

## GENETIC POLYMORPHISM OF B<sub>2</sub> - ADRENORECEPTOR GENE AND BISOPROLOL REATMENT EFFICIENCY IN HYPERTROPHIC CARDIOPATHY PATIENTS

N.N. Chakova<sup>1</sup>, S.S. Niyazova<sup>1</sup>, E.P. Mikhaleiko<sup>1</sup>, E.V. Krupnova<sup>1</sup>,  
N.V. Tchebotaryova<sup>1</sup>, S.M. Komissarova<sup>2</sup>, A.A. Arabey<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Genetics and Cytology Institute of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*RSPC «Cardiology», Minsk, Belarus*

The article concerns the study on the effect of β<sub>2</sub> - adrenoreceptor gene polymorphism on the response of hypertrophic cardiopathy patients (HCMF) to bisoprolol treatment. The treatment with this drug was shown to be effective for the carriers of the genotype combination *Gly16Gly/Glu27Glu*. The results obtained may be used for optimization of β<sub>2</sub> – adrenoblocker treatment in HCMF patients.

## ГЕМОЛИМФА КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА (*Antheraea pernyi* G.–M.) КАК БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ И ЦИТОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева, Д.И. Паршонок

<sup>1</sup>*Витебский государственный университет им. П.М.Машиерова, 210038, Витебск,*  
*Московский пр. 33; [chirkin@vsu.by](mailto:chirkin@vsu.by)*

Жизненный цикл дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.–M.) включает стадию куколки. Куколка этого насекомого находится в состоянии диапаузы 7-8 месяцев. В этом периоде жидкое содержимое куколок, образованное в результате гистолиза тканей гусеницы V возраста, устойчиво к окислительному стрессу и бактериальной контаминации. Следовательно, в биотехнологии можно использовать жидкое содержимое куколок как сырье для получения антиоксидантных, бактериостатических и иммуномодулирующих препаратов. Это выгодно отличает жидкое содержимое куколок («гемолимфа») от продуктов, обогащенных свободными аминокислотами (патенты RU 2066105 C1, 10.09.1996. RU 2055482 C1, 10.03.1996. RU 2053779 C1, 10.02.1996, RU 2171066 (13) C122.03.2000 и др.), полученными путем гидролиза различных живых объектов, чаще гидробионтов. В результате гидролиза, нейтрализации и сушки создают лечебно-профилактические продукты, обладающие антиоксидантным [8] иммуномодулирующим и регулирующим метаболизм действиями.

**Целью** работы было обоснование путей использования куколок дубового шелкопряда как источника перспективных биофармацевтических субстанций.

Общее количество свободных аминокислот в жидком содержимом куколок дубового шелкопряда составляет 14,6 г/л, что близко к содержанию свободных аминокислот в молоке. В гемолимфе куколок обнаружены (M±m, ммоль/л): 1) аминокислоты, обладающие антиоксидантным действием - метионин (0,672±0,083), гистидин (10,26±0,367), таурин (0,976±0,112), пролин (5,586±0,409), цитрулин (2,152±0,141), тирозин (2,530±0,230); 2) аминокислоты, обладающие иммуномодулирующим действием – гистидин, метионин, треонин (10,28±0,272), глутаминовая кислота (0,899±0,081), лизин (8,659±0,586), аланин (18,33±2,601), аспарагиновая кислота (4,700±0,561); 3) аминокислоты, обладающие общеукрепляющим действием (биосинтез белка, подавление внутриклеточного протеолиза, антиоксидантное, антистрессовое и метаболическое действия) - валин (8,162±0,193), лейцин (4,763±0,133), изолейцин (4,337±0,145), цитруллин, орнитин (0,044±0,004), глицин (17,15±0,907), глутамин (19,07±1,886), серин (13,13±1,711), треонин (10,28±0,272), аспарагиновая кислота (4,700±0,561), тирозин, фенилаланин (1,043±0,070), таурин глутаминовая кислота, бета-

аланин ( $0,511 \pm 0,029$ ), этаноламин ( $0,227 \pm 0,016$ ). Всего в гемолимфе содержится 134 ммоль/л свободных аминокислот, из них на долю незаменимых приходится 29,7% [1].

