

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 547.466:612.017.1:615.917:615.32-092.9

**Павлюковец
Анастасия Юрьевна**

Формирование аминокислотного фонда в иммунокомпетентных тканях
при введении животным циклофосфида и этанола и его коррекция

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск, 2014

Работа выполнена в учреждении образования «Гродненский государственный медицинский университет».

Научный руководитель: **Шейбак Владимир Михайлович**, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры биологической химии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Таганович Анатолий Дмитриевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Чиркин Александр Александрович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится «16» января 2015 г. в 14⁰⁰ на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.02 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, телефон 272-55-98, e-mail: uchsovet@bsmu.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «11» декабря 2014 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент



А.И.Герасимович

ВВЕДЕНИЕ

Одной из функций аминокислот является регуляция метаболизма в тканях, включая клетки иммунной системы. Изменяя метаболическую активность Т- и В-лимфоцитов, дендритных и тучных клеток, аминокислоты влияют на профиль цитокинов, модулируя интенсивность развития воспалительной реакции и связанного с ней окислительного стресса, тормозят или усиливают иммунный ответ [Li P. et.al., 2007; Semaluk A.C. et.al., 2012]. Аминокислоты (глутамин, аспарагин) используются для синтеза азотистых оснований и в энергетических целях. Показано, что формирование фонда свободных аминокислот плазмы крови и тканей организма зависит от соотношения процессов биосинтеза белка в клетках и протеолиза в мышечных тканях, а также активности их транспорта через плазматические мембраны. При некоторых патобиохимических состояниях аминокислотный дисбаланс носит адаптивный характер, но чаще отражает негативные изменения, происходящие в пораженном органе или ткани. Изменение количественного спектра аминокислот, в свою очередь, будет оказывать существенное воздействие на интенсивность транспортных и/или метаболических процессов в клетках [Jousse C., 2004].

Очевидно, что свободные аминокислоты и их производные можно использовать как модуляторы метаболизма. Разработка аминокислотных композиций и их сочетаний с микроэлементами (цинк) является перспективным направлением метаболической терапии, способствующим нормализации обменных процессов при различных заболеваниях при отсутствии побочных токсических эффектов. В частности, совместное поступление в организм Zn^{2+} и иммуностропных аминокислот позволяет использовать их для коррекции метаболизма в иммунокомпетентных клетках и тканях [Шейбак В.М., 2004, 2010].

Исходя из вышеизложенного, представляется обоснованным выяснение закономерностей формирования аминокислотного фонда в иммунокомпетентных тканях при поступлении в организм животных токсикантов (циклофосфамид, этанол) и биокорректоров, созданных на основе сочетаний аминокислот и микроэлементов, а также выделенных из растительного сырья (орегонин).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Медицина и фармация» «Особенности адаптации к воздействию внешних факторов на ранних этапах онтогенеза и разработка способов профилактики и коррекции возможных нарушений (клинико-

экспериментальное исследование)» (№ госрегистрации 20112400, сроки выполнения 2011-2013 гг.). Направление исследования соответствует перечню приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг., утвержденных Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 19 апреля 2010 г. № 585 (подпункт 4.1 «Самоорганизация живых систем, закономерности течения патологических процессов, коррекция жизненно важных функций»).

Цель и задачи исследования

Целью исследования явилось выявление особенностей формирования фонда свободных аминокислот в иммунокомпетентных тканях при введении в организм животных циклофосфида, этанола и/или аминокислотно-микроэлементной композиции (тритарг), а также диарилгептаноида орегонина.

Задачи исследования:

1. Провести анализ фонда свободных аминокислот в плазме крови и клетках иммунной системы животных после введения тритарга.
2. Оценить влияние циклофосфида и протекторные свойства тритарга на пул свободных аминокислот в плазме крови, тимусе и селезенке, сопоставить их с изменениями лейкоцитарной формулы и фагоцитарной активности нейтрофилов.
3. Определить особенности формирования аминокислотного фонда в иммунокомпетентных тканях в условиях введения животным тритарга и этанола.
4. Изучить влияние орегонина на показатели метаболизма аминокислот в органах иммунной системы при введении животным циклофосфида и этанола.

Объект исследования: кровь, ткани тимуса и селезенки, лимфоциты, выделенные из крови, печени, тимуса и селезенки животных, получавших ксенобиотики (циклофосфамид, этанол) и/или биокорректоры (аминокислотная композиция и орегонин).

Предмет исследования: концентрации свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в тканях и клетках иммунной системы, гистологическое строение тимуса и селезенки, а также фагоцитарная активность нейтрофилов и лейкоцитарная формула крови животных при поступлении в организм этанола, циклофосфида, аминокислотно-микроэлементной композиции (тритарг) и орегонина.

Положения, выносимые на защиту

1. Однократное энтеральное введение тритарга вызывает колебания пула свободных аминокислот в плазме крови и оказывает однотипные эффекты в лимфоцитах крови, печени, тимуса и селезенки, при этом для лимфоцитов крови и селезенки характерно более длительное сохранение повышенного

внутриклеточного фонда свободных аминокислот. Курсовое введение тритарга приводит к гипераминоацидемии, сопровождающейся увеличением в плазме концентраций глутамина, этаноламина, таурина и лизина, а в тимусе и селезенке – к снижению содержания АРУЦ.

2. Курсовое введение тритарга нормализует аминокислотный дисбаланс, вызываемый введением циклофосфамида, включающий гипоаминоацидемию и обеднение аминокислотного фонда в тканях тимуса и селезенки, повышает общее содержание аминокислот и азотсодержащих производных в плазме, снижает фонд свободных аминокислот в тканях тимуса и селезенки.

3. Введение тритарга препятствует развитию аминокислотного дисбаланса в ткани тимуса и селезенки, развивающегося при поступлении в организм животных этанола, способствует повышению общего количества аминокислот и их азотсодержащих производных. В лимфоцитах печени при алкогольной интоксикации тритарг стабилизирует фонд свободных аминокислот и их метаболитов.

4. Орегонин при введении с циклофосфамидом повышает в плазме крови содержание азотсодержащих метаболитов и общее количество серосодержащих аминокислот. В тимусе и селезенке крыс протективное действие орегонина проявляется сохранением аминокислотного баланса и структуры ткани. Совместное введение орегонина и этанола способствует развитию гипераминоацидемии, увеличению концентраций серосодержащих аминокислот, а в тимусе – использованию аминокислот для биосинтетических целей.

Личный вклад соискателя

Автором самостоятельно определены цель и задачи, объем исследования, разработаны его этапы, направления, проведены биохимические иммунологические и морфологические исследования. Все основные научные результаты диссертационного исследования получены автором лично. Статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов, подготовка публикаций по материалам диссертации осуществлены автором самостоятельно.

Основные научные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично и изложены в статьях. Результаты проведенного анализа фонда свободных аминокислот в плазме крови и клетках иммунной системы животных после введения тритарга опубликованы в статьях и материалах конференций [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 17, 19, 22] – вклад диссертанта 85%. Данные полученные при анализе влияния циклофосфамида и протекторных свойства тритарга на пул свободных аминокислот в плазме крови, тимусе и селезенке изложены в статьях и материалах конференций [9, 12, 13, 24] – вклад диссертанта 95%. Особенности формирования аминокислотного фонда в иммунокомпетентных тканях в условиях введения животным тритарга и

этанола изложены в статьях и материалах конференций [12, 16, 18, 20, 21, 25] – вклад диссертанта 90%. Результаты исследования влияния орегонина на показатели метаболизма аминокислот в органах иммунной системы при введении животным циклофосфида и этанола представлены в статьях и материалах конференций [4, 5, 10, 11, 23, 26] – вклад диссертанта 90%.

