

**КИРБАЕВА НАТАЛЬЯ ВИКТОРОВНА**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОЭНЗИМА Q10 НА ПРОТЕОМ  
СЫВОРОТКИ КРОВИ И ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО  
МОЗГА КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ В  
УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА**

**03.01.04 – Биохимия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории метаболомного и протеомного анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», г. Москва.

**НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:**

доктор биологических наук, профессор

**Васильев Андрей Валериевич**

доктор медицинских наук,  
член-корреспондент РАН, профессор

**Перцов Сергей Сергеевич**

**ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:**

доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией  
биомедицинских исследований  
Федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»

**Шишкин Сергей Сергеевич**

доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий лабораторией патологии мозга  
Московского научно-исследовательского  
института психиатрии филиала Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
«Федеральный медицинский исследовательский  
центр психиатрии и наркологии  
имени В. П. Сербского» Минздрава России

**Узбеков Марат Галиевич**

**ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 001.002.01 при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и на сайте Института [www.ion.ru](http://www.ion.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Н.М. Шилина**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Метаболические аспекты влияния микронутриентов на состояние здоровья являются предметом все более нарастающего числа исследований [Badimon L. et al., 2017; Ozdemir V., Kolker E., 2016]. На клеточном уровне отдельные нутриенты могут оказывать воздействие на сигнальные пути [Clarke S.D. et al., 1999], непосредственно выступать как лиганды рецепторов фактора транскрипции [Jacobs M.N., Lewis D.F., 2002], при обменных процессах в качестве межклеточных метаболитов могут изменять концентрацию субстратов и промежуточных продуктов [Karut J., Rodriguez R.L., 2004]. Различные факторы, прямо или косвенно способные влиять на характер питания человека, оказывают воздействие на поддержание целостности организма, и, в частности, могут приводить к нарушениям системной организации физиологических функций и развитию заболеваний различных систем: гормональной, иммунной, репродуктивной и др. Так, стрессовые состояния приводят к изменениям многих показателей, характеризующих функциональный статус организма на различных структурных уровнях [Frenkel-Morgenstern M. et al., 2010]. Адаптивные состояния, вызванные стрессом, хоть и необходимы для выживания, однако способны приводить к дисрегуляции системных функций и, как следствие, болезни [Gold P.W., 2015]. Множественные изменения происходят под действием стресса в нервной системе: на уровне нервной цепочки стресс может привести к структурному ремоделированию или молекулярным реорганизациям, таким как увеличение количества или потеря дендритных шипиков, нейрональной атрофии, изменению экспрессии многих синаптических белков (например, глутаматных рецепторов) [Yuan T.F., Hou G., 2015]. В частности, при пищевой депривации наблюдается расширение функциональных зон коркового вещества головного мозга; энергетический баланс в указанных условиях поддерживается за счет снижения в крови уровня тиреоидных и половых гормонов, что сопровождается экспрессией регуляторных пептидов в гипоталамусе [Noguchi Y. et al., 2003].

В качестве центрального органа стресса и адаптации к стрессорным факторам мозг играет ключевую роль в формировании поведенческих и физиологических реакций, которые могут привести к успешной адаптации или развитию психических и соматических заболеваний [Mcewen B.S. et al., 2015]. Лимбическая система – комплекс структур мозга, участвующих в организации эмоционально-мотивационного поведения, а также инстинктов, пищевого, полового и оборонительного поведения, смене фаз сна и бодрствования. Наиболее полифункциональными образованиями лимбической системы, включающимися в ответную реакцию на стресс, являются миндалина, гиппокамп и ретикулярная формация головного мозга [Вартанян И.А., 2006; Koob G.F., 2009; Sardari M. et al., 2015]. Важное значение для поддержания исполнительных функций и саморегуляции поведения играет префронтальная

кора [Mcewen B.S., Morrison J.H., 2013]. В многочисленных экспериментах было показано, что хронический стресс вызывает структурное ремоделирование нейронов медиальной префронтальной зоны коры головного мозга, обратимое у молодых животных после прекращения хронического стресса, менее обратимое у животных среднего возраста и в еще меньшей степени у старых животных [Mcewen B.S. et al., 2016].