**Антиоксидантное действие.** Известно, что L-цитруллин и L-аргинин способны к элиминации супероксид анион-радикала, пролин является эффективным перехватчиком синглетного кислорода и предотвращает клеточную гибель при окислительном стрессе, гистидин может перехватывать пероксильные радикалы, предотвращая карбоксилирование белков и образование белковых сшивок. Методами усиленной хемиллюминесценции в системе люминол-4-йодфенол-пероксидаза и с использованием флуоресцентного зонда - кумарин-3-карбоновой кислоты установлено, что ряд аминокислот (цистеин, гистидин, фенилаланин, метионин, триптофан, тирозин, пролин, аргинин) в концентрации 1 ммоль являются эффективными природными антиоксидантами, которые способны предотвращать образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов при воздействии рентгеновского излучения. В концентрации 0,1 ммоль, близкой к физиологической, цистеин, гистидин и тирозин являются эффективными перехватчиками гидроксильных радикалов. Методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к 8-оксогуанину показано, что аминокислоты с наиболее выраженными антиоксидантными свойствами (цистеин, гистидин, фенилаланин, метионин, триптофан, тирозин, пролин, аргинин) защищают ДНК *in vitro* от окислительных повреждений, индуцируемых рентгеновским излучением, уменьшая выход 8-оксогуанина - ключевого биомаркера повреждения ДНК активными формами кислорода [2].

Было изучено влияние нативного жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда на генерацию активных кислородных метаболитов (АКМ) и секрецию миелопероксидазы (МПО) нейтрофилами крови человека *in vitro*. Установлено, что гемолимфа куколок приводит к ингибированию процессов формирования АКМ нейтрофилами вследствие прямого ингибирования МПО-зависимых окислительных реакций и за счет снижения секреции МПО из нейтрофилов в среду. Действие гемолимфы частично зависит от функционирования в нейтрофилах 5-липоксигеназных и фосфатидилинозитол-3-киназных внутриклеточных сигнальных путей и не является результатом некроза клеток [3]. Антиоксидантный эффект гемолимфы куколок существенно превышает таковой у гемолимфы гусениц или виноградных улиток (*Helix pomatia L.*). Так при вычислении 50% ингибирования образования активных форм кислорода показано, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда эффективнее гемолимфы виноградных улиток в системе люминол + НОС1 в 200 раз, люминол + миелопероксидаза хрена +  $H_2O_2$  в 200 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при адгезии в 700 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии f Met-Leu-Phe в 300 раз и генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии латекса в 4000 раз [4]. Это означает, что в результате гистолиза тканей гусеницы в жидком содержимом куколок формируется уникальный антиоксидантный комплекс, включающий 1) антиоксидантные аминокислоты; 2) антиоксидантные витамины (аскорбиновая кислота  $181,5 \pm 27,0$  мкг/мл или в 10 раз выше, чем в гемолимфе виноградных улиток, токоферолы  $12,5 \pm 0,88$  мкг/мл, ретинол  $0,037 \pm 0,013$  мкг/мл); 3) мочевиная кислота  $303 \pm 62,3$  мкмоль/л, что в 1,5 раза больше, чем в плазме крови человека; 4) SH-группы 41,9 мкмоль/л, восстановленный глутатион 23,5 мкмоль/л и глутатионпероксидаза  $42 \pm 9,0$  нмоль GSH/мин×мг белка.

Было изучено влияние гемолимфы куколок на содержание аминокислот в сыворотке крови крыс при синдроме отмены этанола. Этанол вызывает изменения в метаболизме по типу окислительного стресса. Установлено, что гемолимфа куколок сохраняла концентрацию гомоцистеина на уровне интактных крыс [Патент на изобретение Республики Беларусь № 12608 от 25.08.2009; авторы Наумов А.В., Дорошенко Е.М., Шейбак В.М., Разводовский Ю.Е., Чиркин А.А. «Средство для снижения уровня гомоцистеина при гипергомоцистеинемии»].

**Иммуномодулирующее и бактериостатическое действие.** Установлено увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов крови при введении гемолимфы куколок крысам: в разведении 1:10: показатель фагоцитарное число увеличен на 22% и фагоцитарный индекс – на 64,1%. Аналогичные результаты были получены при исследовании фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов после введения гемолимфы куколок [Патент на изобретение Республики Беларусь № 12504 от 27.07.2009; авторы Горецкая М.В., Шейбак В.М., Чиркин А.А. «Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью»]. В настоящее время используется водный экстракт куколок дубового шелкопряда – ВЭКШ [Трокоз, В.А. Способ получения лечебного экстракта / В.А. Трокоз, Т.Д. Лотош, А.Б. Абрамова [и др.] // Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 16965 (1997 год)]. Водный экстракт получают осаждением белков гемолимфы куколок посредством трехкратного кипячения.

В опытах на культурах тканей березы и осины установлено бактериостатическое действие экстракта куколок дубового шелкопряда в концентрации 10-20 мл на 100 мл среды. Выявлена эффективность совместного использования экстракта в концентрации 0,1-10 мл на 100 мл среды и антибиотика цефотаксима в концентрации 500 мг/л для индукции активного роста и развития узловых сегментов побегов тестируемых клонов березы и осины [5].

