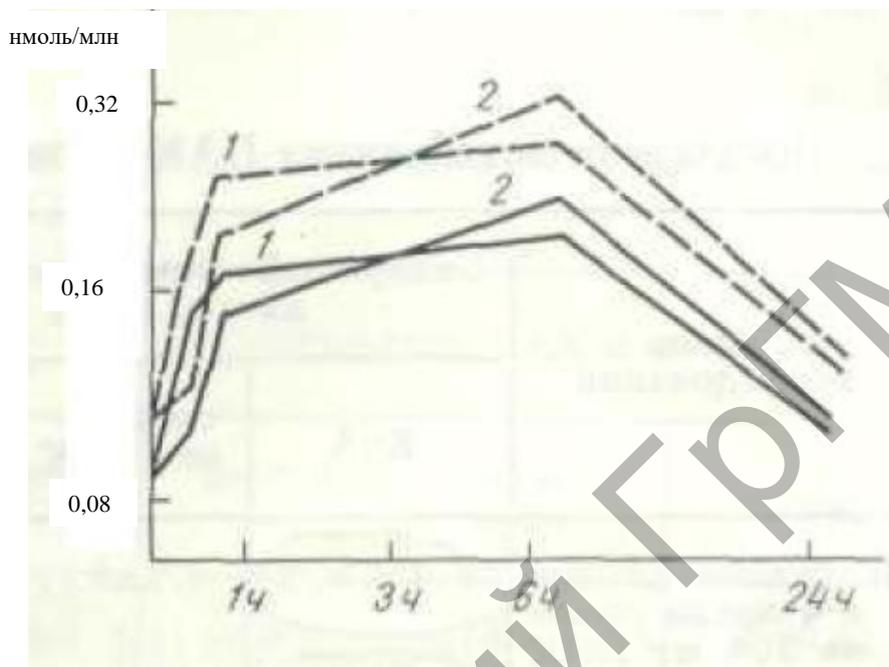


Рисунок 1 - Изменение активности КоА (сплошная линия) и суммарного содержания ПК (пунктирная линия) в лейкоцитах доноров в различные сроки после внутримышечного (1) или перорального (2) введения 200 мг пантотената

Лейкоциты (концентрированная взвесь белых клеток крови в растворе декстрана) были ранее использованы в нашей лаборатории для определения активности ферментов пентозофосфатного цикла (транскетолаза), дегидрогеназ 2-оксокислот, что предполагало функционирование КоА-зависимой реакции трансацетилирования или транссукцинирования [5]. Кроме того известно, что лейкоциты, обладающие митохондриями, наряду с гликолизом осуществляют β -окисление жирных кислот для энергообеспечения. Разумеется, речь идет об основном компоненте лейкоцитов периферической крови, составляющем фракцию нейтрофилов. Исходя из физиологического количества лейкоцитов в пределах $4 \times 10^9 - 1,1 \times 10^{10}/л$ стандартная процедура предполагала выделение 1-5 млн лейкоцитарных клеток из 5 мл стабилизированной крови с последующим подсчетом в камере Горяева. Взвесь лейкоцитов после кипячения использовалась в аналитической процедуре, поскольку субстанция КоА является термостабильной [10, 15]. Метод исследования КоА в лейкоцитах был признан приоритетным [9].

Естественно, предложенный способ анализа КоА был использован в фармакокинетических исследованиях [11], наряду с 3H -КоА, синтезированным в НПО «Витамины». В этих исследованиях была изучена дисульфидная форма

КоА (т.е. КоА-S-S-КоА), получаемая биотехнологическим способом с использованием эффективного синтезатора *Brevibacterium ammoniagenes*. Судя по данным биораспределения в кровообращении подопытных животных, субстанция КоА чрезвычайно быстро гидролизуется, и возможность её количественного анализа в плазме крови не реальна (рис. 2). В последствии было установлено присутствие в крови высокоактивных ферментов гидролиза КоА.

