

Санкт-Петербургская государственная медицинская академия  
им. И. И. Мечникова  
кафедра биологической химии с курсом биорганической химии

ОТЧЕТ ПО ТЕМЕ:

**«Исследование адаптогенных и антиоксидантных свойств  
Трансфер Фактора Эдвэнсд»**

Санкт-Петербург

2009 г

**РУКОВОДИТЕЛЬ РАБОТЫ:**

зав. каф. биохимии, доктор химических наук, профессор Дадали В. А.

**ИСПОЛНИТЕЛИ:**

**Павлова Р. Н.** – кандидат медицинских наук, доцент;

**Голованова Н. Э.** - кандидат биологических наук, доцент;

**Смертина М. Н.** - кандидат биологических наук, доцент;

**Кулеба В. А.** - кандидат медицинских наук, доцент;

**Агафонова О. А.** – старший преподаватель кафедры биохимии;

**Бейшебаева Ч. Р.** – ассистент кафедры биохимии;

**Махова Т. А.** – старший научный сотрудник отделения биохимических исследований ЦНИЛ;

**Мурзина А. А.** – научный сотрудник отделения биохимических исследований ЦНИЛ;

**Фаустова М. Е.** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения биохимических исследований ЦНИЛ;

## **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ (теоретическое обоснование и предпосылки исследований)**

Успехи цивилизации, научно-технический прогресс, достижения медицины, к сожалению, не привели к снижению инфекционных и неинфекционных болезней среди населения планеты. Напротив, растет число онкологических, сердечнососудистых, респираторных, эндокринных заболеваний, нервно-психических расстройств. Одной из причин такого положения является снижение коллективной резистентности населения планеты в результате глобального неблагоприятного воздействия на организм человека социальных (недостаточное и неполноценное питание), экологических (загрязнение атмосферы и окружающей среды техногенными факторами), медицинских (неоправданное применение некоторых лекарственных средств, наркотиков, алкоголя, стресс и др.) факторов. Все эти причины отрицательно влияют на иммунную систему, вызывают иммунодефициты.

Одним из основных способов поддержания нормального функционирования иммунной системы и восстановления иммунитета при иммунодефицитных состояниях является применение иммуномодуляторов. К иммуномодуляторам относятся природные и синтетические вещества, способные оказывать нормализующее действие на иммунную систему.

Наиболее приемлемыми и адекватными для организма человека являются естественные, так называемые, эндогенные иммуномодуляторы, основу которых составляют вещества, принимающие участие в регуляции иммунных процессов в организме человека и животных.

К таким иммуномодуляторам относится Трансфер Фактор (ТФ), представляющий собой концентрат природных пептидов [1], выделенных

впервые из лимфоцитов, а затем из молозива животных и человека, а также специально подготовленных куриных яиц.

ТФ уже многие годы успешно используются для лечения и профилактики бактериальных, вирусных, грибковых инфекций, паразитарных болезней, злокачественных опухолей, аутоиммунных, аллергических и эндокринных расстройств; первичных и вторичных иммунодефицитов; при болезнях, сопровождающихся нарушениями функций иммунной системы [2].

По сведениям С.Н. Kirkpatrick. и соавторов, ТФ, относящиеся к цитокинам, представляют собой пептиды, состоящие в среднем из 44 аминокислот. Следовательно, их молекулы имеют достаточно малый размер и низкую молекулярную массу - от 3500 до 10 000 дальтонов. По данным некоторых авторов эти границы сужены между 3500 и 5000 дальтонов [3].

ТФ не являются видоспецифическими и обладают универсальной эффективностью, независимо от биологического вида донора и реципиента. Следовательно, они могут с успехом использоваться у человека и различных млекопитающих, так как могут передавать иммунитет людям даже в том случае, если их источником является другой вид млекопитающего. Это и позволило использовать в качестве источника ТФ молозиво коров и желтки куриных яиц.

Существующие ТФ подразделяются на три основные фракции, названные в соответствии с их основным действием на иммунную систему: индукторы, антиген-специфичные ТФ и супрессоры [2]. Индукторы обеспечивают общую готовность иммунной системы. Антиген-специфичные ТФ представляют собой набор определенных антигенов, с помощью которых иммунная система может заранее научиться распознавать различные микроорганизмы, вирусы и т. д. Супрессоры не позволяют иммунной системе сосредотачивать всю свою силу на уже побежденной инфекции, игнорируя при этом другие угрозы. Кроме того супрессоры регулируют интенсивность иммунного ответа и тем самым предотвращают аутоиммунные реакции.

В отличие от антител, которые имеют большую молекулярную массу, молекулы ТФ имеют достаточно малый размер. Именно этим объясняется тот факт, что ТФ не имеют аллергенных свойств. При этом если антитела реализуют свое действие, присоединяясь к чужеродным белкам (антигенам), то ТФ действуют иначе. Они представляют собой сигнальные молекулы, которые «обучают» и «тренируют» незрелые иммунные клетки, подготавливая их к отражению угрозы.

ТФ являются молекулами иммунной памяти. Часть маленькой молекулы ТФ кодирует антигенную структуру организмов, воспринимаемых иммунной системой в качестве угрозы. Определенная последовательность аминокислот дает информацию о распознавании или запоминании этой угрозы с тем, чтобы в соответствии с этим запрограммировать нейтральные Т-лимфоциты. Этот набор Т-клеток увеличивается и включает цитотоксический лимфоцит (CTL), клетки Т-хелперы (ТН0, ТН1, ТН2), природные клетки-киллеры (НК-клетки) и Т-регуляторные клетки. Молекула ТФ располагается на верхушке «Н» подобного рецептора Главного комплекса гистосовместимости (или МНС). После этого соединение ТФ и МНС превращается в уникальную антиген-специфичную зону распознавания, готовую к контакту со своей реципрокной структурой в среде патогенных угроз.

Очевидно, что ТФ сами по себе не оказывают непосредственного воздействия на стимуляцию иммунитета. Скорее всего, в результате воздействия ТФ на иммунные клетки высвобождаются такие медиаторы как интерлейкины. Антигенпрезентирующая клетка должна обработать антигенные структуры микроба и выработать соответствующий пептид, в частности, ТФ. Затем антиген презентруется нейтральной Т-клетке любого типа или класса CD. Данный процесс представляет собой одно из звеньев общей цепи. Вначале МНС должен принять ТФ. Затем по сигналу Т-клетка экспрессирует рецепторы интерлейкина-2 (IL-2) и вырабатывается сам IL-2. Благодаря положительной обратной связи, Т-клетка становится очень активной. Во время презентации антигена дополнительно образуются другие цитокины. Эти процессы

происходят в лимфоидной ткани, где в большом количестве присутствуют НК-клетки и другие Т-клетки. Таким образом, окружающие клетки также активизируются, и в них увеличивается количество как IL-2, так и других интерлейкинов. Имеются данные о том, что хотя НК-клетки и содержат рецепторы для ТФ, они используют их не в целях распознавания, а скорее в целях управления ранней иммунной реакцией. Таким образом, усилительную функцию следует рассматривать, вероятно, как результат процесса обучения, осуществляемого ТФ.

Отмечено, что антиген-презентирующий компонент ТФ значительно снижает период выработки антител, ускоряя представление антигенов иммунокомпетентным клеткам. Не менее важным аспектом влияния этого компонента ТФ является неспецифическая активация макрофагальных реакций, способствующая завершению фагоцитозу, распознаванию любых антигенов макрофагами и их презентации другим иммунокомпетентным клеткам. Было установлено, что ТФ значительно активнее, чем широко известные иммуномодуляторы (эхинацея, алоэ и т. д.). ТФ усиливает активность НК на 103 %, ТФ Плюс, отличающийся добавлением природных растительных иммуномодуляторов и адаптогенов, на 243 %, ТФ Эдвенсд – 283 %, тогда как эхинацея – на 43 %, алоэ – на 15 % [2].

Обобщение широкого круга иммунологических исследований ТФ позволяет прийти к заключению, что он оказывает следующие виды действия на иммунную систему [4]:

- Регулирует клеточное и гуморальное звено иммунной системы, в частности, повышает активность естественных лимфоцитов-киллеров, которые стимулируют выработку иммуноцитоклинов;
- Является иммунорегулятором про- и контрвоспалительных цитокинов;
- Стимулирует Т-клеточный иммунитет, восстанавливает соотношение Т-хелперы/Т-супрессоры, повышает цитотоксичность лимфоцитов;
- Увеличивает цитотоксический потенциал НК-клеток;

- Вызывает образование в организме эндогенных интерферонов. Восстанавливает активность клеток-интерферонпродуцентов;
- Вызывает неспецифическую активацию макрофагов;
- Способствует завершению фагоцитозу;
- Способствует распознаванию антигенов макрофагами;
- Ускоряет этап презентации антигенов иммунокомпетентным клеткам;
- Сокращает время выработки антител;
- Усиливает местный иммунитет за счет снижения свободнорадикального окисления липидов и повышения стабильности цитомембран, что оказывает протекторное действие на эпителиальный покров слизистых, увеличивая конкурентную адгезию на них полезной микрофлоры;
- Способствует быстрой элиминации вирусов;
- Уменьшает иммунодепрессию, вызванную ксенобиотиками, лекарствами и канцерогенами;
- Резко сокращает частоту обострений при хронических заболеваниях, улучшает качество жизни больных;
- Повышает эффективность антибактериальных и противовирусных лекарств, хорошо совместим со всеми средствами традиционного лечения различных заболеваний, нередко уменьшая потребность в них;
- Совместим с химио- и лучевой терапией онкобольных, снижает их побочные, токсические осложнения; повышает иммунитет.
- Не вызывает аллергии, не имеет побочных эффектов, не имеет противопоказаний.

Первые препараты ТФ были выделены из крови. Для приготовления препаратов ТФ используется донорская кровь или кровь из специальных банков крови, срок хранения которой уже истек. Однако использование крови человека в качестве источника ТФ имеет много негативных моментов. В качестве альтернативного источника получения ТФ могут использоваться животные материалы, такие как кровь, селезенка и лимфатические узлы. Существует

также метод получения ТФ из лейкоцитов крови. В практическом отношении более важным и более широко используемым источником ТФ является молозиво. Для промышленного получения ТФ чаще всего используется молозиво, получаемое от дойных домашних животных [2].

Первоначально препараты ТФ назначались исключительно инъекционным путем, однако, дальнейшие исследования показали, что ТФ не расщепляется в ЖКТ и сохраняет свою эффективность при пероральном применении.

Компания «4-Life research», США представила на российский рынок несколько трансфер-содержащих продуктов:

1. "Трансфер фактор-тм" классический - концентрат ТФ из молозива коров.
2. "Трансфер фактор Эдвенсд" – смесь ТФ из молозива и желтков яиц.
3. "Трансфер фактор плюс" – сочетание с растительными иммуномодуляторами (грибами кордицепс, шиитаке, маитаке, агарикус, овсом, алое, листом оливы и др.).
4. "Трансфер фактор кардио" – сочетание специфического для сердечной мышцы ТФ с витаминами, минералами и растениями-кардиопротекторами для поддержки здоровья сердечно-сосудистой системы.
5. "Трансфер Фактор Глюкоуч" – для поддержания функционирования инсулинозависимых систем организма.

В новом продукте *Трансфер Фактор Эдвенсд* используется Трансфер Фактор Е-ХФ – фирменный патентованный концентрат ТФ из молозива коров и желтка куриных яиц.

Особенность ТФ Эдвенсд заключается в том, что он содержит антиген-специфичную фракцию, которая успешно ликвидирует воспалительный процесс в сосудистой стенке даже на самых ранних стадиях воспаления.

Экспериментальные исследования, проведенные в Онкологическом Центре им. Блохина РАМН, показали, что ТФ Эдвэнсд повышает активность естественных клеток-киллеров на 283%.

Иммуномодуляция является одним из важнейших механизмов адаптационных процессов организма и может быть отнесена к механизмам специфической адаптации. Однако физиологически адаптация – значительно более широкое понятие и включает многоплановые неспецифические механизмы.

Особую актуальность и фактически жизненную необходимость приобретает проблема повышения устойчивости организма и мобилизация его резервных возможностей, а, следовательно, направленный поиск эффективных и безопасных адаптогенов. Два обстоятельства делают эту проблему исключительно важной для современной медицины. Во-первых, необходимость адаптации больших контингентов людей к высоким нервно-эмоциональным нагрузкам, действию техногенных ксенобиотиков, электромагнитных полей, последствиям гиподинамии и нерационального питания; во-вторых, профилактика и лечение неинфекционных заболеваний (онкологических, сердечно-сосудистых, обмена веществ) [5].

Дизадаптация всегда носит многоплановый характер и затрагивает одновременно многие разбалансированные звенья адаптивного ответа. В основе дизадаптации и патогенетических механизмов практически любой патологии лежит нарушение состояния и функций биомембран, состояния иммунной системы, ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы, функционирование детоксикационных систем – ферментов семейства монооксигеназ и системы конъюгации. Становится очевидным, что повышение функционирования адаптивных механизмов возможно лишь при одновременном балансирующем воздействии на все основные звенья.

В настоящее время существует значительное количество средств, способных стимулировать защитные силы организма и тем самым повышать его работоспособность и сопротивляемость внешним факторам. Этот эффект

может достигаться с помощью как стимуляторов-допингов, так и стимулирующих средств – *адаптогенов*. Действие этих двух групп веществ на процессы клеточного метаболизма существенно различается. Эффект стимуляторов-допингов реализуется посредством возбуждения определенных структур центральной нервной системы, которые, в свою очередь, активизируют метаболические процессы, протекающие в различных органах и тканях. Действие их проявляется быстро, но оно непродолжительно. Поскольку данная форма стимуляции сопровождается истощением, она не может быть физиологической. Иная картина характерна для использования адаптогенных средств. В этом случае анаболические процессы, суть которых заключается в синтезе структурных веществ и богатых энергией соединений, превалируют над процессами катаболизма. В результате происходит физиологическая гармоничная мобилизация всех защитных сил. Эти вещества, расширяя узкие места метаболизма, предупреждают нарушение энергетических и пластических процессов в тканях. Они способны длительное время поддерживать в экстремальных условиях постоянство внутренней среды. Способность таких веществ активизировать защитные силы организма и тем самым повышать его резистентность к экстремальным агентам, дало основание выделить их в особую группу - адаптогены.