По теме диссертации разработаны и внедрены в научно-методический процесс УО «Гродненский государственный медицинский университет» методические приемы для изучения метаболической активности лимфоцитов, в результате чего получены 2 рационализаторских предложения. По результатам работы получен патент на изобретение и подана заявка на выдачу патента на изобретение. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии и кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии им. С.И. Гельберга УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Апробация результатов диссертации

Основные положения диссертационной работы представлены в виде докладов и обсуждены на следующих конференциях: конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти И.П. Протасевича (Гродно, 2010); ежегодной итоговой научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» ГрГМУ (Гродно, 2010); конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти М.П. Шейбака (Гродно, 2011); конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Д.А. Маслакова (Гродно, 2012); ежегодной итоговой научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» ГрГМУ (Гродно, 2013); конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора М.В. Кораблева (Гродно, 2013); 48 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (Toruń, 2013).

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 26 работ объемом 4,55 авторских листа, в их числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь, объемом 2,48 авторских листа, из них 1 статья в журнале РФ, индексирована в MEDLINE; 8 статей в сборниках конференций объемом 0,95 авторских листа; 12 тезисов докладов объемом 1,12 авторских листа. Опубликовано 9 работ в единоличном авторстве объемом 1 авторский лист. Имеется 2 акта о внедрении в учебный процесс, 1 уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патентов на изобретения (заявка, № а 20121404 от 06 ноября 2012 г.). Получено уведомление о регистрации в Государственном реестре изобретений патента на изобретение № 16804 «Композиция, обладающая

иммуномодулирующей активностью», авторы: Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю., Горецкая М.В. (дата регистрации 29.10.2012 г.), получен патент на изобретение pat 14659 Republic of Latvia «Agent for increasing the content of bifidobacteria and lactobacteria in small intestine mucosa and stimulating anti-infection protection immune mechanisms» G. Telysheva, J. Krasilnikova, T. Dizhbite, V. Sheiback, A. Pavlukovics, I. Nikolajeva (30.05.2012).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа написана на русском языке и состоит из «Перечня условных обозначений», «Введения», «Общей характеристики работы», 5 глав, «Заключения», «Библиографического списка», «Списка публикаций соискателя», «Приложения». Объем диссертации – 166 страниц компьютерного текста из них 56 страниц занимают рисунки и таблицы. Диссертационная работа иллюстрирована 34 рисунками, содержит 72 таблицы, приложения 31 страница, включающие 20 рисунков и 16 таблиц. Библиографический список представлен 265 источниками, из них 23 русскоязычных, 216 зарубежных, 26 публикации автора объемом 20 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах. Всего использовано 320 крыс. Экспериментальные группы состояли не менее, чем из 7-ми особей каждая, в экспериментах подбирали однородных по возрасту, полу и массе животных.

Экспериментальные модели:

Однократное внутрижелудочное введение тритарга (аргинин, таурин, цинка диаспартат и триптофан в соотношении 10:6,25:1,75:1). Тритарг вводили внутрижелудочно в дозе 350 мг/кг массы на 15 мин., 30 мин., 60 мин., 90 мин., 3 ч, 6 ч, 12 ч или 24 ч.

Курсовое внутрижелудочное введение тритарга. Тритарг вводили внутрижелудочно в дозе 350 мг/кг массы. Животных декапитировали через 1 ч или 24 ч после 3-го, 7-го или 10-го введения композиции.

Однократное или курсовое внутрижелудочное введение орегонина. Орегонин вводили внутрижелудочно в дозе 5 мг/кг массы. Животных декапитировали через 3 ч, 24 ч или через 24 ч после 10-го введения орегонина.

Моделирование иммуносупрессии циклофосфамидом и коррекция тритаргом или орегонином. Циклофосфамид вводили в общей дозе 160 мг/кг (по 40 мг/кг 4 раза с интервалом 48 ч внутрибрюшинно), тритарг (350 мг/кг 10 дней внутрижелудочно) или орегонин (5 мг/кг 10 дней внутрижелудочно).

Моделирование алкогольной интоксикации и введение тритарга или орегонина. 1. Этанол вводили животным в дозе 4,5 г/кг массы (25% р-р)

внутрижелудочно. Декапитировали через 1 ч или 24 ч после 1-го, 4-го или 10-го введения этанола. 2. Животным вводили этанол в дозе 7,5 г/кг первые 7 дней эксперимента, последующие 6 дней этанол 5 г/кг и орегонин (внутрижелудочно 5 мг/кг массы) или тритарг (внутрижелудочно 350 мг/кг массы).

Кровь для получения плазмы и выделения лимфоцитов собирали в пробирки с гепарином. Органы для выделения лимфоцитов помещали в чашку Петри, расположенную на льду. Кусочки органов для морфологических исследований фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин и окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leica DFC 320, Германия) и программы анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США).

Определение свободных аминокислот плазмы крови, тканей тимуса и селезенки, лимфоцитов крови, печени, тимуса и селезенки проводили в хлорнокислых экстрактах методом ВЖЭХ с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработку данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01.

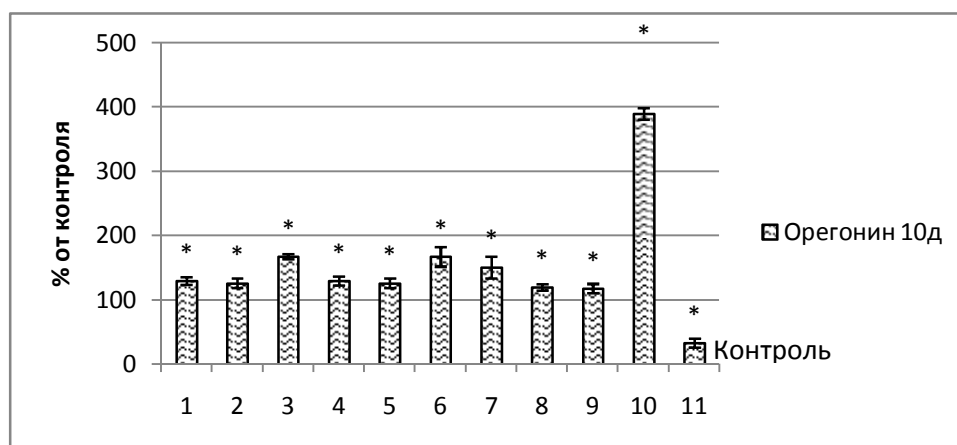
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаболические изменения и гистологическое строение органов иммунной системы после введения орегонина и тритарга

Однократное введение орегонина приводило к обеднению аминокислотного пула в плазме крови как через 3 ч (с 4067 ± 215 мкмоль/л до 3212 ± 143 мкмоль/л; $p < 0,05$), так и через 24 ч (с 4067 ± 215 мкмоль/л до 3244 ± 163 мкмоль/л ($p < 0,05$)). Снижались соотношение аргинин/цитруллин ($p < 0,05$) и уровни серосодержащих аминокислот – метионина ($p < 0,05$) и таурина ($p < 0,05$), при этом одновременное повышение концентрации фосфоэтаноламина ($p < 0,05$) свидетельствовало о модуляции синтеза фосфолипидов. В лимфоцитах тимуса однократное введение орегонина через 3 ч не влияло на структуру пула аминокислот. Через 24 ч отмечали повышение соотношения аргинин/цитруллин (что указывает на снижение синтеза NO) и уменьшение относительного количества АРУЦ (с $59,3 \pm 1,65\%$ до $52,4 \pm 1,84\%$). В лимфоцитах селезенки после однократного введения орегонина структура пула аминокислот не изменяется, но через 3 ч отмечается повышение уровня метионина (в 1,8 раза), а через 24 ч – снижение изолейцина (на 41%).