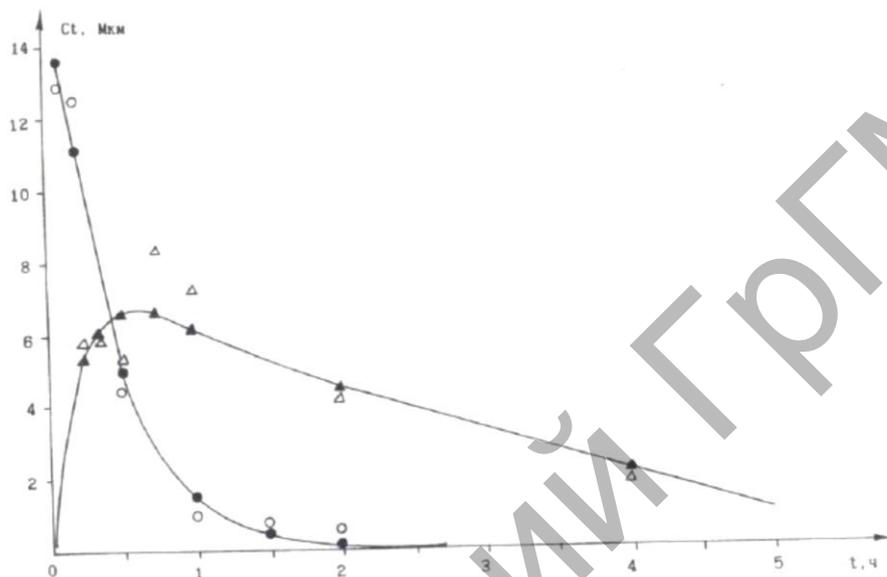


Рисунок 2 - Динамика концентраций радиоактивного материала в сыворотке крови мышей после внутривенного или подкожного введения ^3H -КоА (15 мг/кг; 0,48 мкМ/животное)

Примечания: ●, ▲ – теоретические значения; ○, △ – данные эксперимента

Несмотря на очевидный прогресс с исследованием предшественников биосинтеза КоА в качестве лекарственных препаратов задачи биохимических экспериментов и поиска биомаркера дефицита ПК диктовали необходимость высокоспецифичного исследования КоА, с учетом его природы как «кофермента ацилирования» [5].

Еще в 1951 г был предложен циклический метод на основе фосфотрансацетилазной реакции, позволяющий по убыли ацетилфосфата контролировать количество КоА и ацетил-КоА [19]. Модификация данного метода с вариантом отдельного определения свободного КоА и короткоцепочечных ацил-КоА позволила проводить высокоспецифичное исследование КоА в биологических тканях [17]. В 1984 г. нами был осуществлен сопоставительный анализ ферментативных методов в количественном определении кофермента ацелирования и адаптирована реакция арсенолиза ацетилфосфата, катализируемая фосфотрансацетилазой для исследования КоА в лейкоцитах [6].

Метод определения КоА в лейкоцитах был рекомендован для мониторинговых исследований в проблемной комиссии АМН СССР «Проблемы витаминологии» для клинической витаминологии и осуществлялся

стандартной процедурой с использованием 6% раствора декстрана (рис. 3) [6, 9].