Анализируя данные об адаптогенах, можно считать, что на организменном уровне они действуют следующим образом [6]:

- тонизируют центральную нервную систему, улучшают процессы обучения, памяти, условнорефлективную деятельность, повышают умственную работоспособность, улучшают синаптическую передачу в симпатических и парасимпатических волокнах периферической нервной системы;

- нормализуют функцию эндокринной системы организма (регуляция анаболических и катаболических процессов);

- контролируют процесс образования и расхода энергии в исполнительных клетках (мышц, печени, почек, мозга и других органов);

- восстанавливают иммуносупрессивный эффект как следствие тренировочного и соревновательного процессов, влияя на гуморальный и клеточный иммунитет;

- способствуют антиоксидантному действию в организме, предотвращая токсические процессы свободнорадикального окисления ненасыщенных жирных кислот, которые активируются при истощающей физической нагрузке;

- предотвращают гипоксию;

- обладают анаболизующими эффектами, которые необходимо поддерживать при истощении организма, интенсивной физической работе и т. д.;

- улучшают микроциркуляцию головного мозга и работающих мышц за счет улучшения реологических свойств крови.

Как следует из основных положений теории адаптации, необходимым условием снижения риска развития патологических состояний при воздействии на организм неблагоприятных факторов является адекватность мобилизации его адаптивных механизмов. Динамическое понятие адаптации отражает процесс приспособления организма к меняющимся условиям внешней среды, обеспечивающий устойчивое существование и нормальную жизнедеятельность. С позиции физиологии человека, адаптация обозначает совокупность физиологических реакций, обеспечивающих приспособление строения и функций организма или его органов к изменению окружающей среды. Суть физиологической адаптации – в способности организма сохранить жизненно важные параметры гомеостаза, обеспечивающие его благоприятное существование в условиях стрессовых воздействий [5].

Наступление состояния адаптации характеризуется морфологическими, физиологическими и биохимическими сдвигами, возникающими на разных уровнях биологической системы (от организменного до молекулярного), и имеет в своей основе метаболическую адаптацию, то есть количественные изменения уровня обменных и энергопродуцирующих процессов [7].

На уровне целостного организма эти изменения носят системный характер и контролируются регуляторными механизмами центральной нервной системы (ЦНС) и эндокринной системы.

На клеточном уровне адаптация характеризуется соответствующими изменениями чувствительности клеточных рецепторов различных типов и соответствующих исполнительных механизмов к действию как гормонов и нейротрансмитеров, так и экзогенных биологически активных веществ.

Важными интегральными механизмами адаптации на молекулярном и клеточном уровнях являются [5]:

1. изменение состояния мембранного аппарата клетки, микровязкости липидного бислоя, селективной проницаемости,
2. состояние и активность рецепторов и ионных каналов,
3. состояние мембранных ферментных систем; в первую очередь тесно связанных и взаимодействующих между собой полифункциональных блоков, выполняющих функцию защиты организма от повреждающих факторов на всех уровнях:
  - система антирадикальной и антиперекисной защиты, контролирующая уровень свободнорадикальных и перекисных процессов на клеточном, тканевом и органном уровнях;
  - система микросомальных монооксигеназ как первая фаза детоксикации ксенобиотиков, которая представляет собой электронотранспортную цепь, организованную в белково-липидный комплекс, катализирующую реакцию включения атома кислорода в молекулу гидрофобных соединений. Центральным компонентом этой системы является цитохром P-450. Метаболизированные на этой стадии гидрофобные соединения вступают во вторую, завершающую стадию детоксикации – реакции конъюгации.

В соответствие с задачей настоящей работы рассмотрим более подробно основные аспекты функционирования системы антиоксидантной и антиперекисной защиты.

Система антирадикальной и антиперекисной защиты представляет собой многоуровневую и многофункциональную систему, поддерживающую физиологический уровень активных форм кислорода и свободных радикалов, и защищающую биологические системы организма от их повреждающего действия. Она включает два основных звена:

- ферментативное, представленное ферментами антирадикальной и антиперекисной защиты: супероксиддисмутазой, глутатионпероксидазой, каталазой, глутатион-S-трансферазой, а также ферментами, поддерживающими уровень восстановленного глутатиона: глутатионредуктазой и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и др.

- неферментативное, под которым подразумеваются низкомолекулярные антиоксиданты, такие как витамин С, липоевая кислота, флавоноиды, токоферолы, каротиноиды и др., их аддитивные и синергистические композиции.

#### *Ферментативное звено антирадикальной и антиперекисной защиты.*

Важное место в системе ферментативной защиты занимает супероксиддисмутаза как фермент первой линии антирадикальной защиты. *Супероксиддисмутаза* (СОД) (КФ 1.15.1.1), систематическое название «супероксид:супероксид-оксидоредуктаза». СОД имеет несколько изоферментных форм, отличающихся по строению активного центра и структурной организации молекулы. В организмах млекопитающих выделяют 3 основные изоформы СОД: медь-цинкзависимая (Cu, Zn-СОД; СОД1), марганцевая (Mn-СОД; СОД2) и экстрацеллюлярная (Э-СОД; СОД3). Металлы, входящие в структуру СОД Cu, Zn-СОД обеспечивают высокую устойчивость фермента к внешним воздействиям. Медь-цинкзависимая (Cu, Zn-СОД; СОД1) является главным цитозольным изоферментом, однако ее также выделяют в ядрах, пероксисомах, лизосомах и митохондриях клеток эукариот. Основная часть фермента содержится в цитозоле, в межмембранном пространстве митохондрий и на поверхности пероксисом [8].

СОД существенно (на семь порядков) ускоряет дисмутацию супероксиданион-радикала (1), предотвращая образование весьма активного синглетного кислорода, образующегося в неферментативной реакции дисмутации.



Образующаяся в результате реакции (1) перекись - более сильный окислитель, чем  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , к тому же дающий начало к образованию чрезвычайно активного  $\text{OH}^{\bullet}$ -радикала. В условиях дефицита каталазы и глутатионпероксидазы высокая активность СОД может служить причиной развития деструктивных процессов [8].

Вместе с тем СОД, удаляя  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , исключает его взаимодействие с  $\text{NO}^{\bullet}$ , тем самым предотвращая образование пероксинитрита – гораздо более опасного прооксиданта и окислителя, чем перекись водорода. Кроме того удаление  $\text{O}_2^{\bullet-}$  необходимо для защиты от окисления внутриклеточного глутатиона, который в восстановленном состоянии выступает эффективной ловушкой свободных радикалов [9].

Cu, Zn-СОД также может восстанавливать  $\text{NO}^{\bullet}$ -радикал с образованием  $\text{NO}^-$  (3), который в результате взаимодействия с молекулярным кислородом дает начало агрессивному пероксинитриту; фермент также способен катализировать обратную реакцию окисления нитроксил-аниона (2) [10].



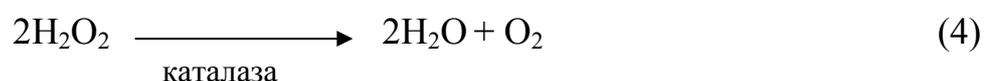
СОД выполняет не только защитную, но и регуляторную функции, будучи ключевым звеном системы регуляции стационарной концентрации  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [8].

### *Каталаза*

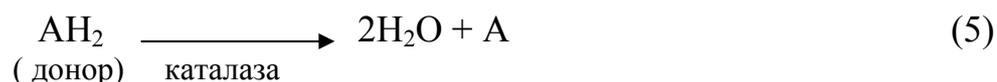
Каталаза (КФ 1.11.1.6, систематическое название « перекись–водорода: перекись-водорода-оксидоредуктаза») – гемсодержащий фермент с молекулярной массой около 250 кДа. По структуре каталаза является

тетрамером, содержащим по одной прочносвязанной гемовой простетической группе на субъединицу, при этом сами по себе субъединицы не обладают каталитической активностью. В организме человека и животных максимальное содержание фермента обнаружено в эритроцитах, а также в печени и почках; концентрация ее в мозге, щитовидной железе, половых железах и соединительной ткани мала [11].

В клетках каталаза локализована преимущественно (89%) в пероксисомах, где ее концентрация достигает  $10^{-6}$ М (в гепатоцитах на каталазу приходится 40% белка пероксисом), в цитозоле выявляется около 20% от общего содержания фермента. Разложение перекиси водорода каталазой осуществляется в реакции (4):



Одна молекула каталазы за секунду может восстановить до 44000 молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В окисленном состоянии каталаза может работать как пероксидаза (КФ 1.11.1.7, систематическое название «донор: перекись – водорода - пероксидаза»), катализируя окисление спиртов, фенолов или альдегидов (5):



В физиологических условиях каталазная активность фермента из клеток млекопитающих примерно в 10000 раз выше, чем пероксидазная. Показана и прооксидантная роль каталазы: так, она может выступать источником образования активных форм кислорода – около 0,55 кислорода, образующегося в результате разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$ , возникает в возбужденном синглетном состоянии [12].

В клетках, согласно современным представлениям, каталаза препятствует накоплению  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которая оказывает повреждающее действие на клеточные компоненты. Ингибирование внутриклеточной каталазы на 55% вызывает гибель фибробластов человека в культуре [8].

Каталаза относится к ферментам, которые наиболее длительно сохраняют свою высокую активность, почти не требуют энергии активации, скорость реакции этого энзима лимитируется лишь скоростью диффузии субстрата к активному центру. Показано также, что каталаза может присоединять четыре молекулы НАДФН, что предохраняет ее от инактивации и повышает ферментативную активность [13].

### *Глутатионпероксидаза*

Для инактивации перекиси водорода в клетках высших животных существует еще одно важное семейство ферментов - глутатионпероксидазы (ГПО), (КФ 1.11.1.9, систематическое название «глутатион: перекись-водорода-оксидоредуктаза»). Помимо расщепления перекиси водорода, глутатионпероксидаза активно инактивирует органические гидроперекиси, в том числе гидроперекиси высших жирных кислот, как свободных, так и в составе фосфолипидов биомембран.

ГПО катализирует реакцию восстановления перекиси водорода до воды и органических гидроперекисей до спиртов с использованием глутатиона (GSH) (6, 7).



а также пероксинитрита (8)



Установлено, что в состав ГПО входит селен, и каждая молекула фермента содержит 4 атома селена, входящего в состав селеноцистеиновых остатков; на тетрамере имеется 2 активных глутатион-связывающих центра [14].

ГПО играет важную роль в обеспечении функции клеток. Селеновые ГПО регулируют биосинтез эйкозаноидов, контролируют содержание органических гидроперекисей, и опосредованно – активность циклооксигеназы и липооксигеназы, участвуя в патогенезе воспалительного ответа [15, 16, 17].

Активность ГПО регулируется доступностью восстановленного глутатиона, количество которого зависит от активности глутатионредуктазы, содержания НАДФН и работы пентозофосфатного цикла. Таким образом, на разложение гидроперекисей в клетке влияет состояние метаболизма глюкозы, рН, и целый ряд факторов, влияющих на содержание глутатиона и НАДФН.

ГПО является ключевым ферментом в защите, как в норме, так и условиях окислительного стресса. Снижение активности внутриклеточной ГПО на 21% в культуре фибробластов вызывает гибель клеток в нормальных условиях, и для получения такого же результата необходимо ингибирование каталазы на 55% , в то время как ингибирование цитозольной СОД не является летальным [18].

### *Глутатион – S- трансфераза*

Глутатион-S-трансфераза (GST), (КФ 2.5.1.18, систематическое название «RX: глутатион-R-трансфераза») является важным ферментом системы второй фазы в детоксикации электрофильных алкилирующих агентов. Ферменты, обладающие глутатионтрансферазной активностью, широко распространены в природе и принадлежат к трем основным семействам, два из которых, цитозольные и митохондриальные GST, относятся к водорастворимым белкам, а GST третьего семейства, микросомальные, липофильны и в настоящее время носят название «мембранные» белки метаболизма эйкозаноидов и глутатиона (MAPEG, membraneassociated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) [19].

У млекопитающих GST представлены преимущественно цитозольным семейством; в печени человека они составляют 2-4% цитозольного белка [20].

Главная функция GST – катализ реакций конъюгации электрофильных гидрофобных соединений с глутатионом с образованием более водорастворимых соединений, а также защита клеток от продуктов перекисного окисления липидов. Благодаря тому, что это семейство изоферментов, система GST способна обезвреживать широкий круг разнообразных соединений эндогенного и экзогенного происхождения. В разных органах GST выполняет

разные функции. Так, печеночная GST способна как обезвреживать продукты перекисного окисления липидов, так и образовывать конъюгаты с глутатионом, которые затем распадаются до меркаптуровых кислот. Что касается эритроцитарной GST, то она только образует конъюгаты с глутатионом, которые затем транспортируют в печень, при этом продукты перекисного окисления липидов она не обезвреживает.

Обезвреживание ксенобиотиков с участием GST может осуществляться тремя различными способами:

1. путем конъюгации субстрата R (электрофильное гидрофобное соединение) с глутатионом (GSH) (9):



2. в результате нуклеофильного замещения (10):



Глутатионовые конъюгаты затем превращаются в меркаптуровые кислоты:



3. восстановление органических пероксидов до спиртов (12):



В отличие от селенсодержащей ГПО, для которой лучшими субстратами являются гидрофильные гидроперекиси с малым размером молекулы, GST не взаимодействует с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В то же время она эффективно восстанавливает гидрофобные гидроперекиси с большим объемом молекулы: гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и арахидоновой),

фосфолипидов, а также гидроперекиси мононуклеотидов и ДНК, участвуя тем самым в их репарации [21, 22].