Хронический стресс, физические и эмоциональные нагрузки приводят к увеличению потребления эндогенного коэнзима Q10, одного из важнейших участников сопряжения электронного транспорта и окислительного фосфорилирования, выполняющего также антиоксидантную функцию, обуславливая высокую вероятность развития его дефицита [Ланкин В.З. с соавт., 2004]. Развитие же многих обменных и иммунных заболеваний и преждевременного старения тесно связано с недостатком энергообразования в организме и повреждением клеточных генераторов энергии [Bhagavan H.N., Chopra R.K., 2005]. Многие патологические состояния у млекопитающих развиваются не во время, а после окончания действия стрессогенного фактора. И именно постстрессорный период является критическим в плане разворачивания всего комплекса компенсаторных реакций, направленных на ограничение отрицательных последствий экстремального воздействия [Bakhmet A.A., Koplík E.V., 2012]. Существенно, что характер протекания восстановительного периода после стрессорной нагрузки отличается у особей с разными параметрами поведения, характеризующихся различной чувствительностью к стрессу [Коплик ЕВ, 2002]. Поэтому в плане предупреждения или снижения выраженности постстрессорной патологии важен индивидуальный подход к анализу механизмов предрасположенности или устойчивости организма к влиянию экстремальных внешних факторов.

Для реализации этих целей требуются технологии повсеместно называемые «Омиками», основанные на высокопроизводительных методах анализа и способные анализировать все возрастающей объем биологической информации. Принимая во внимание новейшие достижения в области молекулярной медицины, актуальным в этом плане представляется поиск новых протеомных маркеров формирования и реализации адаптационно-компенсаторных реакций организма на разных стадиях после стрессорной нагрузки, а также разработка новых путей коррекции нарушений физиологических функций с помощью биологически активных веществ природного происхождения [Sharanova N.E. et al., 2012; Yoshimura M. et al., 2014].

### **Степень разработанности темы**

Новизна и актуальность выбранной темы определяется отсутствием в литературе данных о влиянии коэнзима Q10 на адаптационный ответ организма в условиях метаболического стресса. Исследования, посвященные изучению изменений, происходящих на протеомном уровне при недостатке питательных веществ или варьировании компонентов рациона в

онтогенезе животных являются единичными и носят фрагментарный характер, а изучение и оценка изменений, происходящих на протеомном уровне в головном мозге животных при пищевой депривации ранее не проводились.

Диссертационная работа представляет собой системное исследование влияния коэнзима Q10 на протеомные характеристики сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга крыс в условиях метаболического стресса. Проведен анализ комплекса нарушений, возникающих при действии пищевой депривации в головном мозге, печени и сыворотке крови крыс с использованием физиологических и биохимических методов. Исследование проведено на животных различных типологических групп: поведенчески активных и пассивных, что обусловлено необходимостью разработки донозологических подходов к оценке и предупреждению неблагоприятных последствий стрессовых нагрузок с учетом индивидуальных особенностей организма. Сформулированные автором выводы обоснованы полученными в ходе экспериментальных исследований результатами.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи» в рамках темы №127 «Исследование роли биологически активных веществ природного происхождения в механизмах формирования устойчивости функций к воздействию экстремальных факторов окружающей среды с идентификацией протеомных маркеров».

**Целью настоящей работы** явилось экспериментальное исследование влияния коэнзима Q10 на биохимические процессы, определяющие адаптацию организма в условиях метаболического стресса, с идентификацией протеомных маркеров.

**Основные задачи исследования:**

1. Исследовать особенности биохимических показателей сыворотки крови (содержание глюкозы, коэнзима Q10, уровень про- и противовоспалительных цитокинов), печени (содержание коэнзима Q10, активность катепсинов В и D) и головного мозга (содержание коэнзима Q10, активность катепсинов В и D) крыс с различной поведенческой активностью в условиях метаболического стресса.
2. Изучить протеомные профили сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга (гиппокампа, ретикулярной формации, миндалина и сенсомоторной коры) поведенчески активных и пассивных крыс в условиях метаболического стресса.
3. Оценить влияние коэнзима Q10 на биохимические показатели сыворотки крови (содержание глюкозы, коэнзима Q10, уровень про- и противовоспалительных цитокинов), печени (содержание коэнзима Q10, активность катепсинов В и D) и головного мозга (содержание коэнзима Q10, активность катепсинов В и D) крыс с различной поведенческой активностью в условиях метаболического стресса при введении его в состав рациона.