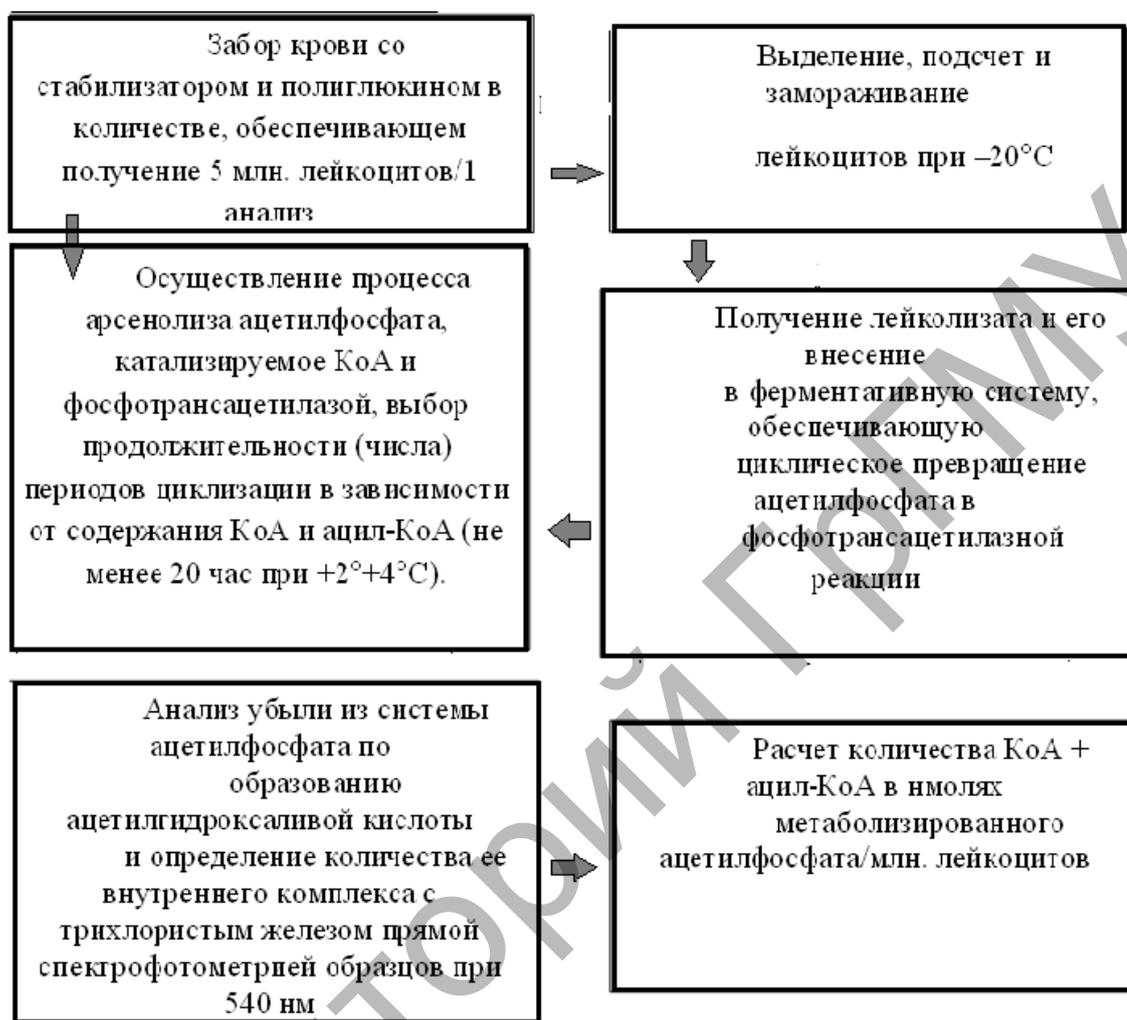


Рисунок 3 - Схема тест-системы определения уровня CoA + ацил-CoA (фосфотрансацетилазореагирующие ацил-CoA) в лейкоцитах периферической крови человека

Указанный метод был применен в исследовании N-ацетилтрансферазных реакций у 74 лиц с различными формами туберкулеза в зависимости от потребления алкоголя и назначении пантотенотерапии. Установлено низкое содержание КоА и активности N-ацетилтрансферазы в лейкоцитах пациентов и положительная динамика показателей при курсовом назначении инъекционной формы пантотената Са (400 мг внутримышечно в течение 10 дней). Выявленные значения КоА у пациентов находились в пределах $0,036-0,052 \text{ нМ} \times 10^{-6}$ лейкоцитов и возрастали в процессе комплексной терапии с пантотенатом Са до $0,075-0,086 \text{ нМ} \times 10^{-6}$ лейкоцитов [2].