**Регуляция метаболизма.** Метаболический синдром у крыс воспроизводили скормливанием жидкой высокожировой диеты по Либеру-Де Карли в течение 3 месяцев или вызывали алиментарную гиперхолестеролемию. Для профилактики развития метаболического синдрома ежедневно на протяжении третьего месяца эксперимента крысам внутрижелудочно вводили дополнительно водный экстракт куколок дубового шелкопряда в дозе (по сумме свободных аминокислот) 7 мкг/мл на 100 г массы тела. Установлено, что одномесячное введение водного экстракта куколок дубового шелкопряда крысам в процессе воспроизведения метаболического синдрома в дозе 7 мкг/мл обеспечило уменьшение проявлений инсулинорезистентности на 15-25% по сравнению с животными, которые получали только высокожировую диету [6,7].

Методом гель-фильтрации на сефадексе G25 fine из содержимого куколок дубового шелкопряда выделены 3 группы веществ: макромолекулы - белки и нуклеиновые кислоты (фракции 7-13), пептиды (фракции 17-37) и низкомолекулярные биорегуляторы (фракции 38-57). Мочевая кислота, восстановленный глутатион и SH-группы выявлялись во фракциях макромолекул и пептидов. Свободные аминокислоты локализовались в пептидной фракции (17-39). Было показано, что компоненты фракций 19-23 практически полностью подавляют включение меченого тимидина в ДНК, а компоненты фракций 24-35 усиливают на 285% включение меченого тимидина в ДНК клеток Нер G2 [8]. Оказалось, что основная масса свободных аминокислот локализована во фракциях 17-23, вызывающих ингибирование синтеза ДНК; активирующее влияние на синтез ДНК компонентами фракций 24-35 сопряжено с наличием в них ГАМК, тирозина, триптофана, фенилаланина и таурина. Однако в экспериментах с мезенхимальными стволовыми клетками крыс было показано, что фракции гемолимфы 10-24 поддерживают жизнеспособность клеток, а фракции 25-29 способствуют накоплению клеток в состоянии апоптоза (тест с окрашиванием клеток CFSE) [9].

#### **Перспективы использования результатов работы.**

1. Рекомендуется технология получения средства, содержащего гидрофильные компоненты куколок дубового шелкопряда, которое предназначено для использования в медицине и ветеринарии с целью профилактики инсулинорезистентности при метаболическом синдроме или инсулиннезависимом сахарном диабете 2 типа. Сущность технологии: измельчение куколок шелкопряда, экстракция в 0,85%-ном растворе NaCl в три последовательных приема путем нагрева до кипения, предусматривающую трехкратное извлечение экстрактов соответственно при экстракции сырья в соотношении с раствором NaCl 1:5, 1:3 и 1:2, смешивание и фильтрацию смеси экстрактов, выдержку

смеси 24-48 часов при 3-5°C, повторную фильтрацию, нормирование раствора по концентрации в нем фармакологически активной субстанции и доведение 0,85%-ным раствором NaCl до объема, содержащего мг/мл альфа-аминоазота 70-110 или суммы свободных аминокислот 550-850 либо треонина 150-250 или глутаминовой кислоты 120-180. Технический результат: расширение области применения способа и спектра профилактического и лечебного действия препарата на его основе, осуществление нормирования по концентрации основной фармакологически активной субстанции, улучшение внешнего вида экстракта при упрощении и снижении стоимости процесса изготовления (заявка на выдачу патента на изобретение № 20090713 от 06.08.2009).

2. Рекомендуются средство, являющееся экстрактом куколок дубового шелкопряда, для модуляции действия антибиотиков с целью использования в сельском хозяйстве и лесоводстве для борьбы с микробной контаминацией культур растительных тканей. Сущность способа: применение экстракта куколок дубового шелкопряда, стандартизованного по содержанию суммы свободных аминокислот 700 мг/л, с целью оптимизации антимикробного действия антибиотиков и стимуляции роста и развития культивируемых растительных тканей. Технический результат: расширение области применения гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда, осуществление нормирования препарата по сумме свободных аминокислот, повышение эффективности действия антибиотика за счет стимуляции роста и развития культивируемых растительных тканей (заявка на выдачу патента на изобретение № 20101238 от 09.12.2010).

3. Рекомендуются следующие направления использования средств, содержащих экстракт куколок дубового шелкопряда:

- использование как иммуномодулятора на уровне нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов (патент на изобретение № 12504 Республики Беларусь);
- использование как противовоспалительного средства за счет подавления генерации активных метаболитов кислорода;
- использование как средства, для предотвращения негативных реакций на метаболизм гиперпродукции гомоцистеина (патент на изобретение № 12608 Республики Беларусь);
- использование экстракта куколок дубового шелкопряда как источник незаменимых (эссенциальных) субстанций для регуляции метаболизма;
- использование экстракта в гомеопатических дозировках (порядка 70 мкг свободных аминокислот на 1 кг массы тела) для профилактики метаболического синдрома (заявка на выдачу патента на изобретение № 20090713 от 06.08.2009).