4. Оценить роль коэнзима Q10 в изменении протеомных профилей сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга (гиппокампа, ретикулярной формации, миндалина и сенсорной коры) поведенчески активных и пассивных крыс в условиях метаболического стресса при введении его в состав рациона.
5. Идентифицировать белки, дифференциально экспрессирующиеся в условиях метаболического стресса и при включении в рацион коэнзима Q10, методом масс-спектрометрического анализа.
6. Выявить взаимосвязь между изменениями биохимических показателей сыворотки крови исследуемых тканей и органов и особенностями протеомных профилей сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга крыс с различной поведенческой активностью в условиях метаболического стресса и при включении в рацион коэнзима Q10.

#### **Научная новизна**

- Впервые выявлены принципиальные различия между протеомными профилями крыс с различной поведенческой активностью в сыворотке крови и эмоциогенных структурах головного мозга.
- Впервые получены экспериментальные данные о влиянии коэнзима Q10 на биохимические показатели и протеомные характеристики сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга крыс в условиях метаболической стрессорной нагрузки.
- Впервые выявлена взаимосвязь между активностью катепсина В в головном мозге и печени крыс в условиях метаболического стресса и при включении в рацион коэнзима Q10.
- Впервые выявлена взаимосвязь между особенностями формирования протеомного профиля эмоциогенных структур головного мозга и активностью катепсина В в головном мозге крыс в условиях метаболической стрессорной нагрузки.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты настоящей работы могут использоваться при обосновании применения коэнзима Q10 и других биологически активных веществ (БАВ), обладающих системным типом воздействия на энергетический метаболизм клетки, при персонализированной диетотерапии неблагоприятных последствий длительной стрессорной нагрузки и коррекции развивающихся системных нарушений, а также для установления и уточнения норм физиологической потребности в указанных БАВ, поступающих с пищевым рационом. Результаты исследования также являются основанием для поиска новых молекулярных маркеров алиментарно-зависимых заболеваний и использования методов протеомной диагностики с целью донозологической оценки действия алиментарных факторов.

## **Методология и методы диссертационного исследования**

Диссертационное исследование посвящено изучению влияния коэнзима Q10 на стресс-индуцированный ответ организма крыс с различными характеристиками поведения. Выбор характера стрессорного воздействия, биологических тканей и жидкостей для анализа обусловлен используемой моделью острого метаболического стресса и ключевой ролью выбранных структур в адаптивном отклике организма на стресс, что подтверждается литературными данными. Методология исследования включает широкий спектр методов: физиологических, биохимических, протеомных и статистических. С целью выявления индивидуальных особенностей действия коэнзима Q10 на организм лабораторные животные были разделены на две типологические группы: поведенчески активные и пассивные.

Использованные статистические методы обработки данных выявили значимые различия между поведенчески активными и пассивными крысами по ряду физиологических и биохимических показателей, а также позволили обосновать вывод о корригирующем влиянии коэнзима Q10 на стресс-индуцированный ответ организма животных.

### **Положения, выносимые на защиту**

- Пищевая депривация, приводящая к метаболическому стрессу, вызывает специфические изменения протеолитической активности лизосом в головном мозге.
- Пищевая депривация, приводящая к метаболическому стрессу, вызывает специфические изменения протеомных профилей сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга крыс.
- Протеомные профили сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга при метаболическом стрессе различны у поведенчески активных и пассивных крыс.
- Коэнзим Q10 оказывает влияние на протеомные профили сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга крыс с различной поведенческой активностью в условиях развития метаболического стресса и адаптации к нему.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Сформулированные диссертантом научные положения и выводы основаны на анализе большого объема экспериментальных исследований, адекватном выборе экспериментальных групп животных, применении современных и воспроизводимых физиологических и биохимических методов исследования. Для статистической обработки использовались адекватные методы сбора и обработки исходных количественных данных.