Обнаружение генетически детерминированных форм нейродегенеративных синдромов, обусловленных дефектом ферментов биосинтеза КоА, актуализировало поиск биомаркеров КоА-дефицитных состояний в клинике, хотя прямые исследования уровня кофермента в

изолированных фибробластах пациентов не обнаружили его дефицита [14]. Предприняты попытки исследования ключевого фермента биосинтеза КоА – пантотенаткиназы в эритроцитах [18], что может быть ценным биомаркером с учетом КоА-синтезирующей активности красных клеток крови [1] и развития нейроакантоцитоза при врожденной патологии с дефектом пантотенаткиназы [14].

На базе клиники невропатологии Гродненского государственного медицинского университета нами были проведены предварительные исследования возможности использования в качестве биомаркера лейкоцитарного КоА, результаты которых были доложены в 2013 г на международном симпозиуме «Биологические функции пантотеновой кислоты. Пантотеновая кислота и мозг» [8]. В таблице представлены основные результаты исследований, свидетельствующие о возможности ферментативного исследования КоА в лейкоцитах в неврологической практике и открывает возможность использования этого биомаркера в качестве этиопатогенетического теста при нейродегенеративной патологии.

Таблица 1 - Содержание КоА и КоА-реагирующих ацил-КоА (суммарный показатель) в лейкоцитах контрольных лиц и пациентов с нейродегенеративной патологией, нмоль×10⁻⁶ клеток [8]

№ п/п	Группа исследованных лиц	Число	Показатель	P
1	Рассеянный склероз	6	0,095±0,008	>0,05
2	Болезнь Альцгеймера, Паркинсона, деменция сочетанного генеза	10	0,061±0,009	<0,05
3	Сосудистая деменция с депрессивными расстройствами	12	0,076±0,006	<0,05
4	Группа здоровых лиц	22	0,106±0,008	—

Исследования последних лет, проведенные на посмертном материале пациентов с болезнью Хантингтона, Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний с использованием метода метаболомики, включающем исследование ПК в нейроструктурах, выявили глубокий дефицит пантотеновой кислоты (витамина В5), ассоциированного с нарушением нейрофибрилл, цитоархитектоники нейронов, системы КоА и процессом демиелинизации [16, 20]. Возникает настоятельная необходимость совершенствования исследования системы КоА в экспериментальной и клинической неврологии. Безусловно, необходимо ориентироваться на методы, основанные на разделении КоА и ацил-КоА высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Такой метод уже апробирован, но, к сожалению, для исследования содержания КоА и ацетил-КоА в плазме крови лабораторных животных [13]. Полученные результаты уровня КоА (~9 нМ) и ацетил-КоА

(~0,3 нМ) вызывают сомнения, поскольку гидролиз кофермента в кровообращении протекает чрезвычайно быстро (см. рис. 2). Наиболее перспективным представляется исследование форменных элементов крови, выделенных с применением флотирующих агентов (декстран, фикоил и др.), в особенности, если будет исследоваться фракция Т-лимфоцитов с учетом аутоиммунного компонента нейродегенеративной патологии. Роль системы КоА как этиопатогенетического фактора нейродегенеративных болезней очевидна [12, 14], в особенности в связи с установлением КоА-зависимых механизмов антиоксидантной защиты нейронов и стабилизации нейронального редокс-статуса [3].

