

**ВЛИЯНИЕ ДОКСИЦИКЛИНА НА ПРОЦЕСС
ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЫ ИНСУЛИНА**
**THE EFFECT OF DOXYCYCLINE
ON THE PROCESS OF FIBRILLATION OF THE INSULIN MOLECULE**

Е. В. Чайка, Н. В. Богданова

E. V. Chayka, N. V. Bogdanova

*Учреждение образования «Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь
lizzachayka@yandex.by*

*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus*

В статье представлены общие сведения о процессе фибриллообразования белковых молекул на примере инсулина, о том, как влияют амилоидные отложения в патогенезе сахарного диабета 2 типа и актуальность рассмотрения данной проблемы. А также была изучена способность доксициклина при низких концентрациях препятствовать процессу фибрилlogenеза.

The article presents general information about the process of fibrillation of protein molecules on the example of insulin, how amyloid deposits affect the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and the relevance of considering this problem. And the ability of doxycycline at low concentrations to interfere with the process of fibrillogenesis was also studied.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, амилоид, фибриллы инсулина, агрегация, доксициклин.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, amyloid, insulin fibrils, aggregation, doxycycline.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-243-246>

Цель исследования: Изучить процесс фибриллообразования белковых молекул. Оценить способность доксициклина ингибировать процесс фибриллообразования. Выявить влияние различных концентраций доксициклина на процесс фибриллообразования молекулы инсулина.

Материалы и методы исследования: Методологическую основу исследования составляют общенаучные методы, к которым относятся теоретический анализ научной литературы. Для оценки влияния различных концентраций доксициклина на процесс фибриллообразования молекулы инсулина использовался аналитический метод, с помощью спектрофлуориметрического анализа.

Объектом исследования является субстанция инсулина. Субстанция инсулина – это инсулин без примесей связывающих и противомикробных веществ.

Фибриллы из инсулина были получены путем его инкубирования в присутствии буфера Tris (трис) pH 7.4, при температуре 37°C, при его интенсивном перемешивании в течение 25 часов. В качестве ингибитора фибриллообразования молекулы инсулина были исследованы растворы с разными концентрациями доксициклина: 50 мг/мл, 40 мг/мл, 30 мг/мл, 20 мг/мл, 10 мг/мл, 5 мг/мл; вносимый объем доксициклина составил 100 мкл.

Инсулин взят в количестве 2 мг на 1 мл буфера. Для выявления процесса образования амилоидных фибрилл из инсулина был также использован ThT Бензотиазолиновый зонд.

Спектры поглощения ThT измеряли с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5301 PC. Регистрацию максимума интенсивности флуоресценции красителя производили при длине волны равной 486 нм (возбуждение при 440 нм). Для измерения брали 10 мкл пробы, 1 мл буфера, 1 мл дистиллированной воды и 10 мкл зонда.

Результаты исследования и их обсуждение: Сахарный диабет – глобальная проблема всего мира. По данным ВОЗ, на сегодняшний день диабетом страдает около 422 млн человек, что составляет 6,028% от всего населения планеты. Статистика заболеваемости диабетом ежегодно растёт. Если ситуация будет развиваться теми же темпами, то к 2025 году количество пациентов с диабетом увеличится в 2 раза. К 2030 году сахарный диабет станет 7-й причиной смерти во всём мире. Актуальна данная проблема и для нашей страны. За 20 лет в Беларуси в 3 раза выросло количество больных с сахарным диабетом. По состоянию на 1 января 2019 г. на учёте находилось 336 тысяч человек, из них (по данным Министерства здравоохранения РБ): 18 тыс. пациенты с СД 1 типа, 315 тыс. пациенты с СД 2 типа; кроме того, зафиксировано 434 случая гестационного диабета и 2648 случаев других специфических типов диабета. Наиболее распространённым является сахарный диабет 2 типа. Это заболевание представляет собой реальную угрозу за счет ранней инвалидизации и высокой смертности от сосудистых катастроф [2].

Инсулин является терапевтически значимой молекулой, используемой при лечении больных сахарным диабетом. К сожалению, он подвергается целому ряду неблагоприятных и часто непредсказуемых физических превращений из-за изменений в его биохимической среде. Инсулин ($C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$) представляет собой глобулярный белок и имеет спиральную структуру, состоящую из полипептидных цепей, представляющие первичную структуру, А-цепь (21 аминокислота) и В-цепь (30 аминокислот). Эти цепи удерживаются вместе двумя межцепочечными дисульфидными связями, образованными между остатками цистеина А7–В7 и А20–В19. Молекулярная масса молекулы инсулина составляет 5808 Да. А-цепь имеет внутримолекулярную дисульфидную связь (А6–А11) и две антипараллельные α -спирали (А1–А8 и А12–А20), тогда как В-цепь содержит одну такую α -спираль (В9–В19) с двумя витками по бокам и гибким выводом (В21–В30) [2].