Курсовое введение орегонина способствовало увеличению содержания свободных аминокислот в плазме крови, общего количества протеиногенных аминокислот (с 4067 ± 215 мкмоль/л до 4782 ± 243 мкмоль/л ($p < 0,05$)), заменимых аминокислот (с 3066 ± 172 мкмоль/л до 3657 ± 222 мкмоль/л ($p < 0,05$)) и соотношения протеиногенных/азотсодержащих производные аминокислот (с

5,0±0,15 до 5,8±0,2 (p<0,05)) (рисунок 1). В лимфоцитах тимуса снижался индекс аргинин/орнитин, за счет увеличения концентрации орнитина (в 2,9 раза). При изучении гистологической структуры тимуса животных, получавших орегонин ежедневно в течение 10 суток, увеличивалась ширина коркового вещества долек и плотность в нем Т-лимфоцитов, количество тимусных телец в мозговом веществе. Данные изменения могут свидетельствовать об активации клеток тимуса.



* – статистически значимые различия со значениями в контрольной группе (p<0,05)

Рисунок 1 – Изменение содержания свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в плазме крови крыс, получавших орегонин (5 мг/кг x 10дн), относительно контрольных значений (контроль=100%).

1 – общее количество протеиногенных аминокислот, мкмоль/мл;

2 – общее количество заменимых аминокислот, мкмоль/мл;

3 – протеиногенные/производные аминокислот; 4 – Асп; 5 – Глу; 6 – Гли; 7 – Тре; 8 – Вал; 9 – ЦК; 10 – ФЭА; 11 – гидроксилизин.

На фоне стабильного аминокислотного фонда в лимфоцитах селезенки гистологическое исследование показало уменьшение размеров мальпигиевых телец, более четкое разделение зон, особенно герминативного центра, уменьшение плотности клеток в мантийной и краевых зонах, и одновременно, увеличение их количества в пульпарных тяжах, что, вероятно, обусловлено более активным включением клеток белой пульпы в иммунологический процесс.

В основе предложенной нами аминокислотно-микроэлементной композиции **тритарг** аминокислоты: аргинин, триптофан и таурин, каждая из которых обладает доказанным иммуномодулирующим действием на иммунокомпетентные клетки, а также цинк, незаменимый микроэлемент, недостаточность которого сопровождается выраженным нарушением развития иммунной системы [Greene J.M. et.al, 2013; Yoneda J. et.al., 2009].

Однократное внутрижелудочное введение животным тритарга через 15-90 мин повышает содержание свободных аминокислот ($p < 0,05$) в плазме крови. Через 3ч общее количество свободных аминокислот и их азотсодержащих производных снижается (с 5335 ± 532 мкмоль/л до 2665 ± 322 мкмоль/л ($p < 0,05$)), что, вероятно, отражает их транспорт в клетки тканей. Данный эффект сохраняется в течение 6 ч и продолжает фиксироваться через 24 ч. Как при внутрибрюшинном, так и при внутрижелудочном введении тритарга наблюдается обеднение аминокислотного пула плазмы крови. Внутрижелудочное введение тритарга вызывает более значимые изменения аминокислотного спектра.

Вероятно, основным ранним эффектом влияния тритарга на клетки тимуса является стимуляция белкового синтеза, что приводит к уменьшению относительного количества незаменимых аминокислот ($p < 0,05$), в первую очередь метионина (с $76 \pm 4,7$ нмоль/г до $58 \pm 4,0$ нмоль/г ($p < 0,05$)), как аминокислоты, лимитирующей процессы элонгации.

Однократное внутрижелудочное введение тритарга животным приводило к снижению общего количества АРУЦ в селезенке (1 ч и 12 ч) и изменяло уровни фосфоэтаноламина и β -аланина (через 1 ч и 6 ч), что могло оказывать влияние на липидный обмен и процессы синтеза КоА [Gemelli T. et. al., 2013; Arruda M. et.al., 2011]. Учитывая фундаментальную роль КоА в метаболизме, изменения количества его свободной формы будут оказывать влияние на обмен всех органических кислот, что возможно, находит отражение в изменении количества АРУЦ [Шейбак В.М., 1998].

Однократное внутрижелудочное введение тритарга способствует увеличению содержания свободных аминокислот и их азотсодержащих производных ($p < 0,05$) в лимфоцитах крови. Аналогично данным, полученным для лимфоцитов крови, однократное внутрижелудочное введение тритарга через 3 ч увеличивало содержание свободных аминокислот (с $60,8 \pm 9,20$ нмоль/ 10^6 клеток до $310,3 \pm 55,47$ нмоль/ 10^6 клеток ($p < 0,05$)) в лимфоцитах печени. Однако через 24 ч в лимфоцитах печени снижалось суммарное количество незаменимых аминокислот (с $10,4 \pm 1,54$ нмоль/ 10^6 клеток до $5,9 \pm 1,09$ нмоль/ 10^6 клеток ($p < 0,05$)), вероятно вследствие истощения аминокислотного пула в результате использования аминокислот для синтеза иммунорегуляторных белков. Анализ полученных данных показывает, что однократное введение тритарга через 3 ч увеличивает содержание незаменимых аминокислот в лимфоцитах тимуса (с $2,4 \pm 0,38$ нмоль/ 10^6 клеток до $6,1 \pm 1,8$ нмоль/ 10^6 клеток ($p < 0,05$)), а в последующем через 24 ч количество незаменимых аминокислот (с $2,4 \pm 0,38$ нмоль/ 10^6 клеток до $1,5 \pm 0,13$ нмоль/ 10^6 клеток ($p < 0,05$)) снижается ниже контрольных значений. В лимфоцитах селезенки через 3 ч после однократного внутрижелудочного введения тритарга увеличивалось содержание свободных

протеиногенных аминокислот (с $18,5 \pm 1,638$ нмоль/ 10^6 клеток до $58,5 \pm 13,9$ нмоль/ 10^6 клеток ($p < 0,05$)). Повышенный уровень серосодержащих аминокислот (с $4,8 \pm 0,52$ нмоль/ 10^6 клеток до $27,9 \pm 9,57$ нмоль/ 10^6 клеток ($p < 0,05$)), через 24 ч после введения тритарга, вероятно, обусловлен их активным участием в антигензависимой пролиферации и синтезе антител в лимфоцитах селезенки (В-лимфоциты) [Wu B. et.al., 2012]. Анализ изменений аминокислотного фонда в лимфоцитах, выделенных из крови, печени, тимуса и селезенки, показывает, что однократное введение тритарга оказывает однотипные эффекты в популяциях лимфоцитов, выделенных из крови, печени и тимуса. Для лимфоцитов селезенки характерно более длительное сохранение повышенного пула свободных аминокислот, что, вероятно, обусловлено выполняемой ими специфической функцией синтеза иммуноглобулинов. Данные, полученные нами после внутрибрюшинного введения тритарга, отличаются частичным несовпадением максимальных эффектов, но при этом сохраняется их общая направленность.