Кроме того, GST конъюгирует с глутатионом токсичные продукты перекисного окисления липидов (ноненали, децинали, холестерин- $\alpha$ -оксид), способствуя тем самым их выведению из организма. Таким образом, ГТ являются важным компонентом системы детоксикации и антиоксидантной защиты, особенно от эндогенных метаболитов, образующихся при окислительном стрессе [19, 20, 23].

### *Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа*

Глюкозо-6-фосфат (Г-6-ФДГ), ЕС 1.1.1.49, систематическое название: D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза, является ключевым ферментом пентозофосфатного пути окисления глюкозы и катализирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконолактона. Г-6-ФДГ содержится почти во всех тканях животного организма. Особенно богаты им эритроциты, жировая ткань, лактирующая молочная железа, селезенка, тимус, кора надпочечников. Меньшее количество фермента содержится в печени, поджелудочной железе, почках, легких, мозге и слизистой оболочке желудка, в скелетной и сердечной мышцах – только следы фермента, а в сыворотке крови его вообще нет. Г-6-ФДГ локализуется в цитозоле клеток [24]. Фермент высоко специфичен к субстрату – глюкозо-6-фосфату и коферменту – НАДФ.

Пентозофосфатный путь в эритроцитах поставляет НАДФН для восстановления окисленного глутатиона в восстановленный, и эта реакция катализируется ферментом глутатионредуктазой. Восстановленный глутатион необходим для работы ГПО и GST.

### *Неферментативное звено антирадикальной и антиперекисной защиты.*

Неферментативное звено антиоксидантной и антиперекисной защиты представлено разнообразными низкомолекулярными антиоксидантами, которые с точки зрения растворимости в системе масло/вода делятся на

водорастворимые и жирорастворимые, что предопределяет их локализацию в тканях, биодоступность и скорость элиминирования [5]. К водорастворимым антиоксидантам относят: витамины С, витамины группы В, липоевую кислоту, пантотеновую кислоту, флавоноиды, катехины, глутатион, цистеин, а также минералы – цинк, медь, селен. К жирорастворимым антиоксидантам относят: токоферолы, токотриенолы, ретинол, каротиноиды, убихинон (убихинол), лигнаны, фосфолипиды. С точки зрения механизмов действия антиоксиданты неферментативного звена классифицируются как антиоксиданты прямого действия (флавоноиды, лигнаны, убихинон, витамин Е, витамин С, витамин А и др.) и антиоксиданты непрямого действия (витамин РР, цистеин, минералы – цинк, медь, селен) [5].

Защитное действие антиоксидантов в целом определяется следующими механизмами [5]:

1. прямое взаимодействие оксидантов с антиоксидантами, например, аскорбиновой кислотой, флавоноидами, восстановленным глутатионом.
2. Улавливание свободных радикалов и синглетного кислорода токоферолами, аскорбиновой кислотой, витаминами группы В, каротиноидами, СОД.
3. Восстановление гидропероксидов при участии ГПО (селензависимой) и GST (т. е. селеннезависимой ГПО).
4. Связывание и удаление из сферы реакции переходных металлов ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и других) хелаторами различной природы, например, флавоноидами, имидазолсодержащими дипептидами (карнозин, ансерин), белками-металлотионеинами, а также полипептидами.
5. Защитное действие «структурных» антиоксидантов (фосфолипиды, холестерин, токоферолы), предотвращающих контакт активных форм кислорода с функциональными компонентами клетки или ее специфическими сайтами, в первую очередь мембранными белками.
6. Замещение и репарация повреждений путем влияния на метаболические процессы и репарационные ферментные системы (например, защита клеточных структур селеном в составе Se-зависимых ферментов и токоферолами или

селеном, аскорбиновой кислотой и токоферолами через селензависимую ГПО; цинком и медью через Zn,Cu-СОД, а также металлотионеины).

Пути 1-5 осуществляются превентивными и цепь-образующими антиоксидантами (антиоксиданты первого уровня защиты), путь 6 – репарационными (антиоксиданты второго уровня защиты).

Многие компоненты антиоксидантной системы являются полифункциональными, и их влияние осуществляется не только в разных звеньях этой системы, но и по различным механизмам. Например, антиоксидантное действие цинка опосредуется металлотионеинами, биосинтез которых индуцируется цинком, Zn,Cu-СОД, содействием повышению биодоступности витамина А и т. д.

Для нормального функционирования столь сложной и многоплановой системы, как антиоксидантная система, необходим широкий набор биоантиоксидантов, включающихся одновременно во многие пункты этой системы, что обеспечивает координированную коррекцию системы в целом и поддерживает тем самым антиоксидантный гомеостаз организма.

Важной особенностью действия биоантиоксидантов являются сложные, многостадийные механизмы действия, включающие аддитивные, синергические и антагонистические взаимодействия, которые и обеспечивают высокую эффективность и сбалансированность функционирования антиоксидантной системы клетки. Как известно, процесс свободнорадикального и перекисного окисления липидов протекает по цепному механизму. Этот процесс может быть ингибирован, а затем и полностью подавлен, если будут нейтрализованы свободные радикалы введением в систему антиоксиданта АнтН. В простейшем случае схему действия монокомпонентного антиоксиданта можно представить следующим образом: антиоксидант (АнтН) в среде окисления реагирует с перекисными радикалами (LOO<sup>•</sup>) по реакции (13):



Образующийся из молекулы антиоксиданта новый свободный радикал  $\text{Ant}^\bullet$ , помимо образования неактивных продуктов в реакциях обрыва цепи, может участвовать в реакциях продолжения цепи (14):



Обычно предполагается, что радикал  $\text{Ant}^\bullet$  малоактивен. Следовательно, при действии антиоксиданта  $\text{AntH}$  происходит замена активного радикала перекиси липида  $\text{LOO}^\bullet$  на радикал антиоксиданта  $\text{Ant}^\bullet$ , реакции которого с  $\text{LH}$  характеризуются низкими значениями константы скорости, что приводит к торможению процесса перекисного окисления.

Важным фактором, стимулирующим процессы перекисного окисления липидов и белков, является провоцируемый восстановленным ионом железа  $\text{Fe}^{++}$  (действует в присутствии и при содействии аскорбиновой кислоты) распад перекиси водорода с образованием весьма активного гидроксил-радикала  $\text{OH}^\bullet$  (реакция Фентона). Поэтому удаление восстановленного иона железа из сферы реакции и рассматривается как важный механизм антиоксидантного действия веществ, некоторые из которых даже не являются ловушками свободных радикалов. С этим эффектом связаны механизмы антиоксидантного действия ряда белков и полипептидов, способных к образованию хелатных моно- и многоцентровых комплексов с  $\text{Fe}^{++}$ . Это дает принципиальное основание ожидать проявления указанного эффекта и в случае ТФ как полипептидов.

Важная роль в механизмах антиоксидантной защиты принадлежит тиоловым соединениям. Химической особенностью этих веществ, обуславливающей их биологические свойства, является наличие в составе молекул одной или нескольких сульфгидрильных (тиоловых,  $-\text{SH}$ ) функциональных групп, которые обладают высокой реакционной способностью и способны вступать в разнообразные химические превращения. Все это связано с уникальным строением атома серы, большой радиус которого, невысокая электроотрицательность и наличие незаполненных d-орбиталей в третьем электронном слое способствуют уменьшению энергии

серусодержащих связей, увеличивают поляризуемость связей и неподеленных пар электронов внешнего слоя. Эти обстоятельства наделяют атом серы в ее соединениях ярко выраженной склонностью к взаимодействию с мягкими легко поляризуемыми реагентами, а также к образованию дисульфидных связей (-S-S-) [23]. Минимальная степень окисления серы в биологических субстратах (-2) способствует высокой восстановительной активности этих веществ, особенно содержащих тиольную (-SH) группу [23].

Благодаря указанным свойствам тиоловые соединения даже в мягких физиологических условиях легко вступают в разнообразные химические реакции: окисления, меркаптидообразования, алкилирования, ацилирования, взаимодействия со свободными радикалами, перекисями и другими окисляющими веществами, с тяжелыми металлами и их соединениями, с ненасыщенными и галоидсодержащими углеводородами, с органическими кислотами, спиртами, альдегидами, кетонами и другими соединениями.

Тиолы, присутствующие в клетках и тканях человека и животных, характеризуются разнообразием строения и свойств. Среди этих веществ различают тиолы небелковой природы (низкомолекулярные) и высокомолекулярные соединения – белки. К числу первых из них относятся цистеин, глутатион, эрготионеин, дигидролипоевая кислота, кофермент А и некоторые другие. Белковые тиолы можно разделить на водорастворимые и нерастворимые в воде, т. е. на соединения, сульфгидрильные группы которых входят в состав растворимых белков или в состав нерастворимых структурных белков клеточных мембран. Особое место среди тиолов занимают тиоловые ферменты, активность которых подавляется при избирательном блокировании их сульфгидрильных групп; последние либо входят в состав активных центров ферментов и непосредственно участвуют в механизме каталитического акта, либо необходимы для поддержания каталитической активной конформации молекулы фермента.

С тиолами небелковой и белковой природы связаны механизмы регуляции проницаемости клеточных мембран, функционирования нервной и

эндокринной систем, мышечного сокращения, свертывания крови, клеточного деления и роста, антиоксидантной защиты и ряда других физиологических процессов.

Среди разнообразных химических превращений тиоловых соединений наиболее важную роль играют окислительно-восстановительные реакции, в ходе которых тиоловые группы легко окисляются с образованием, как правило, дисульфидных группировок (15), и вновь регенерируются при их восстановительном расщеплении:



Возникающая на основе этих превращений обратимая тиол-дисульфидная система (ТДС) имеет очень большое значение в регуляции окислительно-восстановительного равновесия в клетках и тканях организма. Известно, что изменения количественного соотношения тиоловых и дисульфидных групп (тиол-дисульфидный коэффициент, ТДК) приводят к радикальной перестройке режимов жизнедеятельности клеток: изменению ритмов деления, интенсивности метаболизма и т. д. [23]. Поэтому химические и физические факторы, способные модифицировать эту систему, оказывают тем самым прямое воздействие на зависящие от ее состояния биохимические и физиологические процессы, как в норме, так и при патологии: клеточное деление и рост, регуляция проницаемости биомембран, мышечное сокращение, свертываемость крови, функционирование гормональных и нейрорецепторов, фагоцитоз и иммунные механизмы, регуляция ферментативной активности [23]. Кроме того, ТДС участвует в механизмах неспецифической резистентности и адаптации организма человека и животных к экстремальным воздействиям внешней среды (токсиканты, поля, физическая нагрузка и т. д.), активно реагируя на них [23].

Изменения ТДС при этих воздействиях носят неспецифический характер, на что указывают реакция ее на разнообразные по природе факторы и участие тиоловых соединений в механизмах антиоксидантной защиты от «окислительного стресса» [23]. Так, в состав неферментативного звена

антиоксидантной системы входят низкомолекулярные тиолы (глутатион и другие) и тиолсодержащие белки. Следует отметить, что глутатион участвует в восстановительной регенерации двух других высокоактивных низкомолекулярных антиоксидантов: токоферолов и аскорбиновой кислоты, что обеспечивает в определенных условиях поддержание буферной емкости антиоксидантной системы на относительно стабильном уровне. С другой стороны, ферменты, принимающие участие в антиоксидантной защите, либо относятся к числу собственно тиоловых ферментов, либо нуждаются в присутствии тиолов для проявления каталитической активности (СОД, каталаза, Г-6-ФДГ и др.) Уникальные химические свойства тиолов наделяют их высокой антиоксидантной способностью. Они вносят значительный вклад в общую буферную емкость антиоксидантной системы, которая тем выше, чем больше смещено влево (в сторону восстановленных эквивалентов) окислительно-восстановительное равновесие в ТДС ( $SH \leftrightarrow SS$ ). Отсюда возникает возможность определять состояние антиоксидантной системы (и, следовательно, интенсивность свободнорадикального окисления) по величине ТДК. Определение для белковой фракции этого коэффициента может служить показателем перекисного окисления белков, что вместе с данными по перекисному окислению липидов является важным показателем состояния антиоксидантной системы органов и тканей организма.

В клинических исследованиях ТФ-базового, проведенных в СПбГМА им. И. И. Мечникова при совместной работе кафедры биохимии, биохимического отдела ЦНИЛа и кафедры травматологии, на больных различными формами остеомиелита было показано, что ТФ, являясь иммуномодулятором, одновременно оказывал влияние на биохимические механизмы неспецифической резистентности, включая систему свободнорадикального окисления, повышал устойчивость клеточных мембран, активность антиоксидантной защиты [25]. Это позволило сформулировать представление о том, что ТФ является не только иммуномодулятором, но и обладает более широким спектром биологической активности, включая влияние на

антиоксидантную систему организма, функции мембранного аппарата клетки и его адаптивные возможности. Впервые установленные и ранее не известные свойства ТФ требовали дополнительной проверки в эксперименте, который, как известно, позволяет в более стандартных условиях провести исследования указанных свойств. Такой подход является необходимым, поскольку клинические данные получены при массе неконтролируемых параметров, включая болевой стресс, характер питания, прием многочисленных лекарственных препаратов, курение, возможный прием алкоголя и т. д.

Целью данной работы и стало изучение антиоксидантных и адаптивных свойств ТФ (на примере ТФ Эдвенсд) в эксперименте.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Все исследования ТФ проводились на крысах-самцах линии Wistar, весом 200-250 г. В качестве препарата сравнения использовался стандартный адаптоген элеутерококк.