### **Список литературы**

1. Чиркин, А.А. Белковый и аминокислотный состав куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) / А.А. Чиркин [и др.] // Веснік ВДУ, 2007, №1 (43), С. 143-149.
2. Штаркман И.Н. Антиоксидантные свойства аминокислот и образование долгоживущих радикалов белка под действием рентгеновского излучения / Автореферат диссертации ... кандидата биологических наук по специальности 03.00.02. - Пушино, 2008. - 22 с.
3. Коваленко Е.И. Изменение активности нейтрофилов крови человека при взаимодействии с компонентами жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда в условиях *in vitro* / Е.И.Коваленко [и др.]// Иммунология, аллергология, инфектология. – 2009. - №3. – С. 21-26.
4. Чиркин, А.А. Антиоксидантные эффекты гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда при моделировании окислительного стресса в клетках человека / А.А.Чиркин [и др.] // Веснік ВДУ, 2009. - №3(53). – С. 152-158].

5. Концевая И.И. Действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда на культивируемые ткани березы и осины / И.И.Концевая [и др.] // Веснік ВДУ. - 2010. - № 1 (55). - С. 141-145
6. Чиркин А.А. Метаболические эффекты природного антиоксидантного препарата / А.А.Чиркин [и др.] // «Белорусские лекарства». Матер. Междунар. научно-практ. конф. Минск, 2010. – С. 7-10
7. Данченко Е.О. Влияние экстракта куколок дубового шелкопряда на метаболизм при моделировании гиперхолестеролемии / Е.О.Данченко [и др.] // Веснік ВДУ. - 2011 - №2 (62). - С. 70-74
8. Чиркин А.А. Разделение ингибирующей и активирующей синтез ДНК активностей в гемолимфе куколок дубового шелкопряда / А.А.Чиркин [и др.] // Фундаментальные и прикладные проблемы стресса. Матер. II Междунар. научно-практ. конф.– Витебск: ВГУ, 2011. – С. 37-39
9. Чиркин А.А. Жизнеспособность клеток куколок дубового шелкопряда / А.А.Чиркин [и др.] // Веснік ВДУ. - 2011. - №1 (61). - С. 30-36

### **HAEMOLYMPH OF OAK SILKWORM PUPAE (ANTHERAEA PERNYI G.-M.) AS BIOPHARMACEUTICAL MATERIAL TO DESIGN ANTIOXIDANT AND CELL-MODULATING DRUGS**

A.A. Chirkin, O.M. Tikhomirova-Balayeva, T.A. Tolkacheva, D.I. Parshonok  
*P.M. Masherov State University of Vitebsk, Moskovskii prospect 33, Vitebsk, 210038;*  
*[chirkin@vsu.by](mailto:chirkin@vsu.by)*

The article presents data on the chemical composition of oak silkworm pupae haemolymph. The use of the hemolymph as a biopharmaceutical material to design antioxidant, immune-modulating and metabolism-regulating drugs is substantiated.

### **ГРАДУАЛЬНОЕ ФОРСИРОВАННОЕ ВВЕДЕНИЕ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КАК МОДЕЛЬ ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АДДИКЦИИ**

П.Д. Шабанов<sup>1,2</sup>, А.А. Лебедев<sup>2</sup>, А.В. Яклашкин<sup>1</sup>, В.П. Стеценко<sup>1</sup>,  
 Н.В. Лавров<sup>1</sup>, П.С. Пронько<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова, 6, ул. акад. Лебедева, Санкт-Петербург, 194044, Россия, [pdshabanov@mail.ru](mailto:pdshabanov@mail.ru); <sup>2</sup>НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, 12, ул. акад. Павлова, Санкт-Петербург, 197376, Россия; <sup>3</sup>Гродненский филиал Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси, 50, бульвар Ленинского Комсомола, 230030, Гродно, Беларусь

Форсированное введение лекарственных средств, потенциально обладающих наркогенными свойствами, широко применяется в экспериментальной фармакологии и наркологии. Этот способ подразумевает введение веществ в повышенных (субмаксимальных) дозах, либо в возрастающих дозах до максимальной переносимости вещества, либо введением особым способом, например, с помощью ингаляции паров этанола в высоких концентрациях [2]. Каждый из способов ставит одну цель – воспроизведение у животных элементов лекарственной зависимости, присущих человеку. Эту зависимость, как правило, оценивают по признакам формирования синдрома отмены после форсированного введения вещества [4]. Чаще всего используются поведенческие нарушения, регистрируемые в период отмены вещества, реже – неврологические (судороги, повышение чувствительности к свету, звуку) или вегетативные (сердцебиение, колебания артериального давления) дисфункции [4, 7]. Нами предложен относительно простой способ формирования элементов поведенческой зависимости, основанный на