Комплексный анализ полученных результатов показывает, что ежедневное курсовое внутрижелудочное введение тритарга вызывает через 1 ч аминоацидемию. Однако через 1 ч после 10-кратного введения отмечается увеличение суммарного количества только серосодержащих аминокислот (с 254 ± 22 мкмоль/л до 526 ± 52 ($p < 0,05$)) (таблица 1). При этом на каждом сроке эксперимента регистрировалось увеличение содержания таурина ($p < 0,05$), триптофана ($p < 0,05$), а также метаболита аргинина – орнитина ($p < 0,05$). Через сутки после 3-кратного введения тритарга в плазме крови сохранялась аминоацидемия (с 3035 ± 154 мкмоль/л до 3784 ± 146 ($p < 0,05$)), однако в последующем данный эффект отсутствовал (таблица 2). Во все сроки наблюдения, через сутки после введения тритарга, регистрировали увеличение концентраций глутамина ($p < 0,05$), этаноламина ($p < 0,05$) и лейцина ($p < 0,05$).

В ткани тимуса острые эффекты введения тритарга после 3- и 7-кратного введения характеризовались уменьшением содержания АРУЦ ($p < 0,05$). Во все исследуемые сроки в ткани тимуса регистрировали увеличение содержания аргинина ($p < 0,05$) и орнитина ($p < 0,05$). После 7-кратного введения тритарга в тимусе уменьшается относительное количество АРУЦ, а после 10-кратного введения увеличивается соотношение заменимые/незаменимые аминокислоты, истощение фонда свободных аминокислот в клетках тимуса может свидетельствовать о стимуляции синтеза цитокинов, а также о повышенной потребности клеток в энергетических субстратах (особенно в глутамине). Данное предположение подтверждают и результаты, полученные после курсового введения тритарга в ткани селезенки, где также выявлено уменьшение общего количества АРУЦ, а также орнитина, что могло быть обусловлено повышенной потребностью в синтезе полиаминов, стимулирующих пролиферацию лимфоцитов.

Таблица 1 – Структура пула аминокислот в лимфоцитах, выделенных из селезенки после внутривенного введения тритарга (350 мг/кг массы), $M \pm m$

Изучаемый показатель	Контроль	Тритарг – 3ч	Тритарг – 24ч
Общее количество протеиногенных аминокислот, нмоль/ 10^6 клеток	18,5±1,63	58,5±13,9*	28,4±5,98
Общее количество заменимых аминокислот, нмоль/ 10^6 клеток	14,7±1,44	48,0±11,5*	23,5±4,85
Общее количество незаменимых аминокислот, нмоль/ 10^6 клеток	3,8±0,27	10,5±2,39*	4,9±1,14
Заменимые/незаменимые аминокислоты	3,7±0,30	4,7±0,15*	5,1±0,23*
Общее количество азотсодержащих производных аминокислот, нмоль/ 10^6 клеток	10,2±1,11	52,1±15,5*	21,1±3,82*
Общее количество серосодержащих аминокислот, нмоль/ 10^6 клеток	4,8±0,52	27,9±9,57*	12,9±3,29*
Протеиногенные/азотсодержащие производные аминокислот	1,9±0,14	1,2±0,07*	1,4±0,06*
Общее количество АРУЦ, нмоль/ 10^6 клеток	1,8±0,15	5,0±1,1*	3,1±0,91

Примечание – * – статистически значимые различия со значениями в контрольной группе ($p < 0,05$)

Влияние циклофосфамида на свободные аминокислоты плазмы крови, тимуса и селезенки и возможная коррекция выявленных нарушений композицией тритарг и диарилгептаноидом орегонином

Одновременное введение тритарга животным, получавшим циклофосфамид, уменьшало лейкопению, не влияя на соотношение показателей в лейкоцитарной формуле. Введение тритарга животным, получавшим циклофосфамид, в плазме крови приводило к статистически значимому увеличению общего содержания аминокислот и их производных (3369 ± 165 мкмоль/л до 3911 ± 150 мкмоль/л ($p < 0,05$)), данный эффект является неспецифическим и свидетельствует об активации протеолиза, в первую очередь в мышечных тканях [Goldstein S. et al., 1976]. Одновременно происходит резкое уменьшение популяции клеток в органах иммунной системы, продукты деградации которых подвергаются реутилизации, в том числе по аутофагосомному механизму [Барабанова С.В. и др., 2007; Mizushima N., 2007]. Введение циклофосфамида приводит к снижению числа клеток в ткани тимуса и селезенки, сопровождающихся резкой активацией

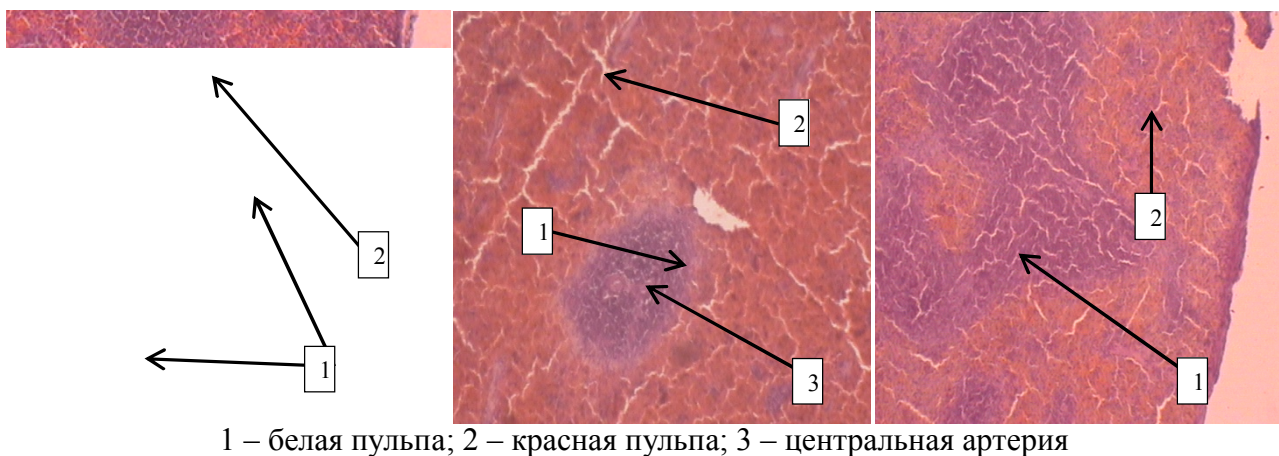
оставшихся клонов, стимуляцией экспрессии транспортеров аминокислот на мембранах для восполнения внутриклеточного пула аминокислот [Смирнов А.В. и др., 2010]. Эта адаптивная реакция после введения тритарга в ткани селезенки реализуется существенным увеличением концентраций аминокислот, особо необходимых для синтеза цитокинов и иммуноглобулинов – треонина (с 425 ± 58 нмоль/г до 664 ± 65 нмоль/г ($p < 0,05$)), лизина (476 ± 59 нмоль/г до 714 ± 52 нмоль/г ($p < 0,05$)) и валина (с 344 ± 31 до 443 ± 29 нмоль/г ($p < 0,05$)). Снижение фонда аминокислот (с 30412 ± 946 нмоль/г до 21353 ± 1600 нмоль/г ($p < 0,05$)) в ткани тимуса – свидетельство их активной утилизации в органах иммунной системы, вызываемых циклофосфамидом. Выявленные нами изменения структуры фонда могут свидетельствовать об усилении адаптивной реакции клеток тимуса и селезенки на поступление цитостатика при одновременном введении тритарга.