Биохимические исследования ТФ проводились на эритроцитах и плазме крови животных. Эритроциты являются общепринятой, достаточно простой и удобной клеточной системой, в которой имеются все основные компоненты антиоксидантной системы клетки. Кроме того, мембрана эритроцитов является адекватной моделью клеточной мембраны вообще.

С учетом поставленной выше цели работа проводилась по трем направлениям:

- исследование актопротекторного действия ТФ Эдвенсд как показателя адаптогенного действия *in vivo*;
- исследование характера влияния ТФ Эдвенсд на антиоксидантную систему в эксперименте *in vivo*;
- исследование характера влияния ТФ Эдвенсд на антиоксидантную систему в эксперименте *in vitro*.

В эксперименте *in vivo* по изучению адаптогенного и антиоксидантного действия ТФ животные были разделены на четыре группы по 10 животных:

1-ая группа: интактные животные.

2-ая группа: контрольные животные, которым вводился физиологический раствор.

3-ая группа: опытные животные, которым вводился ТФ.

4-ая группа: опытные животные, которым вводился элеутерококк.

**Исследование адаптогенного действия ТФ**, в качестве меры которого была измерена физическая выносливость, проводилось с использованием плавательного теста.

Плавательный тест проводился с животными 2, 3, 4 групп в два этапа в загрязненной воде (для лучшего смачивания шерсти животных) с температурой 37°, с грузом, составляющим 10 % от массы тела.

На первом этапе до начала введения веществ, во избежание стрессового воздействия, в течение двух дней проводилось тренировочное плавание по 5 минут: первый день без груза, второй день – с грузом. На третий день проводилось «исходное» плавание животных с грузом до полного утомления с регистрацией времени длительности плавания (рис. 1 и рис. 2). Критерием физического утомления считается отказ животного от «физической работы» - «утопление» (т. е. нахождение животного под водой более 30 секунд). Критерием физической выносливости животных является время длительности плавания.

Рис. 1



Рис. 2



Вещества начинали вводить через три дня после «исходного» плавания. ТФ вводился в дозе 0,07 мг/г, исходя из доз, рекомендованных для человека (1 капсула 3 раза в день). Суточная доза ТФ растворялась в 0,5 мл дистиллированной воды. Элеутерококк вводился, исходя из рекомендованных доз для человека 1мл на 2 кг веса в сутки. Суточная доза элеутерококка разводилась в 0,5 мл дистиллированной воды. Контрольная группа получала физиологический раствор в том же объеме (0,5 мл). Препараты вводились один раз в день в течение 10 дней.

На 10-й день проводилось заключительное плавание (второй этап) животных. Через 15 минут после проведения плавательного теста у животных проводился забор крови для выполнения биохимических исследований, используя метод забоя животных путем декапитации после эфирного наркоза.

#### **Определяемые биохимические показатели в эксперименте *in vivo*:**

- активность параметров перекисного окисления липидов по содержанию ТБК-реагирующих продуктов,
- активность супероксиддисмутазы,
- активность каталазы,
- активность глутатион-S-трансферазы,
- активность глутатионпероксидазы,
- содержание и соотношение SH/SS групп (общих, белковых, небелковых),
- резистентность эритроцитарных биомембран.

**Исследования *in vitro*** проводились на эритроцитах и плазме крови белых крыс в трех группах:

- 1) интактные эритроциты и плазма (контрольная группа),
- 2) модель  $H_2O_2$ -зависимого перекисного окисления,
- 3) модель  $H_2O_2$ -зависимого перекисного окисления + преинкубация с ТФ, который использовался в дозе 0,14 мг/мл в конечном объеме.

Определяемые биохимические показатели:

- активность параметров перекисного окисления липидов по содержанию ТБК-реагирующих продуктов,

- активность супероксиддисмутазы,
- активность каталазы,
- активность глутатион-S-трансферазы,
- активность глутатионпероксидазы,
- содержание и соотношение SH/SS групп (общих, белковых, небелковых),
- резистентность эритроцитарных биомембран.

### **Методы определения активности ферментов**

Активность ферментов исследовалась в гемолизате эритроцитов. Для определения активности СОД, каталазы и GST готовился гемолизат эритроцитов в 0,1% растворе ЭДТА в соотношении 1:10.

Активность фермента *GST* определяли спектрофотометрически на «Specord M-40» по методу Habig W. G. (1974) с использованием 2,4-динитрохлорбензола (конечная концентрация - 1 мМ) в качестве субстрата, конечная концентрация глутатиона – 1 мМ [26]. Показатели экстинкции определяли через 1 минуту в течение 3 минут при длине волны 340 нм. Активность фермента выражали в ЕД/мг белка.

Активность *каталазы* оценивали по убыли перекиси водорода в инкубационной среде. Использовали трис-НСl буфер 0,05 М рН 7,4, конечная концентрация перекиси водорода составляла 10 мМ [27]. Показатели экстинкции определяли через 1 минуту в течение 3 минут при длине волны 230 нм. Активность фермента выражали в единицах ммоль  $H_2O_2$ /мин•мг белка.

Определение общей *супероксиддисмутазной* (СОД) активности гемолизата эритроцитов проводилось по реакции окисления кверцетина. Принцип метода определения активности СОД: в результате окисления кверцетина при рН 10,0 в присутствии N,N,N1,N1-тетраметилэтилендиамина в аэробных условиях происходит генерация супероксиданион-радикала, который в присутствии СОД подвергается дисмутации, что проявляется в торможении окисления кверцетина [27]. Активность СОД рассчитывалась в условных единицах/мг белка.

Активность ГПО определялась по реакции окисления глутатиона в присутствии гидроперокси кумола. Образовавшийся окисленный глутатион (ГССГ) восстанавливается под действием глутатионредуктазы с использованием НАДФН. Снижение НАДФН регистрировали спектрофотометрически в течение 2-3 минут при  $\lambda = 340$  нм. В работе использовали изменение оптической плотности за минуту. Предварительно проводили регистрацию ферментативной реакции без внесения гемолизата в кювету [27]. Активность фермента выражали в ЕД/л гемолизата.

Активность Г-6-ФДГ определялась по степени увеличения абсорбции при 340 нм в результате превращения НАДФ<sup>+</sup> по следующей реакции:



Оптическая плотность измерялась через одну минуту в течение трех минут [27]. Активность фермента выражали в нмоль/сек·мг белка.

Количество белка в гемолизате определяли по методу Лоури [28].

Результаты эксперимента *in vivo* представлены в табл. 1.

### **Метод количественного определения тиоловых и дисульфидных групп**

В гемолизате крови крыс определялись общие, белковые и небелковые SH и SS группы методом амперометрического титрования. На основании этих данных рассчитывался ТДК для оценки состояния ТДС.

Определение SH групп проводилось путем титрования раствора тиолового соединения азотнокислым серебром, при этом ионы серебра связываются с SH группами с образованием устойчивого меркаптида (17):



По достижении конечной точки титрования в растворе появляется избыток ионов серебра. При этом в электрическом элементе, состоящем из погруженных в титруемый раствор вращающегося платинового индикаторного электрода и электрода сравнения, возникает электрический ток, пропорциональный концентрации ионов серебра и измеряемый

микроамперметром. Содержание SH групп в исследуемом растворе эквивалентно количеству нитрата серебра, затраченному на титрование.

Метод количественного определения дисульфидных групп основан на восстановительном расщеплении дисульфидных связей сульфитом натрия в присутствии избытка ионов серебра, которые блокируют SH-группы в момент их образования. Оставшиеся свободными ионы металла оттитровываются раствором унитиола. Для определения небелковых SH и SS-групп белки осаждаются 5% метафосфорной кислотой, смешивая ее в равных количествах с гемолизатом крови, после чего смесь центрифугируют в течение 15 минут при 6000 об/мин. На титрование берут 2-5 мл надосадочной жидкости [23]. Содержание тиоловых и дисульфидных групп выражали в ммоль/л.

Результаты представлены в табл. 2.

#### **Метод оценки интенсивности перекисного окисления липидов**

Определение активности параметров перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводилось в сыворотке крови с использованием теста с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Интенсивность процессов ПОЛ оценивалась по реакции, ведущей к образованию малонового диальдегида (МДА) из продукта-предшественника. Сыворотка бралась в количестве 0,5 мл. Концентрация ТБК-активных продуктов измерялась спектрофотометрически при двух длинах волн 535 и 580 нм [29]. Концентрация выражалась в нмоль МДА на 1 мл сыворотки.

Результаты представлены в табл. 2.

#### **Метод определения резистентности эритроцитарных мембран**

Для оценки эффектов антиоксидантного действия ТФ проводилось исследование кислотной резистентности эритроцитарных мембран [30]. Метод кислотных эритрограмм основан на фотометрической регистрации кинетики гемолиза. В качестве гемолитика использовался 0,004 Н раствор HCl. Начальные пробы фотометрировались на микроколориметре МКМФ при  $\lambda=540$  нм против физиологического раствора. Кинетика гемолиза регистрировалась на спектрофотометре PV 1251С при  $\lambda=514$  нм при стандартных условиях:

температура (37° C), количество крови, взятой на исследование (1,5 мл), концентрация гемолитика (1,5 мл). Показания снимались через каждые 30 сек до окончания реакции. Полученные данные обрабатывались при помощи компьютерной программы «Кислотная резистентность», где рассчитываются: предгемолиз, пониженностойкие, среднестойкие, повышенностойкие, высокостойкие эритроциты в процентах от общего количества эритроцитов и конец гемолиза в минутах.

Результаты представлены в табл. 3.

Результаты исследования подвергались статистической обработке с использованием программы Statistica v.6.0 с вычислением: среднего арифметического, ошибки среднего арифметического, границ доверительного интервала значений, доверительного коэффициента для сравнения значений в группах с помощью программы STATISTICA-60

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Исследование адаптогенных свойств ТФ Эдвенсд**

Исследование адаптогенных свойств ТФ, показателем которых служит повышение физической выносливости, было проведено с использованием плавательного теста. Исходное время плавания в среднем составило 17 минут. При стандартном десятидневном введении ТФ в дозе 0,07 мг/г веса не было получено однозначного изменения длительности плавания крыс. Только у 25 % животных время длительности плавания увеличилось по сравнению с исходным на 37 %. У остальной части животных увеличения длительности плавания не наблюдалось. У животных, получавших элеутерококк в течение того же периода, время длительности плавания увеличилось в среднем на 45 %.

Исходя из этих данных, продолжительность приема ТФ была увеличена до пятнадцати дней. После пятнадцатидневного приема ТФ время длительности плавания увеличилось в среднем на 87 %.

Эти результаты свидетельствуют о наличии у ТФ адаптогенных свойств, не уступающих по активности элеутерококку при соответствующих концентрациях и длительности приема.

### Результаты исследования влияния ТФ в опытах *in vivo*.

В таблице 1 и на рисунках 3-7 приведены данные по активности ферментов антиоксидантной системы, в таблице 2 и на рисунках 8-11 – данные по содержанию SH и SS групп в эритроцитах и интенсивности ПОЛ в плазме крови

Таблица 1

*Показатели активности ферментов антиоксидантной системы эритроцитов крови при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов в эксперименте *in vivo**

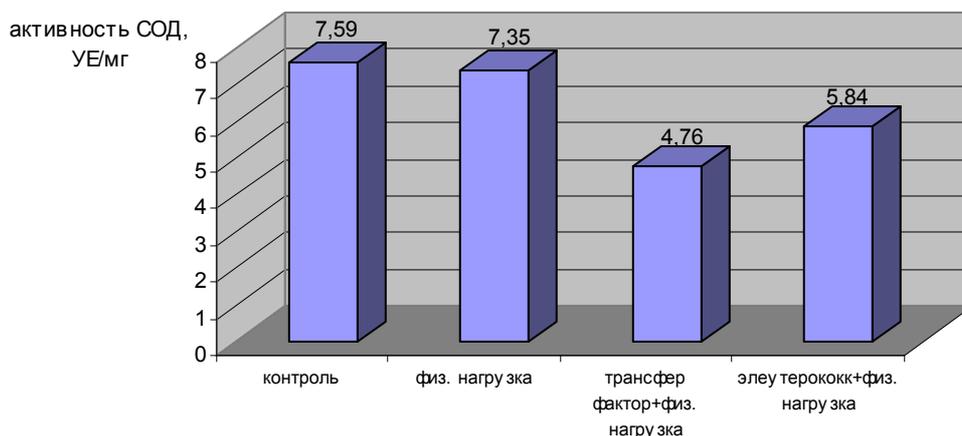
	ГСТ, ЕД/мг	СОД, УЕ/мг	Каталаза, ммоль Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /мин•мг	ГПО, ЕД/л	Г-6-ФДГ, нмоль/сек•мг
Контроль	4,38±0,32	7,59±1,03	42,16±2,78	1712,9±125,82	18,7±2,23
Физ.нагрузка без препаратов	5,25±0,37*	7,35±1,07**	52,92±2,38*	1550,9±94,6	20,3±3,43
ТФ	4,78±0,28	4,76±0,54*	50,13±3,52	1500,10±60,38*	14,56±1,48*
Элеутерококк	3,48±0,32*	5,84±0,60	41,92±5,4**	1484,1±101,67*	16,3±2,48

Примечание: животные второй, третьей и четвертой групп подвергались плавательному тесту.