Помимо главной функции инсулина – расщепление глюкозы и доставка к жизненно важным органам, инсулин имеет положительные свойства на организм – это перенос аминокислот в мышечные клетки, тем самым стимулируется синтез белка, что способствует наращиванию мышечной ткани. Кроме того, гормон активизирует синтез гликогена, увеличивает активность энзимов, что помогает обеспечивать запас глюкозы в мышечных клетках, тем самым улучшая их производительность и восстановление [2].

Исходя из вышесказанного, гормон инсулин является жизненно важным. Его полное отсутствие ведет к остановке работы всего организма. Он является важным звеном в доставке питания всем клеткам и особенно мозгу [2].

Возникающая в результате молекулярная реконфигурация, включая разворачивание, неправильное сворачивание и гидрофобные взаимодействия, часто приводит к агрегации, фибриллогенезу амилоида и выпадению в осадок. Также амилоиды считают главной причиной развития таких патологий, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабет второго типа. После данного открытия начался активный поиск лекарств, разрушающих амилоиды и предотвращающих их образование. Но не создано еще ни одного действующего лекарства для человека от амилоидозов [2].

Одной из причин патогенеза СД2 являются амилоидные отложения. Изолированный амилоидоз островков поджелудочной железы – одна из наиболее распространенных и хорошо изученных форм эндокринного амилоидоза (APUD-амилоидоза). Он выявляется в инсулинпродуцирующих опухолях и более чем у 90% больных только с инсулинезависимым диабетом, причем чаще у лиц пожилого возраста

Несмотря на интенсивные исследования фибриллогенеза инсулина, не существует общепринятой схемы формирования зрелых фибрилл. Основные трудности возникают при интерпретации начала фибрилляционного процесса [2].

Существует модель образования фибрилл инсулина, согласно которой росту амилоидов предшествует диссоциация димеров/гексамеров инсулина до мономеров, образующих в дальнейшем промежуточную структуру, соответствующую ядру нуклеации фибриллы. Также было показано, что первой стадией фибриллогенеза инсулина является переход от нативной к частично развернутой, промежуточной конформации мономера.

Процесс фибрилляции включает **три фазы**: лаг-фазу, фазу роста и фазу созревания, и происходит посредством процесса полимеризации, зависящего от образования зародышей, который обычно описывается сигмовидной кривой. Зарождение включает ассоциацию частично развернутых мономеров белка с олигомерными формами, которые являются “ядрами” в лаг-фазе. Как правило, образование ядер является длительной стадией. После этого продолжается рост фибрилл, что является термодинамически благоприятным процессом в “экспоненциальной фазе”. На этой фазе взаимодействия укладки, гидрофобные взаимодействия и водородные связи играют важную роль в организации олигомеров и мономеров. В “фазе насыщения” формируются зрелые фибриллы, которые представляют собой стабильные, высокоорганизованные зрелые структуры. Присоединение и диссоциация мономеров к фибриллам все еще продолжается, но эти процессы протекают в устойчивом состоянии [3].

Благодаря экспериментальным данным с помощью, которых устанавливалось влияние доксициклина на амилоидные фибриллы, удалось выяснить, доксициклин плотно связывает открытые гидрофобные аминокислоты амилоидных фибрилл А β 42, частично приводя к дестабилизации фибриллярной структуры, это и дало толчок для новых исследований [1].

Выяснение молекулярных детерминант связывания доксициклина с А β 42 может помочь в разработке дальнейших стратегий разработки лекарств против амилоидных отложений [1].

Доксициклин обладает преимуществами, перед другими недавно предложенными антиамилоидогенными препаратами благодаря их хорошо охарактеризованным фармакологическим и фармакокинетическим свойствам и относительно низкой токсичности. Несмотря на четкие доказательства, полученные в экспериментах *in vitro*, что доксициклин может ингибировать агрегацию А β 42 и разбирать зрелые амилоидные фибриллы молекулярный механизм, ответственный за антиамилоидогенные эффекты, остается неуловимым [1,3].

Агрегация белка происходит в результате увеличения времени инкубации до 22 ч. К 25 ч идет выход интенсивности флуоресценции на плато, это указывает на насыщение сайта связывания теофлавина и формирования зрелых амилоидных фибрилл.

В качестве контрольной пробы использовался инсулин без доксициклина, проинкубированный в Tris буфере pH 7.4, при температуре 37°C, что соответствует физиологическим условиям.

В ходе эксперимента с временным промежутком 18 часов было выявлено максимальное значение флуоресценции ThT в инсулине с концентрацией доксициклина 30 мг/мл и составило $50,630 \pm 3,32$ отн.ед. А минимум флуоресценции был обнаружен у пробы с концентрацией 40 мг/мл со значением $14,920 \pm 2,88$ отн.ед.