Таблица 2 – Структура пула аминокислот в плазме крови крыс, получавших тритарг (350 мг/кг массы, внутривенно), $M \pm m$

Изучаемый показатель	Контроль	Тритарг 3 раза (24ч)	Тритарг 7 раз (24 ч)	Тритарг 10 раз (24 ч)
Общее количество аминокислот и их азотсодержащих производных, мкмоль/л	3035±154	3784±146*	3293±144	3502±208
Общее количество протеиногенных аминокислот, мкмоль/л	2685±128	3320±134*	2883±149	3023±199
Общее количество азотсодержащих производных аминокислот, мкмоль/л	350±27	463±21*	410±11	479±22*
Общее количество заменимых аминокислот	1474±107	1932±102*	1854±85*	1826±127
Общее количество АРУЦ, мкмоль/л	318±23	402±24*	382±18	401±13*
Общее количество серосодержащих аминокислот, мкмоль/л	254±22	327±13*	286±15	314±14*

Введение циклофосфамида в комбинации с орегонином тормозит развитие лейкопении. В плазме крови крыс при совместном введении орегонина и циклофосфамида увеличиваются уровни азотсодержащих метаболитов протеиногенных аминокислот (с 3423 (3184; 3706) нмоль/мл до 3954 (3652; 4239) нмоль/мл; $p = 0,02088$). В ткани тимуса крыс введение орегонина и циклофосфамида в значительной степени нормализует аминокислотный баланс, особенно воздействуя на уровни незаменимых аминокислот и АРУЦ, которые являются инициаторами синтеза белка. Аналогичная тенденция выявляется и при анализе показателей обмена

аминокислот в ткани селезенки. Наблюдаемые протекторные эффекты орегонина при его совместном введении с циклофосфамидом в отношении клеток крови и метаболизма аминокислот в органах иммунной системы подтверждаются и данными гистологического исследования срезов селезенки. Введение орегонина препятствует уменьшению относительного объема белой пульпы и стабилизирует морфологическое строение этого органа иммунной системы (рисунки 2, 3, 4).



1 – белая пульпа; 2 – красная пульпа; 3 – центральная артерия

**Рисунок 2 –
Контроль. Селезенка.
Увеличение 40**

**Рисунок 3 –
Циклофосфамид.
Селезенка
Увеличение 40**

**Рисунок 4 –
Циклофосфамид+
Орегонин. Селезенка.
Увеличение 40**

Использование тритарга и антиоксиданта орегонина для коррекции нарушений аминокислотного баланса при алкогольной интоксикации

Совместное введение этанола и тритарга активирует катаболизм аминокислот, что проявляется увеличением количества азотсодержащих метаболитов (с 17323 ± 376 мкмоль/л до 18254 ± 663 мкмоль/л ($p < 0,05$)) и увеличивает плазменный пул серосодержащих аминокислот (с 10882 ± 256 мкмоль/л до 12025 ± 357 мкмоль/л ($p < 0,05$)). Введение тритарга препятствует развитию аминокислотного дисбаланса в ткани тимуса, а в ткани селезенки способствует увеличению общего количества аминокислот и их азотсодержащих производных ($p < 0,05$), повышает количество заменимых ($p < 0,05$) и серосодержащих аминокислот ($p < 0,05$) (таблица 3). В печеночных лимфоцитах тритарг также препятствует метаболическому дисбалансу, нормализуя показатели, характеризующие обмен свободных аминокислот и связанных с ними метаболически активных соединений.

Введение орегонина на фоне интоксикации этанолом увеличивало в плазме крови общее количество азотсодержащих производных аминокислот (с 626 ± 17 мкмоль/л до 763 ± 35 мкмоль/л ($p < 0,05$)), серосодержащих аминокислот

(с 435 ± 15 мкмоль/л до 528 ± 28 мкмоль/л ($p < 0,05$)), индексы АРУЦ/ААК (с $3,3 \pm 0,11$ до $2,7 \pm 0,06$ ($p < 0,05$)) и заменимые/незаменимые аминокислоты (с $2,5 \pm 0,04$ до $3,1 \pm 0,1$ ($p < 0,05$)) и снижало суммарное количество АРУЦ (с 614 ± 21 мкмоль/л до 521 ± 35 мкмоль/л ($p < 0,05$)), как при сравнении с животными, получавшими алкоголь, так и с контрольной группой. В ткани тимуса совместное введение этанола и орегонина снижало содержание незаменимых аминокислот (с 2393 ± 104 нмоль/г до 1831 ± 60 нмоль/г ($p < 0,05$)), абсолютное количество АРУЦ (с 1022 ± 44 нмоль/г до 735 ± 22 нмоль/г ($p < 0,05$)) и увеличивало соотношение заменимые/незаменимые аминокислоты (с $7,7 \pm 0,14$ до $9,3 \pm 0,2$ ($p < 0,05$)). При этом нормализовалось общее количество азотсодержащих производных и серосодержащих аминокислот. Следует отметить, что введение антиоксиданта орегонина на фоне алкогольной интоксикации приводило к нормализации уровня таурина в ткани тимуса. Протекторный эффект орегонина регистрировали и в ткани селезенки, где также увеличивалось общее количество азотсодержащих производных (с 20948 ± 588 нмоль/г до 24881 ± 838 нмоль/г ($p < 0,05$)), серосодержащих аминокислот (с 13325 ± 328 нмоль/г до 15966 ± 896 нмоль/г ($p < 0,05$)), индекс заменимые/незаменимые аминокислоты (с $6,7 \pm 0,2$ до $7,6 \pm 0,22$ ($p < 0,05$)).

Таблица 3 – Структура пула аминокислот в селезенке крыс после внутрижелудочного введения этанола и тритарга (350 мг/кг массы), $M \pm m$

Изучаемый показатель	Контроль	Этанол	Этанол + Тритарг
Общее количество протеиногенных аминокислот, нмоль/г	16714 ± 735	16366 ± 580	$19830 \pm 913^{* \dagger}$
Общее количество заменимых аминокислот, нмоль/г	14534 ± 635	14392 ± 536	$17371 \pm 776^{* \dagger}$
Общее количество незаменимых аминокислот, нмоль/г	2180 ± 116	1974 ± 74	$2459 \pm 176^{\dagger}$
Общее количество производных аминокислот мкмоль/г	20948 ± 588	23093 ± 915	$25279 \pm 880^{*}$
Общее количество серосодержащих аминокислот мкмоль/г	13325 ± 328	$15215 \pm 711^{*}$	$16343 \pm 661^{*}$
% АРУЦ от суммы незаменимых аминокислот	46 ± 1	46 ± 1	$40 \pm 1^{* \dagger}$

Примечание 1 – * – статистически значимые различия со значениями в контрольной группе ($p < 0,05$);

Примечание 2 – † – статистически значимые различия со значениями группы животных, получавших этанол ($p < 0,05$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Однократное введение аминокислотно-микроэлементной композиции тритарг вызывает модуляции аминокислотного пула плазмы – развивающаяся гипераминоацидемия в течение суток сменяется гипоаминоацидемией. После курсового введения тритарга регистрируется гипераминоацидемия, обусловленная увеличением в плазме концентраций глутамина, таурина, треонина, валина, гидроксипролина и этаноламина. В клетках тимуса и селезенки тритарг способствует снижению уровней валина, лейцина и повышению уровня орнитина. В условиях экспериментальной иммуносупрессии тритарг повышает количество потребляемой лимфоцитами глюкозы [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 17, 19, 22].