\* достоверные различия ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю

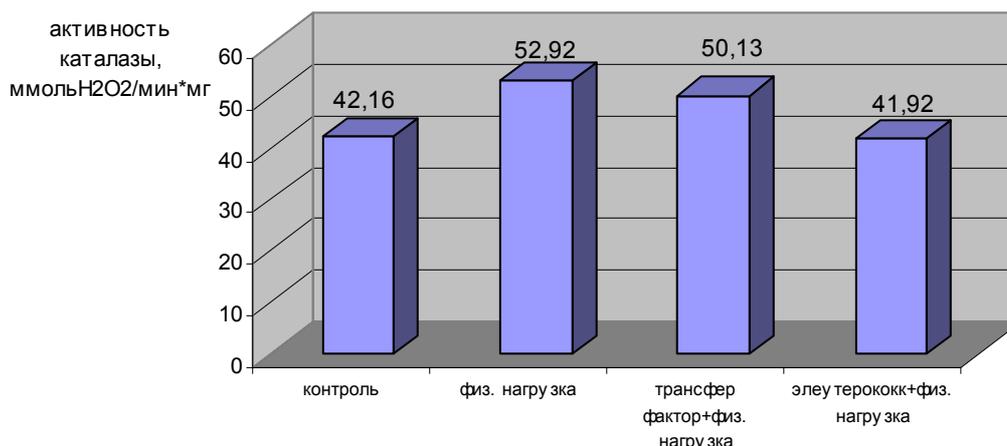
\*\* достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами

Анализ изменения активности СОД показал, что при действии ТФ на фоне физической нагрузки происходит достоверное снижение активности СОД по сравнению с контрольной группой (рис. 3). В группе животных, получавших элеутерококк и в группе, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов, достоверных различий по сравнению с контрольной группой не выявлено. Однако можно отметить тенденцию к снижению активности СОД по сравнению с контрольной группой в группе, получавшей элеутерококк: активность СОД снизилась на 16 % (табл. 1).



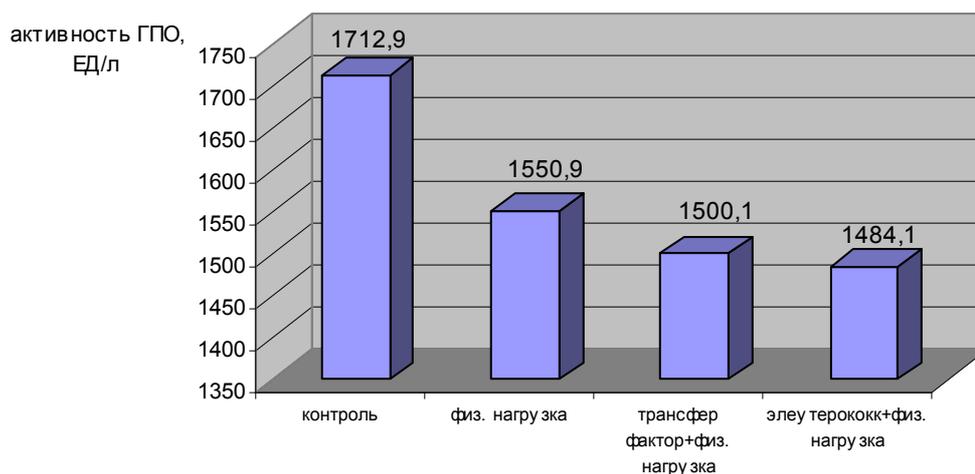
*Рис. 3 Активность СОД при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов*

Анализ изменений активности каталазы показал достоверное увеличение активности каталазы в группе животных, подвергавшихся физической нагрузке без приема препаратов (рис. 4). Также наблюдается тенденция к увеличению активности каталазы в группе, получавшей ТФ. В этой группе активность каталазы увеличилась на 19 % по сравнению с контрольной группой (табл. 1).



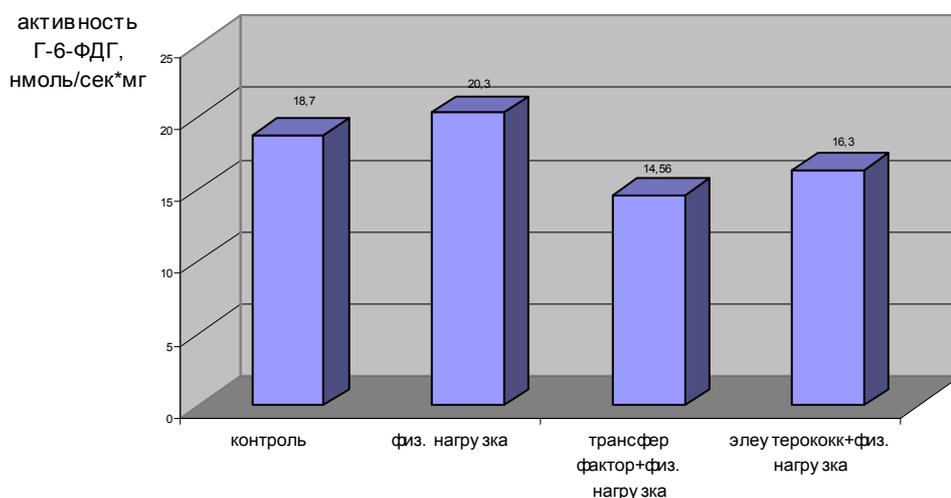
*Рис. 4 Активность каталазы при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов*

При анализе активности ГПО наблюдается тенденция к снижению активности ГПО в группе, получавшей ТФ (на 12 %), элеутерококк (на 13 %), и подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов (на 9 %) (табл. 1, рис. 5).



*Рис. 5 Активность ГПО при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов*

При анализе активности Г-6-ФДГ выявлена тенденция к увеличению активности Г-6-ФДГ в группе, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов (на 9 %), и к снижению активности Г-6-ФДГ в группах, получавших ТФ (на 22 %) и элеутерококк (на 12 %) (табл. 1, рис. 6).



*Рис. 6 Активность Г-6-ФДГ при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов*

Анализ изменения активности GST показал, что активность GST в группе, получавшей ТФ, достоверно выше, чем в группе, получавшей элеутерококк. В группе, получавшей элеутерококк, активность GST достоверно ниже, чем в группе, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов (табл. 1, рис. 7).

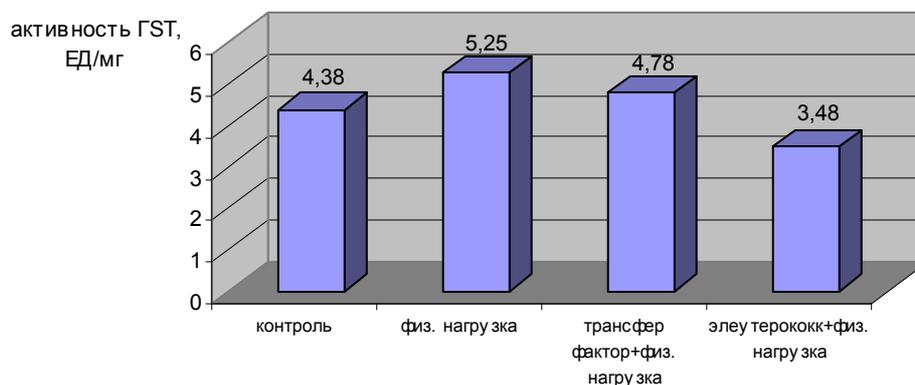


Рис. 7 Активность GST при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов

Таблица 2  
Показатели ТДС в эритроцитах и интенсивности ПОЛ в плазме крови при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов в эксперименте *in vivo*

	ПОЛ, нмоль МДА/мл	общие,			белковые			небелковые		
		SH, ммоль/л	SS, ммоль/л	ТДК	SH, ммоль/л	SS, ммоль/л	ТДК	SH, ммоль/л	SS, ммоль/л	ТДК
Конт- роль	2,31±0,2 0	24,9±1,36	7,10±0,3	3,47±0,1 1	22,64±1,3 1	6,45±0,2 7	3,51±0,1 4	2,26±0,1 1	0,65±0,0 3	3,49±0,1 2
Физ. нагруз- ка без препар атов	2,34±0,1 7	27,8±1,29 *	6,7±0,26	4,14±0,1 1	25,44±1,1 7	6,13±0,2 4	4,15±0,1 1 **	2,36±0,1 6	0,57±0,0 2	4,11±0,1 5*
ТФ	1,93±0,1 6*	29,2±1,76 *	4,9±0,3*	5,96±0,1 4*	26,88±1,7 0*	4,45±0,2 9*	6,05±0,1 6*	2,32±0,1 9	0,45±0,0 3*	5,15±0,1 2*
Элеуте - рококк	2,53±0,2 5	29,2±2,3*	7,75±0,5 8	3,75±0,0 6 **	27,1±2,22 *	7,15±0,5 7 **	3,78±0,0 7 **	2,1±0,16	0,58±0,0 4	3,63±0,1 2

\* достоверные различия ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю

\*\* достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами

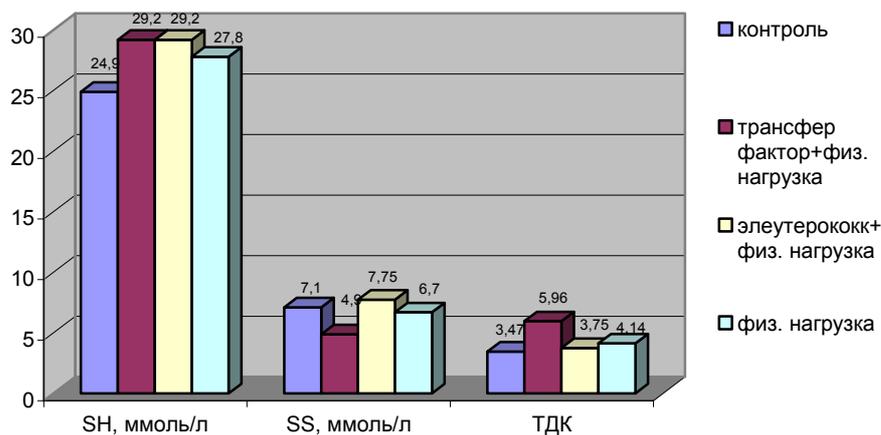


Рис. 8 Содержание общих SH, SS групп и ТДК при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов

Как следует из приведенных в табл. 2 и рис. 8 данных, в группе, получавшей ТФ, содержание общих SH групп выше, чем в контрольной группе на 17 %. В этой же группе содержание общих SS групп достоверно ниже, а величина ТДК выше по сравнению с остальными исследуемыми группами. В группе, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов, величина ТДК достоверно выше по сравнению с контрольной группой на 19 %. В группе, получавшей элеутерококк, ТДК также достоверно выше по сравнению с контрольной группой, но ниже по сравнению с группой, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов (табл. 2, рис. 8).

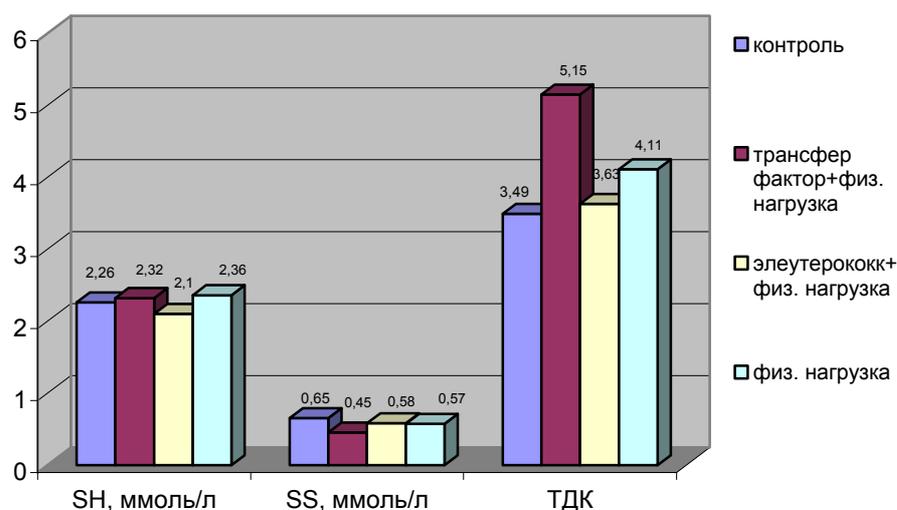


Рис. 9 Содержание небелковых SH, SS групп и ТДК при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов

При анализе небелковой фракции ТДС эритроцитов выявлено, что в группе, получавшей ТФ, содержание небелковых SS групп достоверно ниже по сравнению с остальными исследуемыми группами (табл. 2, рис. 9). В то время как в содержании небелковых SH групп достоверных различий в исследуемых группах не выявлено (табл. 2). При этом в группе, получавшей ТФ, величина ТДК достоверно выше по сравнению с остальными исследуемыми группами. Величина ТДК также достоверно выше по сравнению с контрольной группой в группах, получавшей элеутерококк (на 8 %) и подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов (на 19 %).

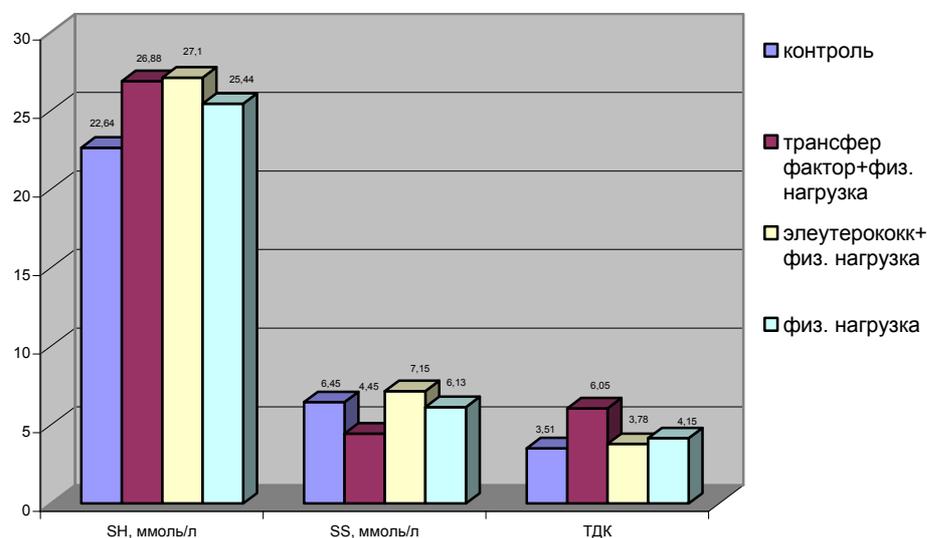


Рис. 10 Содержание белковых SH, SS групп и ТДК при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов

Как видно из табл. 2 и рис. 10, в группе, получавшей ТФ, содержание белковых SS групп достоверно ниже по сравнению с остальными исследуемыми группами. В содержании белковых SH групп достоверных различий в исследуемых группах не выявлено. Как следствие, в группе, получавшей ТФ, величина ТДК достоверно выше по сравнению с остальными исследуемыми группами. В группе, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов, величина ТДК достоверно выше по сравнению с контрольной группой (на 18 %). В группе, получавшей элеутерококк, ТДК достоверно ниже по сравнению с группой, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов (рис. 10).