Через 22 часа наблюдается максимум флуоресценции теофлавина в инсулине с дозировкой антибиотика 20 мг/мл и составляет $73,532 \pm 3,15$ отн. ед. А минимальное значения флуоресценции было отмечено при дозировке 50 мг/мл и составляет $15,460 \pm 2,46$ отн.ед.

После инкубации проб через 25 часов максимальный выход флуоресценции теофлавина был обнаружен у пробы с доксициклином, с его концентрацией 5 мг/мл и составил $58,811 \pm 2,99$ отн.ед. А минимальное значение было зафиксировано у пробы с концентрацией 50 мг/мл и составляет $11,994 \pm 2,23$ отн.ед. (таблица 1).

Интенсивность флуоресценции ThT в растворе инсулина, инкубированного без добавления доксициклина, значительно превышает интенсивность флуоресценции, наблюдаемую в пробах после добавления этого антибиотика к инсулину. Следовательно, доксициклин обладает способностью подавлять процесс фибриллообразования в молекуле инсулина. При оценке и сравнении действия различных концентраций доксициклина на фибрилляцию молекул инсулина, наиболее эффективную антиамилоидную активность проявили дозировки 40 мг/мл и 50 мг/мл соответственно (рис.1).

Таблица 1

Показатели интенсивности флуоресценции молекулы инсулина, связанного с теофлавином в различных концентрациях доксициклина за весь период инкубации

Время	Интенсивность флуоресценции отн.ед.						
	Контроль	ДЦ 5	ДЦ 10	ДЦ 20	ДЦ 30	ДЦ 40	ДЦ 50
18ч	$136,878 \pm 3,01$	$46,323 \pm 3,48$	$21,960 \pm 3,03$	$36,313 \pm 2,69$	$50,630 \pm 3,32$	$14,920 \pm 2,88$	$15,053 \pm 2,07$
22ч	$113,444 \pm 1,44$	$51,802 \pm 3,02$	$31,755 \pm 2,85$	$73,632 \pm 3,15$	$43,606 \pm 3,61$	$16,902 \pm 2,4$	$15,460 \pm 2,46$
25ч	$143,268 \pm 3,09$	$58,811 \pm 2,98$	$19,043 \pm 3,12$	$43,059 \pm 3,44$	$30,680 \pm 3,4$	$13,691 \pm 1,13$	$11,994 \pm 2,23$

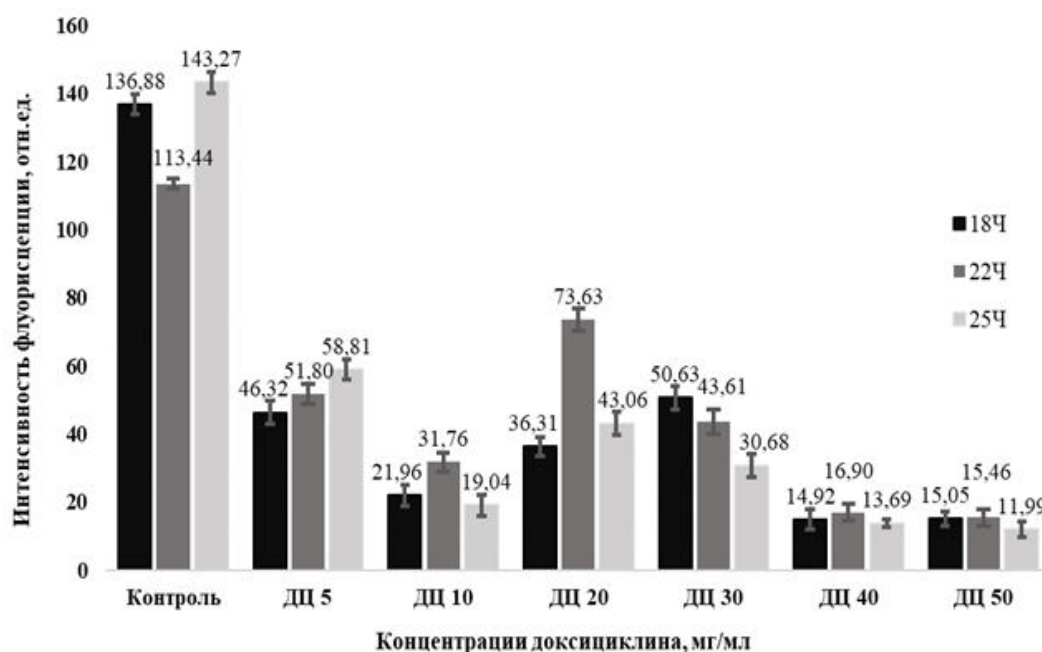


Рисунок 1 – Ингибирование фибриллообразования в зависимости от концентрации доксициклина в разные промежутки времени

Выводы. Таким образом результаты данной работы доказывают наличие антиамилоидной активности у доксициклина. Предполагается, что благотворное действие препаратов доксициклина является результатом своегообразного плеiotропного действия, включающего их взаимодействие с олигомерами и разрушение фибрилл, а также их антиоксидантную, противовоспалительную, антиапоптотическую и ингибирующую матриксную металлопротеиназу активность.