2. Внутривенное введение циклофосфида вызывает гипоаминоацидемию, вследствие снижения уровней глутамата (с 659 ± 24 мкмоль/л до 508 ± 18 мкмоль/л), серина (с 311 ± 19 мкмоль/л до 232 ± 16 мкмоль/л), гистидина (с 57 ± 2 мкмоль/л до $39 \pm 1,8$ мкмоль/л), валина (с 229 ± 12 мкмоль/л до 153 ± 5 мкмоль/л), аланина (с 577 ± 26 мкмоль/л до 386 ± 50 мкмоль/л), триптофана (с 116 ± 4 мкмоль/л до 70 ± 8 мкмоль/л) и метионина (с 70 ± 8 мкмоль/л до 47 ± 3 мкмоль/л). В тимусе обеднение аминокислотного фонда обусловлено падением концентраций аспартата (с 3311 ± 167 нмоль/г до 2409 ± 262 нмоль/г), глутамата (с 7359 ± 226 нмоль/г до 4952 ± 569 нмоль/г), цитруллина (с $128 \pm 7,3$ нмоль/г до 54 ± 6 нмоль/г) и цистатинина (с 195 ± 10 нмоль/г до 52 ± 9 нмоль/г). При интоксикации циклофосфидом введение тритарга повышает общее содержание аминокислот и их производных в плазме крови, нормализует в ткани тимуса концентрации треонина, фенилаланина, лейцина, метионина, валина, аргинина и гистидина, повышает в ткани селезенки уровни треонина (с 425 ± 58 нмоль/г до 664 ± 65 нмоль/г), лизина (с 476 ± 59 нмоль/г до 476 ± 59 нмоль/г) и валина (с 344 ± 31 нмоль/г до 443 ± 29 нмоль/г), что способствует более активному их использованию для биосинтетических целей. Тритарг препятствует снижению числа лейкоцитов в крови и повышает фагоцитарную активность нейтрофилов [9, 12, 13, 24].

3. Острая алкогольная интоксикация характеризуется снижением общего содержания аминокислот в тимусе (с 22827 ± 973 нмоль/г до 19951 ± 1282 нмоль/г) при одновременном повышении концентраций треонина, α -аминомасляной кислоты и орнитина. Нарушение аминокислотного баланса в ткани и лимфоцитах селезенки регистрируются при субхронической алкогольной интоксикации и характеризуется снижением в селезенке концентраций аспарагина, гистидина, аргинина, триптофана и лизина, а в лимфоцитах – изменениями уровней пролина, цистеиновой кислоты и фосфоэтаноламина. В лимфоцитах селезенки уменьшается общее количество

азотсодержащих метаболитов аминокислот (с $18,9 \pm 2,43$ нмоль/ 10^6 клеток до $11,2 \pm 2,24$ нмоль/ 10^6 клеток) и повышается общее количество АРУЦ (с $2,8 \pm 0,18$ до $7,3 \pm 1,44$ нмоль/ 10^6 клеток). При острой алкогольной интоксикации в лимфоцитах печени увеличивается общее количество азотсодержащих метаболитов аминокислот (с 78 ± 9 нмоль/ 10^6 клеток до 122 ± 16 нмоль/ 10^6 клеток) и общее количество серосодержащих аминокислот (с $69 \pm 9,9$ нмоль/ 10^6 клеток до 112 ± 14 нмоль/ 10^6 клеток). Субхроническая алкогольная интоксикация приводит к повышению в лимфоцитах печени содержания протеиногенных аминокислот (с $66 \pm 8,4$ нмоль/ 10^6 клеток до 119 ± 22 нмоль/ 10^6 клеток) [12, 16, 20].

4. Введение тритарга при алкогольной интоксикации препятствует развитию аминокислотного дисбаланса в тимусе и селезенке, способствуя повышению в селезенке общего количества аминокислот (с 16714 ± 735 нмоль/г до 19830 ± 913 нмоль/г) и уровней фосфоэтаноламина (с 6914 ± 349 нмоль/г до 8186 ± 408 нмоль/г), 1-метилгистидина (с $6,59 \pm 0,82$ нмоль/г до $12,8 \pm 1,2$ нмоль/г), а также к нормализации в ткани тимуса уровней серосодержащих аминокислот: таурина и цистатионина. В лимфоцитах печени тритарг препятствует метаболическому дисбалансу, стабилизируя показатели, характеризующие обмен свободных аминокислот и их метаболитов – общее количество заменимых (аспарагин, глутамин, аланин) и незаменимых (триптофан) аминокислот, общее количество АРУЦ (лейцин) [18, 21, 25].

5. Однократное введение орегонина приводит к гипоаминоацидемии (с 4067 ± 215 мкмоль/л до 3212 ± 143 мкмоль/л), снижению соотношения аргинин/цитруллин, концентраций метионина и таурина. При курсовом введении орегонина развивается гипераминоацидемия и увеличивается относительное количество заменимых аминокислот в лимфоцитах тимуса и селезенки. Протекторные эффекты орегонина при его совместном введении с циклофосфамидом проявляются в существенном уменьшении лейкопении, стабилизации аминокислотного баланса, увеличением общего количества серосодержащих аминокислот (с $228,5 \pm 17,95$ мкмоль/л до $296,4 \pm 9,84$ мкмоль/л). Использование орегонина в условиях экспериментальной иммуносупрессии повышает потребление глюкозы лимфоцитами тимуса (на 180%) и селезенки (на 71%). Одновременное введение орегонина и циклофосфамида препятствует изменениям гистологического строения тимуса и селезенки. При алкогольной интоксикации орегонин способствует сохранению нормального аминокислотного баланса в ткани селезенки, одновременно статистически значимо повышая общее количество азотсодержащих производных (с 626 ± 17 мкмоль/л до 763 ± 35 мкмоль/л) и серосодержащих аминокислот (с 435 ± 15 мкмоль/л до 528 ± 28 мкмоль/л) [4, 5, 10, 11, 23, 26].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Выявленная нами биологическая активность аминокислотно-микроэлементной композиции тритарг – дозозависимый модулирующий эффект на функциональную активность нейтрофилов и влияние на формирование аминокислотного фонда в клетках иммунной системы, позволяет констатировать наличие у данной композиции иммуномодулирующего эффекта. Эти данные защищены патентом на изобретение (№ 16804 «Композиция, обладающая иммуномодулирующей активностью», авторы: Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю., Горецкая М.В. (дата регистрации 29.10.2012 г.)). Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшем изучении иммуномодулирующих свойств отдельных аминокислот и их композиций с микроэлементами, а также разработке на основе тритарга лекарственного средства для иммунокоррекции.

2. Способность орегонина оказывать иммуномодулирующее действие путем влияния на клеточные реакции, биохимические процессы и клеточную структуру тимуса и селезенки оформлена в прошедшей предварительную экспертизу заявке на выдачу патента на изобретение (№ а 20121404 от 06 ноября 2012 г. «Средство, обладающее иммуномодулирующим действием» авторы Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю., Мацюк Я.Р.). Полученные данные могут быть использованы для разработки подходов к метаболической коррекции иммунодефицитных состояний.

3. Данные о формировании аминокислотного пула плазмы крови и лимфоцитов при экзогенном введении аминокислот, а также о влиянии цитостатиков на лейкоцитарную формулу крови и возможности ее коррекции препаратами на основе аминокислот и цинка используются в учебном процессе кафедры биологической химии и кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга УО «Гродненский государственный медицинский университет» (акты внедрения от 28.08.2013 г.). Эти сведения рекомендуются к более широкому использованию в учебном процессе учреждений образования Министерства здравоохранения Республики Беларусь и при проведении научных исследований.

4. При выполнении диссертации, был разработан подход к изучению метаболической и функциональной активности лимфоцитов путем измерения количества поглощенной ими глюкозы, а также предложен способ определения количества общего белка в суспензии лимфоцитов (удостоверение на рационализаторское предложение № 1618 от 30.08.2012 г. и № 1612 от 30.11.2011 г.).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в научных журналах

1. Влияние тритарга на спектр протеиногенных аминокислот в сыворотке крови и лимфоцитах / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец, М. В. Горецкая, Е. М. Дорошенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – № 9. – С. 32-34. PMID: 22164445 [PubMed – indexed for MEDLINE].