### **Внедрение результатов в практику**

Материалы проведенных исследований используются в курсе лекций по биохимии в ФГБОУ ВО «Рязанском государственном медицинском университете им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

## **Апробация работы**

Диссертация апробирована на межлабораторной научной конференции ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» 17 февраля 2017 года.

Результаты исследования представлены на:

- II Международной научно-практической конференции «Современная биология: актуальные вопросы» (Санкт-Петербург, 2014),
- XV Всероссийском конгрессе диетологов и нутрициологов с международным участием «Здоровое питание: от фундаментальных исследований к инновационным технологиям» (Москва, 2014),
- 10-й Международной научно-практической конференции «Научная индустрия европейского континента» (Прага, 2014),
- 11-й Международной научно-практической конференции «Стратегические вопросы мировой науки» (Пшемысль, 2015),
- 4-й Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Москва, 2015),
- VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015),
- III Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы естественных и математических наук в современных условиях развития страны» (Санкт-Петербург, 2016),
- XVI Всероссийском конгрессе нутрициологов и диетологов с международным участием, посвящённом 100-летию со дня рождения основателя отечественной нутрициологии академика А.А. Покровского «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Качество пищи» (Москва, 2016),
- V съезде физиологов СНГ, V съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016),
- Школе Молодых Ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Москва, 2016)

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликованы 19 печатных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 4 статьи в научных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ.

## **Соответствие работы паспорту специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.01.04 – Биохимия.



Результаты проведенного исследования соответствуют пункту 10 «Теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения. Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генотерапии и энзимотерапии», пункту 12 «Механизмы и закономерности обмена веществ в организме человека, животных, растений и микроорганизмов. Клиническая биохимия человека и животных. Биохимия питания человека, животных, растений и микроорганизмов. Изучение химической и микробиологической безопасности продуктов биологического происхождения», пункту 14 «Исследования молекулярных механизмов реагирования клеточных компонентов и живых организмов на проникающую радиацию, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, электромагнитные поля, механические, холодовые, тепловые, химические, токсические и другие экстремальные воздействия. Биохимические исследования по созданию протективных средств на эти воздействия. Изучение роли активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления и свободнорадикальных продуктов в нарушениях и регулировании метаболических процессов в биосистемах».

#### **Личный вклад соискателя**

Все результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Постановка задач, проведение экспериментов, анализ и обобщение результатов осуществлялись совместно с научными руководителями.

#### **Структура и объем диссертации**

Работа состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и библиографического списка. Материал диссертации изложен на 133 страницах машинописного текста, содержит 21 таблицу, 34 рисунка. Библиографический список включает 334 источника.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе использовали 140 крыс самцов породы Вистар массой  $210,2 \pm 36,7$  г ( $M \pm SEM$ ).

В качестве острой стрессорной нагрузки использовали модель *метаболического* стресса: 5-дневное голодание (вода *ad libitum*) с последующим восстановлением питания в течение 5 суток. Животные групп контроля и восстановления получали стандартный общевиварный рацион (СОР): 33,5% зерновая смесь (овес – 50%, пшеница – 20%, просо – 10%, подсолнечник – 20%), 13,4% хлеб из пшеничной муки 2-го сорта, 8,9% крупа овсяная, 5,6% творог обезжиренный, 1,6% рыбная мука, 13,4% мясо 2-ой категории, 22,4% капуста, 0,45% рыбий

жир, 0,3% дрожжи кормовые, 0,45% соль поваренная. Для изучения влияния коэнзима Q10 на стресс-индуцированный ответ организма крысы экспериментальных групп получали *per os* 10 мг/кг массы тела (м.т.) коэнзима Q10 (Sigma-Aldrich, США) в составе рациона.

Индивидуально-типологические характеристики животных определяли на компьютеризированной установке для определения эмоциональной реактивности крыс OpenField (НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина) в зависимости от их ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «открытое поле» (Россия).

По завершении каждого этапа эксперимента животных умерщвляли путем декапитации под легким эфирным наркозом в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23.08.2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»; руководство «Guide for the care and use of laboratory animals. 8<sup>th</sup> Edition (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011). С целью макроскопического изучения структуры внутренних органов и обнаружения интеркурентных заболеваний животных подвергали патологоанатомическому вскрытию.