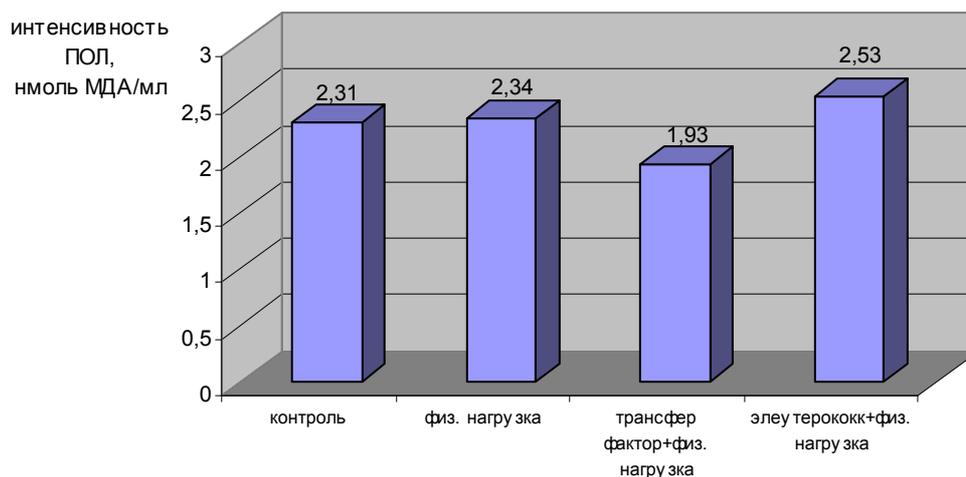


Рис. 11 Интенсивность ПОЛ в плазме крови при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов

Анализ интенсивности ПОЛ плазмы крови выявил тенденцию к снижению ПОЛ в группе, получавшей ТФ (на 16 %), и повышению в группе, получавшей элеутерококк (на 10 %) (табл. 2, рис. 11).

Поскольку специфической особенностью свободных радикалов является способность инициировать цепные реакции окисления липидов, то наиболее чувствительными к их действию являются биологические мембраны, содержащие большое количество ненасыщенных жирных кислот. Поэтому как результат изменения интенсивности ПОЛ может наблюдаться изменение резистентности биомембран. В табл. 3 и на рис. 12 и 13 представлены данные по состоянию резистентности мембран эритроцитов.

Таблица 3

Состояние резистентности эритроцитарных мембран при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов в опытах *in vivo*

	Предгемолиз, %	Пониженостойкие, %	Среднестойкие, %	Повышенностойкие, %	Высокостойкие, %	Конец гемолиза, в мин
Контроль	28,7±1,84	40,8±0,95	21,4±0,98	9,1±1,75	0	5,95±0,31
Физ. нагрузка без препаратов	30,8±1,19	40,4±1,03	21,3±0,51	7,5±1,78	0	5,90±0,23
ТФ	29,5±1,47	40,8±0,93	21,8±0,78	7,9±1,6	0	5,90±0,26
Элеутерококк	28,7±2,29	40,2±1,18	20,6±1,34	10,1±2,06	0,4	6,2±0,38

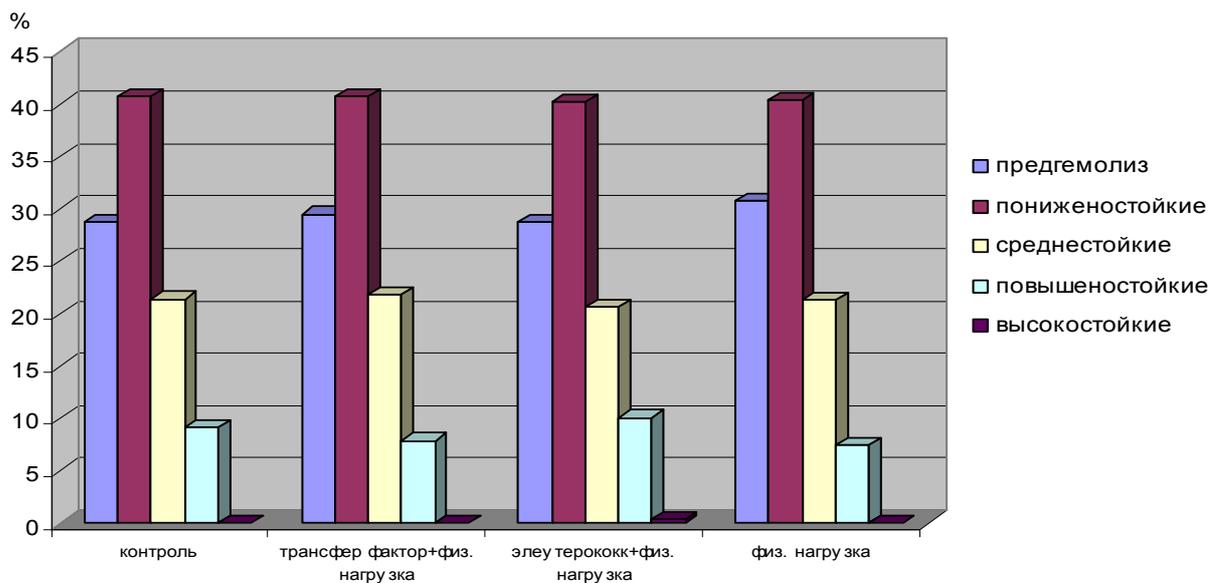


Рис. 12 Состояние резистентности мембран эритроцитов при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов

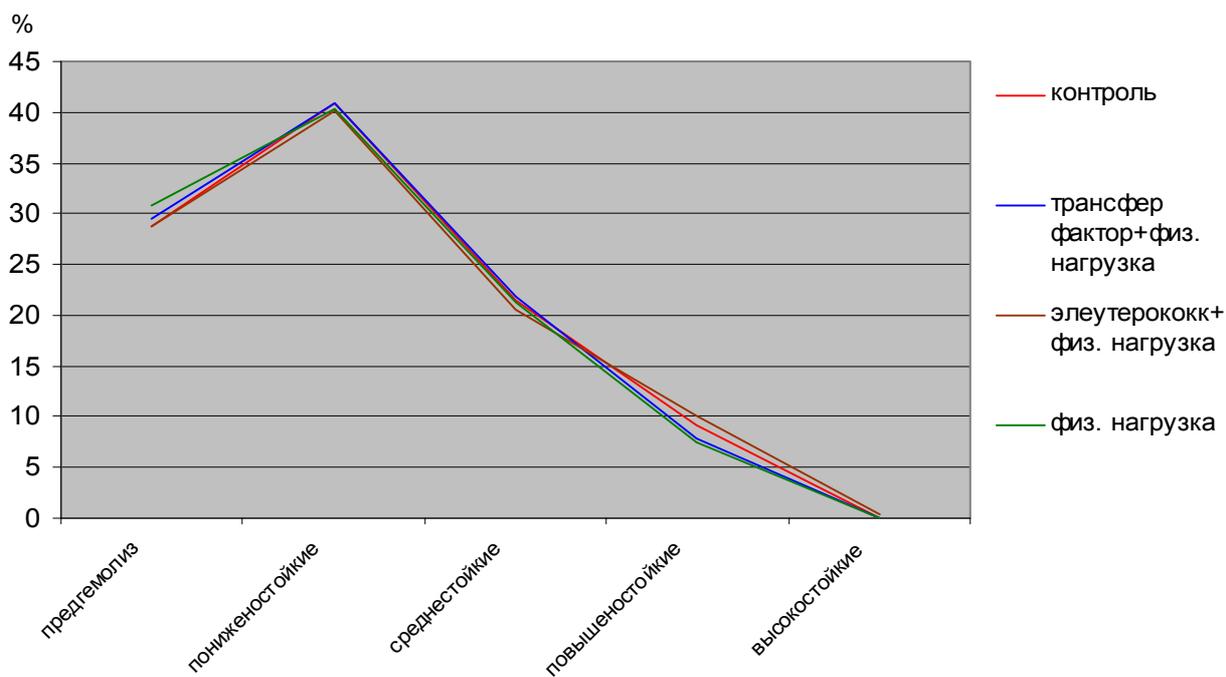


Рис. 13 Состояние резистентности мембран эритроцитов при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузки без препаратов

Как видно из табл. 3, рис. 12 и рис. 13 значимых изменений резистентности эритроцитарных мембран при действии ТФ, элеутерококка и физической нагрузке без приема препаратов не выявлено.

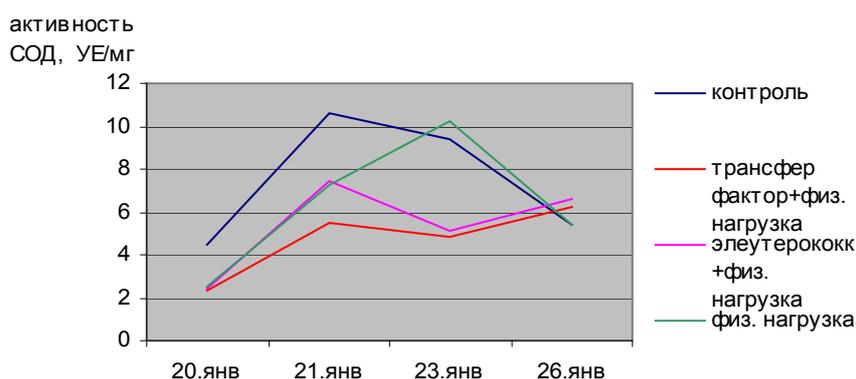
Заслуживает определенного внимания интересное наблюдение. При анализе динамики изменений активности СОД в период эксперимента выявлена значительная флуктуация активности 21.01.09 и 23.01.09 с последующим возвращением показателя к уровню 20.01.09 (табл. 4, рис 14-18).

Таблица 4

*Активность СОД (среднее значение 2-3 животных) гемолизата крови крыс в январе 2009г.*

Дата	20.01	21.01	23.01	26.01	27.01	28.01	29.01	
Контроль	4,48±0,03	10,63±3,5	9,37±0,51	5,43±0,66	6,64±0,66	5,32±0,52	4,0±0,9	Ср.6,55±0,97
Физ.нагрузка без препаратов	5,8±0,5	7,73±0,9	10,22±1,03	5,37±0,63	-	-	-	
ТФ	2,36±0,05	5,45±0,52	4,86±1,3	6,25±0,1	-	-	-	
Элеутерококк	2,93±0,38	7,46±1,07	5,11±0,66	6,63±0,84	-	-	-	

Возможность ответа биологических, в том числе биохимических систем, на гелиофизические факторы подтверждена многими публикациями [23,31,32]. В этих работах было показано в том числе, что активность СОД претерпевает более чем 2-кратные изменения в течение года в разные сезоны. Анализируя действие ТФ в ходе ответа на гелиофизическую флуктуацию, можно говорить о его модулирующем, корригирующем действии, направленном на удержание активности СОД в пределах более близких к контрольному уровню.



*Рис. 14 Динамика изменений активности СОД в период эксперимента (20.01 – 26.01)*

Такая же тенденция наблюдается и с другими ферментами антиоксидантной системы эритроцитов. Обращает на себя внимание сходство корригирующего действия элеутерококка и ТФ на активность СОД (рис. 14),

Г-6-ФДГ (рис. 15) и ГПО (рис. 16), в то время как элеутерококк не проявлял корректирующего действия на активность GST (рис. 17) и каталазы (рис. 18).