В связи с актуализацией исследования КоА, как биомаркера дефицита витамина В5, развития и прогноза нейродегенеративной патологии проведен ретроспективный анализ исследования КоА в лейкоцитах с использованием N-ацетилтрансферазной или фосфотрансацетилазной реакции. Продемонстрирована недостаточность пантотеновой кислоты и ее коферментной формы у пациентов при алкогольной патологии и туберкулезе, а так же возможность использования биомаркеров в контроле эффективности пантотенотерапии и в фармакокинетических исследованиях. Указывается на необходимость исследования уровня КоА современными методами (ВЭЖХ и др.) в форменных элементах крови, в частности, во фракциях лейкоцитов и дальнейшего изучения метаболизма кофермента в эритроцитах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биотрансформация пантотената в эритроцитах крови человека / В. А. Гуринович [и др.] // Пантенол и другие производные пантотеновой кислоты : биохимия, фармакология и медицинское применение : мат. междунар. симп. НАН Беларуси / Институт биохимии ; под ред. А. Г. Мойсеёнка – Гродно, 1998. – С. 48–56.
2. Динамика N-ацетилтрансферазных реакций у больных туберкулезом в зависимости от потребления алкоголя и пантотенотерапии / А. Г. Мойсеёнок [и др.] // Здоровоохранение Белоруссии. – 1991. – № 3. – С. 8–12.
3. Кофермент А – модулирующий компонент развития окислительного и метаболического стресса в структурах ЦНС / А. Г. Мойсеёнок [и др.] // Кислород и свободные радикалы : сб. мат. науч.-практич. конф. с междунар. участием, 26-27 мая 2022 г. / под ред. проф. В. В. Зинчука. – Гродно: ГрГМУ. – 2022. – С. 116–118.
4. Мойсеёнок, А. Г. Биотрансформация пантотеновой кислоты в условиях витаминной недостаточности у человека / А. Г. Мойсеёнок, Е. А. Цвербаум, М. А. Рыбалко // Вопросы мед. химии. – 1981. – Т. 27, № 6. – С. 780–784.
5. Мойсеёнок, А. Г. Пантотеновая кислота / А. Г. Мойсеёнок // Экспериментальная витаминология : справочное руководство / под ред. Ю. М. Островского. – Минск, Наука и техника, 1979. – Гл. VII. – С. 267–320.
6. Мойсеёнок, А. Г. Ферментативные методы в количественном определении кофермента ацетилирования / А. Г. Мойсеёнок, С. Н. Омелянчик

// Ферменты в биохимических анализах : тез. сообщ. всесоюзной конф. по применению ферментов в биохим. анализах. – Вильнюс, 1984. – Ч. 1. – С. 107–111.

7. Мойсеёнок, А. Г. Особенности биотрансформации препаратов пантотеновой кислоты у больных хроническим алкоголизмом / А. Г. Мойсеёнок, Е. А. Цвербаум, М. А. Рыбалко // Химико-фарм. журнал. – 1981. – № 11. – С. 24–28.

8. Омелянчик, С. Н. Исследование системы биосинтеза CoA в лейкоцитах при заболеваниях нервной системы / С. Н. Омелянчик, Я. Я. Гордеев, А. Г. Мойсеёнок // Биологические функции пантотеновой кислоты. Пантотеновая кислота и мозг. Новые возможности метаболической и диетической терапии : материалы междунар. симпозиума, Гродно, 28 июня 2013 г. / под ред. А. Г. Мойсеёнка. – Гродно, 2013. – С. 54–56.

9. Способ количественного определения коэнзима А в лейкоцитах: а.с. 1040412 СССР, G 01 N 31/48 / А. Г. Мойсеёнок, М. А. Рыбалко, Е. А. Цвербаум, В. И. Петров. – № 2662824; – опубл. 10.05.83.

10. Сытинская, О. Н. Модификация метода определения сульфаниламидов в приложении к исследованию содержания КоА и ацетилирующей способности тканей / О. Н. Сытинская // Вопросы мед. химии. – 1956. – Т. II, вып.3. – С.214–221.

11. Фармакокинетика и биотрансформация ^3H -КоА у мышей / Б. Ф. Дорофеев [и др.] // Кофермент А и его предшественники: синтез, анализ и экспериментальное изучение : сб. тр. / под ред. В. И. Гунар [и др.]. – Москва, 1997. – С. 100–108.

12. Coenzyme A biochemistry: from neurodevelopment to neurodegeneration / L. Mignani [et al.] // Brain Sci. – 2021 – Vol. 11. – P. 1031. doi: 10.3390/brainsci11081031.