Все биоматериалы для дальнейших биохимических анализов хранили при температуре минус 70<sup>0</sup>С.

**Таблица 1** - Группы экспериментальных животных (А - активные, П - пассивные)

Группа	Условные обозначения	Тип поведенческой активности	CoQ10	
			-	10 мг/кг м.т.
Интактные особи	Инт	А	Группа контроля 1	Группа 3
		П	Группа контроля 2	Группа 4
Голод	Г	А	Группа 5	Группа 7
		П	Группа 6	Группа 8
Восстановление	В	А	Группа 9	Группа 11
		П	Группа 10	Группа 12
Восстановление с CoQ10 после голода с CoQ10	Г+В	А		Группа 13
		П		Группа 14

Концентрацию глюкозы в крови определяли с помощью глюкометра (Contour TS, Bayer).

Хроматографическое определение коэнзима Q10 в сыворотке крови, печени и мозге осуществляли при помощи ВЭЖХ системы Agilent 1100 (США) со спектрофотометрическим детектором.

Активность катепсинов В и D определяли в гомогенатах печени и мозга. Для катепсина D проводили инкубацию гомогенатов с гемоглобином в качестве субстрата. С целью повышения специфичности оценки применяли ингибиторный анализ с использованием пепстатина А. Активность катепсина D измеряли при 280 нм на спектрофотометре Cary 100 Bio (Agilent Technologies, США). В качестве субстрата для катепсина В использовали Na-CBZ-Arg-Arg-7-амидо-4-метилкумарин (Arg-Arg-7-АМС), активность катепсина В измеряли при 440 нм (возбуждение при 348 нм) на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Agilent Technologies, США).

Определение цитокинового профиля сыворотки периферической крови крыс проводили методом мультиплексного анализа на установке Bio-Plex («Bio-Rad», США). В исследовании использовали наборы реагентов для анализа цитокинов (ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12p70, ИЛ-13, ИФН- $\gamma$ , ГМ-КСФ) (Bio-PlexPro™ RatCytokine Th1/Th2 Assay, кат. № 171-K1002M)<sup>1</sup>.

Перед постановкой двумерного электрофореза сыворотку крови очищали от мажорных белков с помощью микрогранул ProteoMiner™ («Bio-Rad», США). Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Брэдфорда [Bradford M.M., 1976]. Изоэлектрофокусирование проводили в стеклянных 18-сантиметровых трубочках с использованием системы PROTEAN IEF Cell («Bio-Rad», США). Полученные гели анализировали с помощью программы PDQuest 8.0 («Bio-Rad», США). Характеристическими считали белковые пятна, повторяемость которых превышала 75%.

Для идентификации белков интереса выбранных отделов мозга и сыворотки крови белковые пятна выделяли из окрашенных гелей и проводили гидролиз белка трипсином для последующего масс-спектрометрического анализа. Регистрация масс-спектров осуществлялась на времяпролетном MALDI-масс-спектрометре BRUKER Ultraflex II (Германия), оборудованном УФ лазером (Nd) в рефлекторном режиме с регистрацией положительных ионов, на базе Центра коллективного пользования "Протеом человека" ИБМХ (г. Москва)<sup>2</sup> и на хроматографической системе Agilent 1260 (Agilent Technologies), соединенной с масс-спектрометром Bruker maxis impact (Bruker Daltonik), на базе ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Москва)<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> Определение цитокинового профиля сыворотки периферической крови крыс проводили совместно со с.н.с. Ригером Н.А. и м.н.с. Евстратовой В.С. лаборатории иммунологии ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии».

<sup>2</sup> Регистрация масс-спектров на базе Центра коллективного пользования "Протеом человека" ИБМХ (г. Москва) проводилась совместно с к.б.н. Торопыгиным И.Ю. и Хряповой Е.В.

<sup>3</sup> Регистрация масс-спектров на базе ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (Москва) проводилась совместно с м.н.с. лаборатории химии пищевых продуктов Малинкиным А.Д.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Поиск проводили в базе данных NCBI.nrg среди белков всех организмов. При работе на времяпролетном MALDI-масс-спектрометре BRUKER Ultraflex II идентификацию белка считали достоверной, если вычисленный для него эмпирический критерий «Mascot score» превышал 63. В случае хроматографической системы Agilent 1260, соединенной с масс-спектрометром Bruker maxis impact достоверность идентификации пептидов определяли путем сравнения значения «peptide score» с пороговым значением, рассчитанным программой Mascot для каждого анализа.