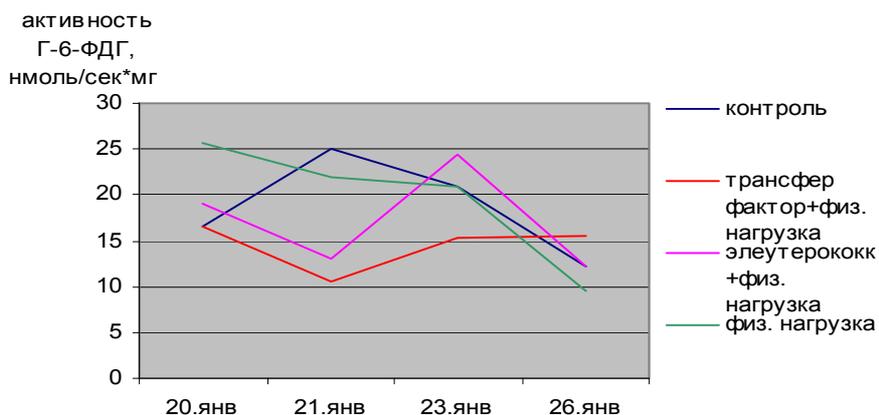


Рис. 15 Динамика изменений активности Г-6-ФДГ в период эксперимента (20.01 – 26.01)

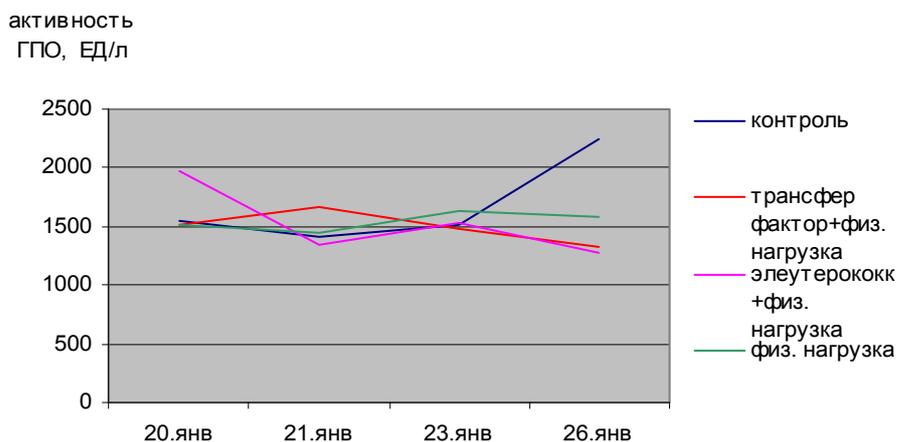


Рис. 16 Динамика изменений активности ГПО в период эксперимента (20.01 – 26.01)

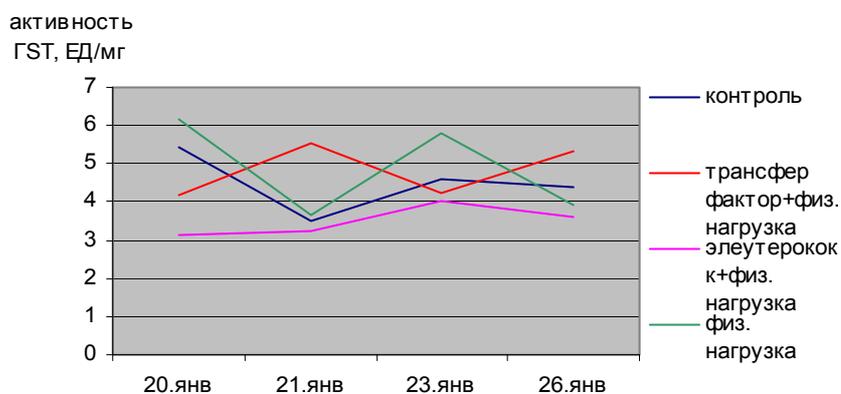


Рис. 17 Динамика изменений активности GST в период эксперимента (20.01 – 26.01)

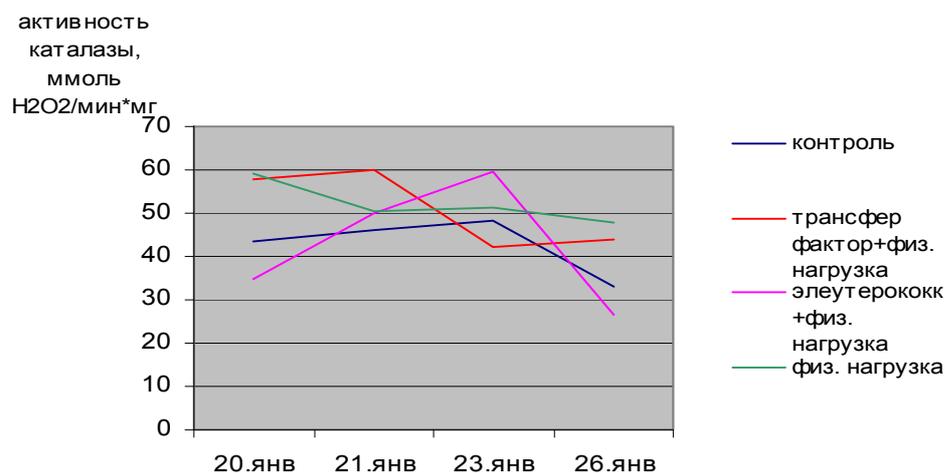


Рис. 18 Динамика изменений активности каталазы в период эксперимента (20.01 – 26.01)

Кроме того, наблюдаемый нами в период эксперимента более высокий разброс данных, возможно, также связан с действием гелиофизических факторов.

### ***Исследование действия ТФ в условиях окислительного стресса в опытах in vitro***

Для изучения характера непосредственного влияния ТФ на компоненты антиоксидантной системы были проведены опыты in vitro. При этом определялись:

1) исходные уровни показателей: активность ферментов антиоксидантной системы эритроцитов (СОД, ГПО, каталаза, GST, Г-6-ФДГ), содержание белковых и небелковых SH и SS групп в эритроцитах, резистентность мембран эритроцитов, интенсивность ПОЛ плазмы крови.

2) влияние различных концентраций ТФ на показатели ферментативного звена антиоксидантной системы, тиол-дисульфидного обмена и на резистентность мембран эритроцитов, а также на интенсивность ПОЛ плазмы крови. Инкубация гемолизата и плазмы с ТФ проводилась в течение 15 минут при температуре 37°C. ТФ исследовался в конечных концентрациях 0,07 мг/мл, 0,14 мг/мл и 0,28 мг/мл.

3) влияние ТФ в условиях окислительного стресса, который создавался преинкубацией гемолизата и плазмы крови с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в конечной концентрации 5

мМ в течение 15 минут при температуре 37°C с последующим добавлением в пробу ТФ в концентрации 0,14 мг/мл в конечном объеме и инкубации в течение 15 минут при температуре 37°C.

В табл. 5 приведены данные по влиянию ТФ в условиях окислительного стресса на активность ферментов антиоксидантной системы эритроцитов (СОД, ГПО, каталаза, GST, Г-6-ФДГ), содержание белковых и небелковых SH и SS групп в эритроцитах, интенсивность ПОЛ плазмы крови.

В табл. 6 и на рис. 19 представлены данные по влиянию ТФ на состояние резистентности мембран.

В табл. 7 приведены данные по влиянию различных концентраций ТФ на активность ферментов антиоксидантной системы эритроцитов (СОД, ГПО, каталаза, GST, Г-6-ФДГ) и интенсивность ПОЛ плазмы крови.

Таблица 5

*Действие ТФ в условиях окислительного стресса в опытах in vitro*

	Исходный уровень	Трансфер Фактор (0,14 мг/мл в конечном объеме)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 мМ	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + трансфер фактор
СОД, УЕ/мг	4,57±0,65	4,39±0,58	3,1±0,35*	3,1±0,35*
Каталаза, ммоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин•мг	51,1±2,55	32,9±2,05	---	27±2,35
ГПО, ЕД/л	3069±65,6	2516±85,5	---	2231±96,5
Г-6-ФДГ, нмоль/сек•мг	20,3±1,55	18,6±2,25	0,25±0,15*	15,1±1,55*
GST, ЕД/мг	5,2±0,23	3,76±0,37	2,36±0,28	1,42±0,32
Белковые SH/SS группы, ммоль/л	SH 23±1,5 SS 4,5±0,27	SH 23±1,2** SS 3,1±0,29**	SH 16±1,17* SS 5,3±0,45**	SH 11±1,2* SS 4,9±0,24
Небелковые SH/SS группы, ммоль/л	1,5±0,11/0,5±0,03	1,9±0,13/0,4±0,03	1,3±0,1/0,3±0,04	1,8±0,12/0,55±0,04
ПОЛ*, нмоль МДА/мл	1,65±0,25	2,48±0,16*	3,85±0,28*	2,44±0,17*

\* определение интенсивности ПОЛ проводилось в плазме крови.

\* достоверные различия ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю

\*\* достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами

Преинкубация с ТФ в течение 15 минут приводила к незначительному снижению активности СОД (на 4 %), снижению активности каталазы на 36 %, активности ГПО на 18 %, Г-6-ФДГ на 8 % и GST на 28 % (табл. 5).

Преинкубация с  $H_2O_2$  в течение 15 минут также приводила к снижению активности всех исследуемых ферментов. Активность СОД снизилась на 32 %, GST – на 57 %, активность Г-6-ФДГ была полностью подавлена (табл. 5).

Анализ действия ТФ в условиях окислительного стресса, т. е. после преинкубации с  $H_2O_2$  показал, что ТФ не устранял действия окислителя, и активности исследуемых ферментов также снижались по сравнению с исходными значениями, но более выражено, чем после преинкубации с ТФ: активность СОД снизилась на 32 %, каталазы – на 47 %, ГПО – на 27 %, Г-6-ФДГ – на 26 %, GST – на 73 % (табл. 5).

При исследовании состояния тиол-дисульфидного обмена при действии ТФ было выявлено снижение белковых SS-групп на 31 % и отсутствие изменений в содержании SH-групп. При введении ТФ на фоне окислительного стресса содержание белковых SS групп практически не изменяется по сравнению с исходным уровнем, но происходит снижение SH групп на 52 %. Содержание небелковых SS групп при действии ТФ снижается на 20 % по сравнению с исходным уровнем, при этом содержание небелковых SH групп увеличивается на 26 %. При введении ТФ на фоне окислительного стресса содержание небелковых SS групп увеличивается на 10 %, содержание небелковых SH - на 20 % (табл. 5).

Перекись водорода без добавления ТФ в модели окислительного стресса приводит к повышению уровня ПОЛ по сравнению с исходным уровнем на 133 % (табл. 5). Введение ТФ на фоне окислительного стресса повышает уровень ПОЛ лишь на 48 % по сравнению с исходным уровнем. Это соответствует снижению уровня ПОЛ в условиях окислительного стресса под действием ТФ практически на 60 %.

Таким образом, на основании данных по интенсивности ПОЛ в плазме крови, а также по содержанию белковых и небелковых SH групп в эритроцитах

можно прийти к заключению, что ТФ оказывает антиоксидантный эффект *in vitro* только в условиях окислительного стресса.

Как видно из табл. 6 и рис. 19, при действии ТФ наблюдается снижение резистентности мембран эритроцитов.

Таблица 6  
Состояние резистентности эритроцитарных мембран при действии ТФ в опытах *in vitro*

	Показатели					
	Предге-молиз, %	Понижено-стойкие, %	Средне-стойкие, %	Повышено-стойкие, %	Высоко-стойкие, %	Конец гемолиза, в мин
Исходный уровень	28,0±1,85	30,8±0,95	15,9±0,78	18,9±1,6	6,3±0,15	8,5±0,25
Трансфер Фактор	32,7±1,55*	34,3±1,15*	14,0±0,51	16,6±2,0	2,5±0,25	7,5±0,23

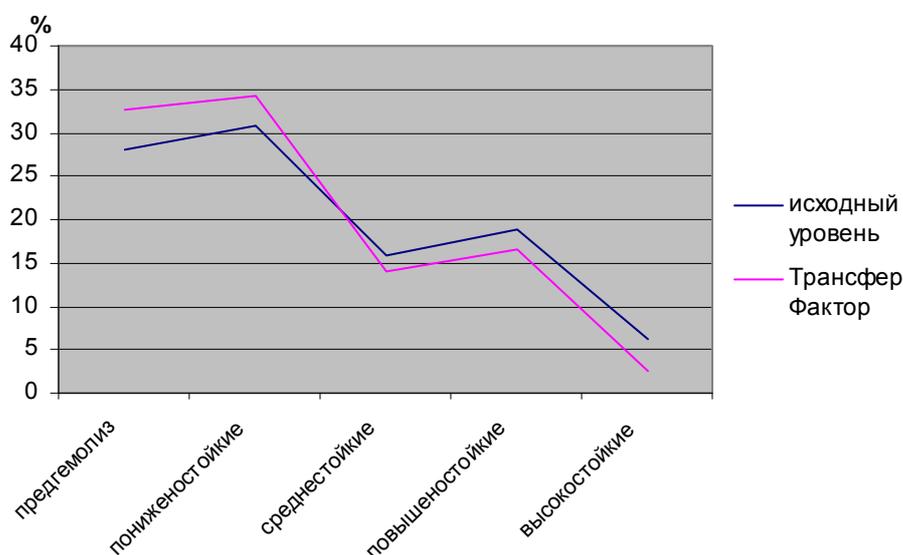


Рис. 19 Исследование действия Трансфер Фактора на резистентность эритроцитарных мембран в опытах *in vitro*

Таблица 7  
Результаты исследования концентрационной зависимости действия ТФ в опытах *in vitro*

	Исходный уровень	Трансфер фактор (0,07 мг/мл)	Трансфер Фактор (0,14 мг/мл)	Трансфер Фактор (0,28 мг/мл)
СОД, УЕ/мг	4,89±0,65	4,6±0,56	4,3±0,55	4,11±0,62
Каталаза, ммоль Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /мин•мг	51,1±2,55	38,1±2,35*	32,9±2,05*	----
ГПО, ЕД/л	3069±65,6	----	2516±85,5*	----
Г-6-ФДГ, нмоль/сек•мг	20,3±1,56	----	18,6±2,25	----

GST, ЕД/мг	5,2±0,23	3,12±0,3*	3,76±0,37*	2,33±0,25*
ПОЛ*, нмоль МДА/мл	1,65±0,25	3,44±0,25*	2,48±0,16	5,62±0,35*

определение интенсивности ПОЛ проводилось в плазме крови.

\* достоверные различия ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю

При исследовании влияния различных концентраций ТФ на активность ферментов антиоксидантной системы и интенсивность ПОЛ в опытах *in vitro* не выявлено дозозависимого эффекта.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Исследование *in vivo*

Анализ активности СОД животных разных групп показал, что её активность в группе, получавшей ТФ значительно ниже, чем в контрольной группе. Тенденция к снижению активности СОД наблюдается и в группе, получавшей элеутерококк. Активность СОД в этих группах также ниже и по сравнению с животными, подвергавшимися физической нагрузке, но не получавших препараты.