13. Determination of Coenzyme A and acetyl-Coenzyme A in biological samples using HPLC with UV detection / Y. I. Shurubor [et al.] // Molecules. – 2017. – Vol. 22. – P. 1388. doi: 10.3390/molecules220913388.

14. Hayflick, S. J. Defective pantothenate metabolism and neurodegeneration / S. J. Hayflick // Biochem. Soc. Trans. – 2014. – Vol. 42, № 4. – P. 1063–1068. doi:10.1042/BST20140098.

15. Kaplan, N. O., Lipmann, F. J. The assay and distribution of coenzyme / N. O. Kaplan, F. J. Lipmann // J. Biol. Chem. – 1948. – Vol. 174, № 1. – P. 37–44.

16. Lashley, T. Extensive anti-CoA immunostaining in Alzheimer's disease and covalent modification of tau by a key cellular metabolite Coenzyme A / T. Lashley [et al.] // Front. Cell Neurosci. – 2021. – vol.1 – P. 739425. doi: 10.3389/fncel.2021.739425.

17. McDougal, D. B., Dargar, R. V. A spectrophotometric cycling assay for reduced coenzyme A and its esters in small amounts of tissue / D. B. McDougal, R. V. Dargar // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 1. – P. 103–115. doi: 10.1016/0003-2697(79)90333-6.

18. PKAN neurodegeneration and residual PANK2 activities in patient erythrocytes / M. Werning [et al.] // Ann. Clin. Transl. Neurol. – 2020. – Vol. 7. – P. 1340–1351. doi: 10.1002/acn3.51127.

19. Stadman, E. R. Coenzyme A function in and acetyl transfer by the phosphotransacetylase system / E. R. Stadman, G. D. Novelli, F. Lipman // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 191. – P. 365–379.

20. Substantively lowered levels of pantothenic acid (vitamin B5) in several regions of the human brain in Parkinson's disease dementia / M. Scholefield [et al.] // Metabolites. – 2021. – Vol. 11, № 9. – P. 569. doi: 10.3390/metabo11090569.

ГЛЮКАГОНОПОДОБНЫЙ ПЕПТИД (GLP-1): КОРРЕКЦИЯ УРОВНЯ ПРИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У КРЫС

Надольник Л.И., Полубок В.Ч., Виноградов В.В.

Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

Актуальность. Глюкагоноподобный пептид (GLP-1) – инкретиновый гормон, высвобождаемый из энтероэндокринных клеток кишечника, играет ключевую роль в регуляции постпрандиального уровня глюкозы, контролирует гликемические колебания, связанные с приемом пищи, за счет увеличения синтеза инсулина и ингибирования секреции глюкагона [1]. Кроме того, GLP-1 обладает защитным действием на β -клетки поджелудочной железы, снижает аппетит и массу тела, что предполагает его использование как средства для лечения диабета 2 типа и ожирения [2].

Данный гормон рассматривается как важная мишень для лечения инсулинорезистентности (ИР) и диабета 2 типа. Разработаны лекарственные средства для повышения эффективности действия GLP-1, которые являются агонистами рецепторов GLP-1 (GLP-1 RA) [3]. GLP-1 RA – важный класс препаратов для лечения пациентов с диабетом. Агонисты GLP-1 короткого действия (эксенатид, ликсисенатид) снижают уровень постпрандиальной глюкозы, а длительного действия (альбиглутид, дулаглутид, лираглутид, семаглутид) – снижают уровень глюкозы натощак, повышая глюкозозависимую секрецию инсулина и снижая секрецию глюкагона [4]. Недостатком различных лекарственных форм GLP-1 является непродолжительность времени действия, поскольку они быстро инактивируются дипептидилпептидазой-4. Известен способ лечения гипергликемии с использованием ингаляционного введения лекарственной формы GLP-1, что приводит к снижению побочных эффектов, которые обычно связаны с подкожным и внутривенным введением GLP-1.

Цель. Оценить возможность коррекции уровня глюкагоноподобного пептида при экспериментальном диабете у крыс введением витаминно-аминокислотного комплекса на основе липоевой кислоты.