2. Влияние композиции "Тритарг" на концентрацию свободных аминокислот в лимфоцитах и сыворотке крови крыс / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец, М. В. Горецкая, Е. М. Дорошенко, З. И. Куваева // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2012. – № 1. – С. 85-89.

3. Серосодержащие аминокислоты сыворотки крови и лимфоцитов после однократного введения аминокислотного комплекса «Тритарг» / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец, М. В. Горецкая, В. Ю. Смирнов // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. – 2011. – № 3. – С. 6-10.

4. Шейбак, В.М. Метаболическая активность лимфоцитов при введении биологически активных веществ и ксенобиотиков / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 4. – С. 37-43.

5. Шейбак, В. М. Влияние природных иммуномодуляторов на метаболическую активность лимфоцитов тимуса и селезенки интактных и получавших ацетат свинца животных / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2013. – № 1. – С. 46-53.

6. В. М. Шейбак, Аргинин и иммунная система – возможные механизмы взаимодействия / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // Вестник Витебского государственного университета. – 2013. – Том 12, № 1. – С 6-13

Статьи в научных сборниках

7. Влияние аминокислотно-микроэлементного комплекса на уровень протеиногенных аминокислот в сыворотке крови лимфоцитах тимуса и селезенки крыс / А. Ю. Павлюковец, В. М. Шейбак, М. В. Горецкая, Е.М. Дорошенко // Актуальные проблемы медицины: материалы ежегодной итоговой научной конференции. – Гродно, 2010. – С.73-76.

8. Капитурко, А. Ю. (Павлюковец А. Ю.) Содержание протеиногенных аминокислот в лимфоцитах, выделенных из крови и печени крыс, после введения смеси аминокислот и микроэлемента цинка / А. Ю. Капитурко (Павлюковец А. Ю.) // Актуальные теоретические и практические аспекты патофизиологии: материалы республиканской конференции с международным участием. – Гродно, 2010. – С. 291-295.

9. Павлюковец А. Ю. Влияние этанола и свинца на состояние иммунной системы млекопитающих / А. Ю. Павлюковец, В. М. Шейбак // Актуальные проблемы медицины: материалы ежегодной итоговой научной конференции. – Гродно, 2011. – С.370-373.

10. Павлюковец А. Ю. Иммунотропные эффекты орегонина / А. Ю. Павлюковец, В.М. Шейбак // Актуальные проблемы медицины: материалы ежегодной итоговой научной конференции. – Гродно, 2011. – С. 373-376.

11. Шейбак, В. М. Иммуносупрессия циклофосфамидом: цитопротекторный эффект орегонина / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец, Г. М. Тельшева // Актуальные проблемы медицины: материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции. – Гродно, 2013. – С. 309-313.

12. Шейбак, В. М. Циклофосфамид и этанол: общее и различия – метаболизм аминокислот в лимфоцитах селезенки / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец, В. Ю. Смирнов // Актуальные проблемы медицины: материалы научно-практической конференции, посвященной 55-летию УО «ГрГМУ». – Гродно, 2013 – С. 389-391.

13. Шейбак, В. М. Профилактика побочных метаболических эффектов циклофосфамида тритаргом / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // Сборник научных статей, посвященный памяти профессора М. С. Омелянчика «Современные проблемы гигиены, радиационной и экологической медицины» – Гродно, 2013. – С. 309-313.

14. Шейбак, В. М. Цинк и метаболический синдром: концентрации гликогенных аминокислот в плазме крови после введения «Тритарга» / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // Материалы I международного симпозиума «Метаболический синдром: эксперимент, клиника, терапия». – Гродно, 2013 – С. 248-252.

Тезисы докладов

15. Капитурко, А. Ю. (Павлюковец А. Ю.) Содержание протеиногенных аминокислот в лимфоцитах, выделенных из крови крыс, после введения смеси аминокислот и микроэлемента цинка / А. Ю. Капитурко (Павлюковец А. Ю.) // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора И. П. Протасевича. – Гродно, 2010. – С. 179.

16. Кортикостерон плазмы крови и баланс свободных аминокислот в тканях при острой алкогольной интоксикации у животных с низкой толерантностью к этанолу / В. М. Шейбак, Ю. А. Тарасов, А. Ю. Капитурко (Павлюковец А. Ю.), С. С. Чумаченко // Мат. межд. научно-практ. конф. «Фундаментальные и прикладные проблемы стресса». – Витебск, 2010. – С. 68-70.

17. Павлюковец, А. Ю. Влияние аминокислот аргинин, триптофан, и таурин на фагоцитарную активность нейтрофилов *in vitro* / А. Ю. Павлюковец

// Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора М. П. Шейбака. – Гродно, 2011. – С. 356-357.

18. Павлюковец, А. Ю. Аминокислоты лимфоцитов печени при введении крысам этанола и аминокислотной композиции / А. Ю. Павлюковец // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Д. А. Маслакова. – Гродно, 2012. – С. 319-320.

19. Павлюковец А. Ю. Влияние тритарга на метаболическую активность лимфоцитов *in vitro* / А. Ю. Павлюковец // Актуальные вопросы современной медицины и фармации. 64-я итоговая научно-практическая конференция студентов и молодых ученых. – Витебск, 2012. – С. 143-144.

20. Павлюковец, А. Ю. Субхроническая алкогольная интоксикация и свободные аминокислоты тимуса / А. Ю. Павлюковец // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Д. А. Маслакова, 19-20 апреля 2012 г. Гродно: ГрГМУ, 2012. – С. 320.

21. Павлюковец А. Ю. Алкогольная интоксикация у крыс вызывает аминокислотный дисбаланс в тимусе: возможность коррекции аминозолем «тритарг» / А. Ю. Павлюковец // Актуальные вопросы современной медицины и фармации Материалы 65-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых. – Витебск, 2013. – С. 487-488.

22. Павлюковец, А. Ю. Влияние аминокислотной композиции тритарг на уровень серосодержащих аминокислот в лимфоцитах / А. Ю. Павлюковец, Е. М. Дорошенко // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора М. П. Шейбака. – Гродно, 2011. – С. 355-356.

23. Павлюковец А. Ю. Структура селезенки крыс после введения орегонина / А. Ю. Павлюковец // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора М. В. Кораблева. – Гродно, 2013 – С. 333-334.

24. Павлюковец, А. Ю. Цитопротекторный эффект «тритарга» при иммуносупрессии циклофосфамидом / А. Ю. Павлюковец // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора М. В. Кораблева. – Гродно, 2013. – С. 332-333.

25. Correction of amino acid imbalance in liver lymphocytes caused by alcohol intoxication with aminozol "tritarg" / V. M. Sheibak, A. Y. Pauliukovets, A. M. Manidova, V. Y. Smirnov // Abstracts of the Polish Biochemical Society Meeting Poland, September 2nd 5th. – Toruń, 2013. – P. 27.

26. Cytoprotection effect of oregonin diarylheptanoid with a course administration of cyclophosphamide / A. Pauliukovets, A. Manidova, V. Sheibak, G. Telysheva // Abstracts of the Polish Biochemical Society Meeting Poland, September 2nd 5th. – Toruń, 2013. – P. 25.

РЭЗІЮМЭ

Паўлюкавец Анастасія Юр'еўна Фарміраванне фонду свабодных амінакіслот у імунакампетэнтных тканінах пры увядзенні жывёлам цыклафасфаміда, этанолу і яго каррэкцыя

Ключавыя словы: амінакіслоты, цыклофасфамід, этанол, арэганін, імунітэт.