Все данные подвергали компьютерному анализу с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность межгрупповых различий выявляли с помощью непараметрического критерия Mann-Whitney. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Исследование состояния органов-маркеров стресса, динамики изменений концентрации глюкозы в крови, содержания коэнзима Q10 в сыворотке крови, печени и мозге крыс

В ходе исследования были выявлены типичные, согласно литературным данным [Selye Н., 1950], изменения состояния органов-маркеров стресса («триада» стрессорного состояния организма): инволюция тимуса и гипертрофия надпочечников у активных и пассивных животных в период стресса. Отмечено модулирующее влияние коэнзима Q10 на надпочечники и селезенку у крыс с разными параметрами поведения, что, по-видимому, вносит вклад в адаптацию животных к метаболическим стрессорным воздействиям. При этом постстрессорное восстановление органов-маркеров было одинаковым при потреблении коэнзима Q10 исключительно в восстановительный период и с начала стрессорного воздействия (т.е. при пролонгированном приеме коэнзима Q10) (табл.2).

**Таблица 2** - Относительная масса органов-маркеров стресса у крыс разных экспериментальных групп в условиях метаболического стресса (мг/100 г м.т.,  $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Группа	Тип поведенческой активности	Тимус		Надпочечники		Селезенка	
		-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10
Инт	А	180,60 ±7,29	265,73 ±20,48**	10,87 ±0,50	12,23 ±0,75**	584,04 ±40,69	1023,18 ±85,38**
	П	181,43 ±10,3	197,45 ±14,04	11,39 ±0,93	11,39 ±0,57	662,10 ±50,34	798,16 ±76,35°,**
Г	А	192,96 ±54,30	144,84 ±8,20	18,40 ±0,88*	17,99 ±1,25	296,20 ±40,76*	699,15 ±54,73**
	П	160,87 ±29,68	132,17 ±12,13	18,23 ±0,85*	17,14 ±0,92	330,61 ±34,32*	709,06 ±78,24**

Продолжение таблицы 2

В	А	105,18 ±32,34*	116,45 ±13,33 <sup>#</sup>	12,16 ±1,07	11,23 ±0,82	483,70 ±37,57*	808,87 ±68,19**
	П	269,49 ±32,12* <sup>°</sup>	108,50 ±5,44** <sup>#</sup>	13,57 ±0,91*	10,94 ±0,55**	495,38 ±82,36*	590,42 ±16,78 <sup>°</sup> <sup>#</sup>
Г+В	А		151,59 ±12,73		12,15 ±1,19		811,71 ±45,05
	П		142,93 ±7,92		11,23 ±0,92		808,83 ±43,15

\*по сравнению с интактными особями,  $p < 0,05$ ; °по сравнению с активными крысами,  $p < 0,05$ ; \*\*по сравнению с подобной группой, не получавшей добавку,  $p < 0,05$ ; #по сравнению с группой, получавшей добавку во время голода и восстановления,  $p < 0,05$

Исследование динамики изменений концентрации глюкозы в крови крыс показало повышение уровня глюкозы у пассивных особей, получавших коэнзим Q10 в составе рациона в периоды контроля и голода, по сравнению с теми же особями в эксперименте без добавки; для активных крыс подобные изменения отмечены в периоды голода и восстановления (табл.3).

Данные по изменению содержания эндогенного коэнзима Q10 в сыворотке крови, головном мозге и печени крыс иллюстрируют физиологические изменения его уровня при остром метаболическом стрессе. Дополнительное введение коэнзима Q10 в рацион животных способствует уменьшению различий в динамике концентраций данного соединения в стрессорный и постстрессорный периоды, что, по-видимому, имеет адаптивное значение. Указанные изменения наиболее выражены у поведенчески активных особей в сыворотке крови и мозге, а у пассивных – в сыворотке крови и печени (табл.4).