1. Существует множество данных объясняющих способности большинства белков к амилоидообразованию и прояснению основных этапов процесса формирования амилоидных фибрилл. Кроме того, привлечение экспериментальных и теоретических данных необходимо для более обоснованного конструирования модифицированных форм различных белков, что позволит более целенаправленно исследовать процессы амилоидообразования и искать пути предотвращения нежелательной агрегации белков, приводящей к различным патологиям.

2. При оценке ингибирующего воздействия доксициклина на амилоидное фибриллообразование в молекуле инсулина было выяснено, что все пробы, содержащие исследуемый препарат, препятствовали образованию

амилоидных фибрилл инсулина. Это можно заметить при сравнении значений интенсивности флуоресценции ThT у проб инсулина с ДЦ с контрольной пробой инсулина.

3. При анализе влияния различных концентраций доксициклина на процесс фибриллообразования инсулина, результаты полученных данных свидетельствуют о том, что наиболее эффективными и действенными оказались концентрации доксициклина равные 40 мг/мл и 50 мг/мл.

Тем не менее все это говорит о том, что необходимо проведение крупномасштабных рандомизированных плацебо-контролируемых исследований, для определения, насколько целесообразно включение доксициклина в схемы лечения, каковы оптимальные дозы, формы и кратность приема препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1 Alfonso Gautieri, The Anti-Amyloidogenic Action of Doxycycline: A Molecular Dynamics Study on the Interaction with A β 42 / Alfonso Gautieri, Marten Beeg // I. J. Molecular Sciences. – Vol. 20. – 2019. – P. 41-59.

2. Minoos Qafary, Insulin fibrillation: Strategies for inhibition / Minoos Qafary, Fatemeh Rashno., Ali A. Moosavi-Movahedi // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – Vol. 175. – 2022. – P. 49-62.

3. Tatiana Stoilova, A New Face for Old Antibiotics: Tetracyclines in Treatment of Amyloidoses / Tatiana Stoilova, Laura Colombo, Gianluigi Forloni // Journal of Medicinal Chemistry. – Vol. 56. – 2013. – P. 5987–6006.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КУРКУМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF CURCUMIN AND ITS DERIVATIVES

А. А. Проскурякова, Н. В. Богданова

A. A. Proskuryakova, N. V. Bogdanova

*Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
alinka.proskuryakova.03@gmail.com*

International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

В статье представлены общие сведения об антибактериальных свойствах куркумина и его производных в отношении распространенных видов бактерий.

The article provides general information about the antibacterial properties of curcumin and its derivatives in relation to common bacterial species.

Ключевые слова: куркуминоиды, десметоксикуркумин, бисдесметоксикуркумин, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*.

Keywords: curcuminoids, desmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-246-249>

Использование нутрицевтиков, пищевых добавок и функциональных продуктов питания приобрело значительную популярность во всем мире за последние несколько десятилетий из-за возросшего интереса к натуральным продуктам и их потенциальной пользе для здоровья.

Начиная с золотого века открытия антибиотиков в середине 20-го века, натуральные продукты служили основной основой для разработки большинства антибиотиков, используемых в клинической практике по сей день. Натуральные антибиотики действуют путем прямого ингибирования роста или уничтожения бактерий, действуя как потенциаторы, которые усиливают или трансформируют другие агенты, или как иммуномодуляторы для клеток-хозяев или блокируют вирулентность патогена [1].

Куркумин (1,7-бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион) представляет собой фенольное и неполярное соединение из корня растения *Curcuma longa*. Он является кристаллическим соединением яркого оранжево-жёлтого цвета, которое часто используется в качестве пищевого красителя. Растворим куркумин в щелочах и в очень кислых растворителях воде же соединение нерастворимо. При значении кислотности выше pH=8 его цвет меняется с желтого на красно-бурый.

Химический состав куркумы состоит примерно из 70% углеводов, 13% влаги, 6% белка, 6% эфирных масел (фелландрен, сабинен, цинеол, борнеол, зингиберен и сесквитерпены), 5% жиров, 3% минеральных веществ (калий, кальций, фосфор), железо и натрий и следовые количества витаминов (B1, B2, C и ниацин).