Мэта даследавання: выяўленне асаблівасцяў фарміравання фонду свабодных амінакіслот у імунакампетэнтных тканінах пры ўвядзенні ў арганізм жывёл цыклафасфаміда, этанолу і/або амінакіслотна-мікраэлементнай кампазіцыі (трытарг), а таксама дзіарылгептаноіда арэганіна.

Метады даследавання: біяхімічныя, імуналагічныя, гісталагічныя і статыстычныя .

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Распрацавана амінакіслотна-мікраэлементная кампазіцыя (трытарг), якая валодае імунамадулюючымі ўласцівасцямі, увядзенне якой дазваляе ажыццяўляць карэкцыю амінакіслотнага дысбалансу пры ўвядзенні цыклафасфаміда або этанолу. Упершыню паказана, што курсавое ўвядзенне трытарга нармалізуе амінакіслотны дысбаланс, які выклікаецца ўвядзеннем цыклафасфаміда, які ўключае гіпаамінаацыдэмію і збядненне амінакіслотнага фонду ў тканінах тымуса і селязенкі, павышае агульнае ўтрыманне амінакіслот і іх вытворных у плазме, зніжае фонд свабодных амінакіслот у тканінах тымусу і селязенкі. Увядзенне трытарга перашкаджае развіццю амінакіслотнага дысбалансу ў тканінах тымусу і селязенкі, які развіваецца пры паступленні ў арганізм жывёл этанолу, спрыяе павышэнню агульнай колькасці амінакіслот і іх вытворных. У лімфацытах печані пры алкагольнай інтаксікацыі трытарг стабілізуе фонд свабодных амінакіслот і іх метабалітаў. Упершыню ў якасці карэктара метабалізму прапануецца арэганін, здольны стабілізаваць амінакіслотны фонд тканін пры інтаксікацыі цыклафасфамідам. Сумеснае ўвядзенне арэганіна і этанолу прыводзіць да гіперамінаацыдэміі, павелічэнню канцэнтрацый серазмяшчальных амінакіслот, а ў імунакампетэнтных тканінах да інтэнсіфікацыі біясінтэтычных працэсаў.

Рэкамендацыі па выкарыстанню: вынікі даследавання могуць выкарыстоўвацца пры вывучэнні імунамадулюючых уласцівасцяў амінакіслот і іх кампазіцый з мікраэлементамі, для распрацоўкі на аснове трытарга лекавага сродку і падыходаў да метабалічнай карэкцыі імунадэфіцытных станаў, а таксама ў навучальным працэсе.

Галіна выкарыстання: біяхімія, імуналогія, медыцына.

РЕЗЮМЕ

Павлюковец Анастасия Юрьевна

Формирование аминокислотного фонда в иммунокомпетентных тканях при введении животным циклофосфамида или этанола и его коррекция

Ключевые слова: аминокислоты, циклофосфамид, этанол, орегонин, иммунитет.

Цель исследования: выявление особенностей формирования фонда свободных аминокислот в иммунокомпетентных тканях при введении в организм животных циклофосфамида, этанола и/или аминокислотно-микроэлементной композиции (тритарг), а также диарилгептаноида орегонина.

Методы исследования: биохимические, иммунологические, гистологические и статистические.

Полученные результаты и их новизна. Разработана аминокислотно-микроэлементная композиция (тритарг), обладающая иммуномодулирующими свойствами, введение которой позволяет осуществлять коррекцию аминокислотного дисбаланса при введении циклофосфамида или этанола. Впервые показано, что курсовое введение тритарга нормализует аминокислотный дисбаланс, вызываемый введением циклофосфамида, включающий гипоаминоацидемию и обеднение аминокислотного фонда в тканях тимуса и селезенки, повышает общее содержание аминокислот и азотсодержащих производных в плазме, снижает фонд свободных аминокислот в тканях тимуса и селезенки. Введение тритарга препятствует развитию аминокислотного дисбаланса в ткани тимуса и селезенки, развивающегося при поступлении в организм животных этанола, способствует повышению общего количества аминокислот и их азотсодержащих производных. В лимфоцитах печени при алкогольной интоксикации тритарг стабилизирует фонд свободных аминокислот и их метаболитов. Впервые в качестве корректора метаболизма предлагается орегонин, способный стабилизировать аминокислотный фонд тканей при интоксикации циклофосфамидом. Совместное введение орегонина и этанола приводит к гипераминоацидемии, увеличению концентраций серосодержащих аминокислот, а в иммунокомпетентных тканях к интенсификации биосинтетических процессов.

Рекомендации по использованию: результаты исследования могут быть использованы при изучении иммуномодулирующих свойств аминокислот и их композиций с микроэлементами, для разработки на основе тритарга лекарственного средства и подходов к метаболической коррекции иммунодефицитных состояний, а также в учебном процессе.

Область применения: биохимия, иммунология, медицина.

SUMMARU

Pauliukavets Anastasia

Formation of the free amino acid fund in immune competent tissues with administration of cyclophosphamide, ethanol to the animal and its correction

Keywords: amino acids, cyclophosphamide, ethanol, oregonin, immunity.

The purpose of the study: To determine the characteristics features of the formation of free amino acid fund in immune competent tissues **with administration of cyclophosphamide, ethanol and/ or amino acid- micronutrient composition (tritarg) and diarilgeptanoid oregonin to the animal organism.**

Methods: biochemical, immunological, histological and statistical.

The results obtained and their novelty: Amino acid microelement composition (tritarg) possessing immunomodulatin properties has been developed. The composition allows to perform amino acid imbalance correction in case cyclophosphamide or ethanol administration. The first time ever it has been showed that multiple administration of tritarg correct amino acid imbalance caused by administration of cyclophosphamide, comprising hypo aminoacidemia and amino acids fund depletion in thymus and spleen tissues, increase the total content of amino acids and nitrogen-containing derivatives of plasma and also reduces free amino acids fund in thymus and spleen tissues. Administration of tritarg prevents the development of amino acid imbalance in thymus and spleen tissues, which occurs in case of administration of ethanol into the animal organism and also contributes to the increase total number of amino acids and nitrogen-containing derivatives. Tritarg stabilizes free amino acids fund and metabolites in the liver lymphocytes in case alcoholic intoxication. The first time ever oregonin can be recommended as a metabolism corrector which is able stabilize amino acid fund of the tissue in case of cyclophosphamide intoxication. Co-administration of oregonin and ethanol leads to hyper aminoacidemia; increase of sulfur-containing amino acid concentrations, and to intensification of biosynthetic processes in immune competent tissues.

Recommendations for use: results of the study can be used for the study of the immunomodulatory properties of amino acids and their compositions with microelements, to develop on the basis of tritarga drug and approaches to metabolic correction of immunodeficiency states, as well as in the academic activity in teaching.

Fields of application: biochemistry, immunology, medicine.

Научное издание

Павлюковец Анастасия Юрьевна

**ФОРМИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ФОНДА В
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ТКАНЯХ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЖИВОТНЫМ
ЦИКЛОФОСФАМИДА И ЭТАНОЛА И ЕГО КОРРЕКЦИЯ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Ответственный за выпуск С.Б. Вольф
Компьютерная верстка И.И. Прецкайло

Подписано в печать 05.12.2014.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Ризография.
Усл. печ. л. **1,40**. Уч.-изд. л. **1,35**. Тираж **80** экз. Заказ **209**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования
«Гродненский государственный медицинский университет».

ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.