**Таблица 3** - Динамика концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс в условиях метаболического стресса (ммоль/л,  $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Группа	Тип поведенческой активности	Коэнзим Q10	
		-	10 мг/кг м.т.
Инт	А	5,94±0,17	5,96±0,41
	П	6,43±0,37	7,10±0,24** <sup>°</sup>
Г	А	3,28±1,05*	4,92±0,15**
	П	3,10±0,70*	4,81±0,26**
В	А	5,90±0,25	6,50±0,27**
	П	6,30±0,17	6,65±0,31
Г+В	А		6,21±0,18
	П		6,84±0,13 <sup>°</sup>

\*по сравнению с интактными особями,  $p < 0,05$ ; °по сравнению с активными крысами,  $p < 0,05$ ; \*\*по сравнению с подобной группой, не получавшей добавку,  $p < 0,05$

**Таблица 4** - Динамика содержания коэнзима Q10 в сыворотке крови, мозге и печени крыс в условиях метаболического стресса (ммоль/л,  $M \pm m$ , n=10)

Группа	Тип поведенческой активности	Сыворотка крови		Мозг		Печень	
		-	CoQ10	-	CoQ10	-	CoQ10
Инт	А	0,41 ±0,07	0,68 ±0,33	1,30 ±0,47	2,60 ±0,67*	4,46 ±0,94	18,60 ±11,11*
	П	0,94 ±0,34°	0,41 ±0,28	1,31 ±0,57	2,77 ±0,25*	4,91 ±0,48	7,71 ±3,19*
Г	А	2,55 ±1,16*	1,49 ±1,28	4,63 ±1,03*	2,07 ±0,34***	17,98 ±6,89*	8,86 ±1,41***
	П	2,49 ±1,98	0,57 ±0,23**	0,90 ±0,08°	3,57 ±0,88***°	19,90 ±2,57*	7,32 ±1,74***
В	А	4,61 ±2,88*#	0,46 ±0,28**	0,99 ±0,88	0,91 ±0,25*	5,91 ±2,93#	14,20 ±3,39***
	П	2,64 ±1,49*#	1,11 ±0,1	0,68 ±0,29#	2,71 ±0,77***, #, °	4,57 ±2,63	3,71 ±0,32°
Г+В	А		0,55 ±0,26**		0,89 ±0,30*		18,83 ±3,51*
	П		0,32 ±0,13**		4,08 ±0,62*°		5,81 ±4,64

\*по сравнению с интактными животными в группе,  $p < 0,05$ ; °по сравнению с активными крысами,  $p < 0,05$ ; \*\*по сравнению с подобной группой, не получавшей добавку,  $p < 0,05$ ; #по сравнению с группой, получавшей добавку во время голода и восстановления,  $p < 0,05$

#### Исследование цитокинового профиля сыворотки периферической крови крыс

Методом мультиплексного иммунного анализа были определены концентрации провоспалительных цитокинов, синтезируемых Th1-клетками (ИЛ-2, ИЛ-12p70, ИФН- $\gamma$ ), моноцитами/макрофагами (ИЛ-1), а также Т- и В-лимфоцитами, макрофагами и другими клетками (ИЛ-6); ГМ-КСФ, продуцируемого макрофагами, Т-лимфоцитами, а также фибробластами и эндотелиоцитами; противовоспалительных цитокинов – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13 – основным источником которых являются Th2-клетки.

Показано, что употребление CoQ10 животными групп голода обоих поведенческих типов нивелирует снижение концентрации про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови, по сравнению с особями той же группы без добавки. Наиболее выраженные значимые изменения отмечены для ИЛ-5 у пассивных животных групп голода (табл.5,6). Значимые изменения концентрации исследуемых цитокинов (по отношению к интактным особям) отмечены в периоды восстановления: в эксперименте без добавки и с добавкой у обоих поведенческих типов крыс. У активных и пассивных особей данные изменения были однонаправлены, но в большей степени выражены у пассивных крыс. Максимальные изменения выявлены для колониестимулирующего фактора. При пролонгированном приеме CoQ10 наблюдается увеличение содержания большинства про- и противовоспалительных цитокинов,

что превышает не только исходный уровень, но и соответствующие показатели у крыс в период голода.