Снижение активности СОД для организма не является очень опасным, т.к. токсичность  $O_2^{\bullet}$  невелика, и в химическом отношении он является скорее восстановителем, чем окислителем [8]. Образующаяся в результате реакции дисмутации перекись водорода - более сильный окислитель, к тому же, дающая начало чрезвычайно активному  $OH^{\bullet}$  радикалу. В связи с этим решающее значение для клеток имеет баланс активности СОД с активностью каталазы и ГПО, удаляющих перекись водорода.

Как показал анализ, активность каталазы достоверно увеличилась в группе с просто физической нагрузкой и отмечается тенденция к повышению ее активности в группе, принимавшей ТФ. В группе, получавшей элеутерококк,

активность каталазы по сравнению с контрольной группой не изменялась. Таким образом, в группе, получавшей ТФ, складывается более благоприятная ситуация для нейтрализации активных форм кислорода, направленная на предупреждение образования более сильных окислителей, таких как  $\text{OH}^\bullet$  радикал.

Одновременно с этим наблюдалась тенденция к снижению активности ГПО во всех экспериментальных группах в равной степени по сравнению с контрольной. Известно, что активность ГПО лимитируется доступностью восстановленного глутатиона, количество которого зависит от содержания НАДФН и, следовательно, от работы пентозофосфатного цикла. Ключевым ферментом этого цикла является Г-6-ФДГ. Как видно из табл. 1 и рис. 6, наблюдается тенденция к снижению активности Г-6-ФДГ в группах, получавших элеутерококк и ТФ, в сравнении с контрольной группой. Кроме того, анализ содержания небелковых тиолов, основная доля которых приходится на глутатион, не выявил достоверных отличий в их содержании в исследуемых группах. Однако в группе, получавшей ТФ, имеется достоверное снижение дисульфидных форм и увеличение ТДК (рис. 9). На основании этих данных можно предположить, что снижение активности ГПО не может быть лимитировано концентрацией глутатиона. Известно, что сродство ГПО к перекиси водорода выше, чем у каталазы. Поэтому ГПО преимущественно работает при низких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Если концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  высокая, то работает каталаза [33, 34, 35]. Таким образом, изменения активности каталазы и ГПО могут быть связаны с изменением концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В группе, получавшей элеутерококк, на фоне не изменяющейся по сравнению с контрольной группой активностью каталазы происходит снижение активности ГПО. Кроме того, в этой группе показатели содержания небелковых SH, SS и ТДК по сравнению с контрольной группой не изменялись. Исходя из этого, можно предположить, что в этой группе складываются менее выгодные для клетки условия, при которых возможно накопление  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Кроме того, следует отметить, что в группе животных, получавших ТФ, происходит снижение содержания белковых SS-групп по сравнению с остальными исследуемыми группами. Как следствие наблюдается повышение ТДК в белковой фракции.

В группе, принимавшей элеутерококк, практически нет изменений в содержании белковых SH и SS-группы. При этом ТДК в этой группе достоверно ниже по сравнению с группой, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов, и находится на уровне ТДК контрольной группы.

Снижение активности СОД на фоне повышения активности каталазы, а также увеличение ТДК за счет снижения белковых и небелковых SS групп при действии ТФ создает наиболее благоприятную ситуацию, увеличивая восстановительный потенциал клетки.

Достоверных изменений интенсивности ПОЛ в исследуемых группах не наблюдалось. Однако можно отметить тенденцию к снижению этого показателя в группе, получавшей ТФ, в то время как в группе, получавшей элеутерококк, имеется тенденция к увеличению интенсивности ПОЛ. Эти данные также говорят в пользу того, что при действии ТФ в клетке происходит снижение окислительных процессов.

Таким образом, в группе животных, получавших ТФ, при невысокой активности СОД и ГПО достигается такой уровень каталазы, который достаточен для нейтрализации  $H_2O_2$ . Как следствие происходит снижение интенсивности ПОЛ и снижение содержания SS-групп, что приводит к повышению ТДК. В группе животных получавших элеутерококк таких изменений не наблюдалось.

Более того, при действии ТФ имеет место повышение восстановительного потенциала в клетке в большей степени, чем при действии элеутерококка.

Эти данные совпадают с ранее полученными нами клиническими данными [25]. Как было отмечено выше, в исследовании на больных остеомиелитом было показано нормализующее действие ТФ на

функциональную активность ферментативного звена антиоксидантной системы (СОД, ГПО, каталазы и GST), а также на соотношение восстановленных SH и окисленных SS-групп в низкомолекулярной фракции крови и повышение содержания восстановленных белковых SH-групп [25].

Анализ изменений активности GST не показал достоверных отличий в исследуемых группах по сравнению с контрольной. Однако активность GST в группе, получавшей ТФ, выше по сравнению с группой, получавшей элеутерококк. При чем в этой группе активность GST ниже, чем в группе, подвергавшейся физической нагрузке без приема препаратов. Более низкий уровень активности GST при действии элеутерококка может приводить к снижению процессов ковалентного связывания электрофильных субстратов в эритроцитах, тогда как под действием ТФ этого не происходит.

### **Исследование in vitro**

В опытах in vitro показано, что ТФ снижает активность ферментов антиоксидантной системы эритроцитов. При действии ТФ на фоне оксидативного стресса, т. е. введения в инкубационную смесь перекиси водорода, активности СОД, каталазы, ГПО и GST также снижаются, но при этом не происходит полного ингибирования активности Г-6-ФДГ.

По результатам опытов in vitro (также как in vivo) ТФ не снижает содержания белковых SH-групп, и даже способствует повышению небелковых. В то же время на фоне действия перекиси водорода в моделях окислительного стресса, когда имеет место существенное снижение и белковых и небелковых SH-групп даже выше исходного уровня (табл. 5). Это соответствует антиоксидантному эффекту ТФ на уровне низкомолекулярного антиоксидантного звена в условиях оксидативного стресса.

Из возможных механизмов антиоксидантного действия ТФ следует отметить следующие:

1. хелатирующий эффект ТФ как полипептидной субстанции по отношению к  $Fe^{++}$ , что особенно четко проявляется в условиях нагрузки перекисью

водорода, склонной, как известно, к генерации токсичного  $\text{OH}^\bullet$ -радикала в присутствии ионов  $\text{Fe}^{++}$  (реакция Фентона).

2. в результате вероятного нековалентного взаимодействия ТФ с белками может иметь место изменение конформации белков, изменение характера экспонирования SH-групп и высвобождение низкомолекулярных тиолов.

Следует, однако, отметить, что понимание детального механизма антиоксидантного действия ТФ требует дополнительных исследований.

## **ВЫВОДЫ**

1. Проведенное исследование влияния ТФ на физическую выносливость крыс показало наличие у ТФ актопротекторного действия, которое проявлялось при приёме ТФ в течение не менее 15 дней.

2. В опытах *in vivo* показано влияние ТФ на активность ферментов антиоксидантной системы, а также на тиол-дисульфидную систему, приводящее к повышению восстановленных эквивалентов в клетке и, как следствие, снижению интенсивности ПОЛ.

3. По результатам опытов *in vivo* можно предположить наличие корректирующих эффектов ТФ, выражающиеся в нормализации активности СОД, каталазы, GST, ГПО и Г-6-ФДГ при изменении их активности (повышении или понижении).

4. В опытах *in vitro* показано влияние ТФ на активность ферментов антиоксидантной системы, проявляющееся в снижении их активности, вероятно, за счет ТФ-белковых взаимодействий между ферментами и ТФ, приводящее к конформационным перестройкам в молекулах ферментов.

5. В опытах *in vitro* на основании данных по соотношению SH/SS групп в белковой и низкомолекулярной фракциях и уровню ПОЛ в плазме крови, показано, что ТФ оказывает антиоксидантный эффект только при повышенной перекисной нагрузке, т. е. в условиях оксидативного стресса.

6. Учитывая актопротекторный эффект ТФ, выражающийся в повышении физической выносливости животных, нормализующем влиянии ТФ на активность ферментов антиоксидантной системы и тиол-дисульфидную систему, а также выраженное антиоксидантное действие ТФ *in vivo* и *in vitro* в условиях оксидативного стресса, можно заключить, что ТФ может быть квалифицирован как адаптогенный и антиоксидантный продукт.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lawrence H.S. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man//Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1949, 71, p. 516.
2. У. Дж. Хеннен. Трансфер Фактор-Плюс: Идеальная комбинация биологически активных веществ для оптимального иммунитета. Под редакцией Ю.П. Гичева и Э. Огановой. – Новосибирск. – 2001. - 73 с.
3. Методические рекомендации министерства Здравоохранения и Социального развития РФ «Иммунореабилитация инфекционно-воспалительных и соматических заболеваний с использованием Трансфер Фактора». – Москва. - 2004.
4. Халтурина Е. Трансфер Фактор – новое поколение иммуномодуляторов и адаптогенов//12 Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». – 2005.
5. Шабров А.В., Дадали В.А., Макаров В.Г. «Биохимические основы действия микрокомпонентов пищи». Под редакцией проф. Дадали В.А. - М.: Авваллон. – 2003. - с. 184.

6. Погорелый В.Е., Слюнькова Н.Е., Макарова Л.М., Слюнькова Т.Е. Адаптогены: прошлое, настоящее, будущее//7-й международный съезд Фитофарм 2003 «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения» (материалы съезда). - СПб, Пушкин. - 2003. - с. 250-257.
7. Эликсиры//Под редакцией Макарова В.Г. - СПб.: Межрегиональный центр «Адаптоген». - 1999. - с. 218.
8. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. - М.: «Слово», 2006. - с. 576.
9. Munday R., Winterboume C.C. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defense mechanism//Biochem. Pharmacol. - 1989. - Vol. 38. - p. 4349-4352.
10. Liochev S.I., Fridovich I. Copper. Zinc superoxide dismutase as a univalent NO-oxidoreductase and as a dichlorofluorescein peroxidase//J. Biol. Chem. - 2001. - Vol. 276. - p. 35253-35257.
11. Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Человек и противокислительные вещества. - Л.: Наука, 1985.
12. Шинкаренко Н.В., Алексовский В.Б. Химические свойства синглетного молекулярного кислорода и значение его в биологических системах.//Успехи химии. -1982. - Т. 51, № 5. - с. 713-735.
13. Kirkman H.N., Rolfo M., Ferraris A.M., Gaetani G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry//J. Biol. Chem. - 1999. - Vol. 274. - p. 13908-13914.
14. Ларский Э.Г. Методы определения и метаболизм металлобелковых комплексов.//Итоги науки и техники. Сер. Биологическая химия. - 1990. - Т. 41.
15. Hansen J.C., Pedersen H.S., Mulvad G. Fatty acids and antioxidants in the inuit diet. Their role in ischemic heart disease (IHD) and possible interactions with other dietary factors. A review//Arctic Med. Res. - 1984. - Vol. 53. - p. 4-17.

16. Link E.M. Enzymic pathways involved in cell response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>//Free Radic. Res. Commun. - 1990. - Vol. 11. - p. 89-97.
17. Lands W.M. Biochemistry of arachidonic acid metabolism. Boston: Nijhoff. - 1985.
18. Meneghini R., Benfato M.S., Bertoncini C.R. et al. Iron homeostasis and oxidative DNA damage//Cancer J. - 1995. - Vol. 8. - p. 109-113.
19. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases//Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 2005. - Vol. 45. - p. 51-88.
20. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы//Успехи соврем. биологии. – 1989. - Т. 107, вып. 2. - с. 179-194.
21. Бондарь Т.Н., Ланкин В.З., Антоновский В.Л. Восстановление органических гидроперекисей глутатионпероксидазой и глутатион-S-трансферазой: влияние структуры субстрата. Докл. АН СССР. - 1989. - Т. 304, № 1. - с. 217-220.
22. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона//Успехи соврем. биологии. - 1990. - Т. 110, вып. 1. - с. 20-33.
23. Соколовский В.В. Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма. - СПб., 1996. - с. 30.
24. Справочник: медицинские лабораторные технологии//Под редакцией Карпищенко А.И. – СПб.: «Интермедика». - 1999. – Т. 2. – с. 24-27.
25. Дадали В.А., Рак А.В., Столпник Е.С., Кельвин В. МакКослан, Оганова Э.А. Применение Трансфер Фактора в лечение больных остеомиелитом//Вестник Санкт-Петербургской государственной академии им. И. И. Мечникова. – 2002. - № 3-4.
26. Harbig W.H., Pabst J., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation.//J. Biol. Chem.- 1974. - Vol. 249, № 22. - p. 7130-7139.
27. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н., под ред Хавинсона В.Х. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. - СПб., 2000.

28. Lowry O. et al. Protein measurement with folin phenol reagent.//J. Biol. Chem. – 1951. - V. 193. - p. 265-275.
29. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой//Лабораторное дело. – 1989. - № 7- с.8-9.
30. Леонова В.Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. Новосибирск: «Наука», 1987. - с. 240.
31. Бойко Е.Р., Щадрина В.Д., Козловская А.В. Сезонные аспекты функционирования ферментативных антиоксидантных систем рожениц европейского севера.//Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2006. - М., 1992, №5, с. 633-642.
32. Соколовский В. В. Тиолдисульфидная система в реакции организма на факторы окружающей среды. – СПб., 2008. - с. 76.
33. Masaki H., Okano Y., Sakurai H. Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ultraviolet B light//Arch Dermatol. Res. - 1998. - Vol. 290. - p. 113-118.
34. Eaton J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary.//J. Lab. Clin. Med. - 1991. - Vol. 118. - p. 3-4.
35. Scott M.D., Lubin B.H., Zuo L., Kuypers F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: Preeminent importance of catalase//J. Lab. Clin. Med. - 1991. - Vol. 118. - p. 7-16.