Таким образом, процесс восстановления у животных характеризуется реакцией, сходной с неспецифическим иммунорегуляторным процессом, сопровождающимся мультицитокиновой продукцией различными субпопуляциями иммунных клеток, участвующих как в Th1-, так и Th2-ответе, что является компенсаторным ответом организма на действие стрессорных факторов.

**Таблица 5** - Цитокиновый профиль периферической крови у поведенчески активных крыс разных экспериментальных групп (пг/мл,  $M \pm SD$ )

Цитокины	Группы							
	Инт		Г		В		Г+В	
	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10
ИЛ-1 $\alpha$	0,205 $\pm 0,169$	0,197 $\pm 0,030$	0,145 $\pm 0,069$	0,176 $\pm 0,086$	0,183 $\pm 0,037$	0,177 $\pm 0,058$		0,164 $\pm 0,029$
ИЛ-1 $\beta$	0,104 $\pm 0,167$	0,114 $\pm 0,058$	0,056 $\pm 0,018$	0,079 $\pm 0,068$	0,086 $\pm 0,029$	0,079 $\pm 0,034$		0,062 $\pm 0,028$
ИЛ-2	0,245 $\pm 0,318$	0,191 $\pm 0,136$	0,229 $\pm 0,234$	0,253 $\pm 0,102$	0,309 $\pm 0,115^*$	0,305 $\pm 0,139$		0,391 $\pm 0,096^*$
ИЛ-4	0,035 $\pm 0,050$	0,033 $\pm 0,020$	0,021 $\pm 0,015$	0,030 $\pm 0,020$	0,061 $\pm 0,017^{**}$	0,069 $\pm 0,022^{**,+}$		0,062 $\pm 0,021^*$
ИЛ-5	0,252 $\pm 0,128$	0,269 $\pm 0,078$	0,135 $\pm 0,120$	0,257 $\pm 0,081$	0,340 $\pm 0,027^{**}$	0,328 $\pm 0,037^{**}$		0,324 $\pm 0,038^{**}$
ИЛ-6	0,227 $\pm 0,352$	0,197 $\pm 0,257$	0,159 $\pm 0,056$	0,198 $\pm 0,182$	0,544 $\pm 0,166^{**}$	0,604 $\pm 0,284^{**,+}$		0,498 $\pm 0,135^{**}$
ИЛ-10	0,094 $\pm 0,149$	0,113 $\pm 0,031$	0,071 $\pm 0,048$	0,069 $\pm 0,051$	0,167 $\pm 0,052^{**}$	0,174 $\pm 0,039^{**,+}$		0,146 $\pm 0,074^*$
ИЛ-12p70	0,050 $\pm 0,094$	0,061 $\pm 0,027$	0,028 $\pm 0,017$	0,029 $\pm 0,026$	0,072 $\pm 0,014^{**}$	0,054 $\pm 0,026$		0,063 $\pm 0,031^*$
ИЛ-13	0,049 $\pm 0,066$	0,050 $\pm 0,058$	0,033 $\pm 0,010$	0,044 $\pm 0,032$	0,106 $\pm 0,019^{**}$	0,098 $\pm 0,027^{**,+}$		0,083 $\pm 0,027^{**,\circ}$
ИФН- $\gamma$	0,093 $\pm 0,144$	0,088 $\pm 0,093$	0,061 $\pm 0,048$	0,072 $\pm 0,046$	0,217 $\pm 0,076^{**}$	0,253 $\pm 0,139^{**,+}$		0,171 $\pm 0,040^{**}$
ГМ-КСФ	0,016 $\pm 0,027$	0,014 $\pm 0,014$	0,009 $\pm 0,007$	0,015 $\pm 0,012$	0,049 $\pm 0,015^{**}$	0,050 $\pm 0,022^{**,+}$		0,046 $\pm 0,021^{**}$

Здесь и в таблице 6: \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,01$  по сравнению с контролем; + $p < 0,05$  и ++ $p < 0,01$  по сравнению с группой голода с коэнзимом Q10;  $^\circ p < 0,01$  по сравнению с группой восстановления;  $^x p < 0,05$  по сравнению с группой голода



**Таблица 6 - Цитокиновый профиль периферической крови у поведенчески пассивных крыс разных экспериментальных групп (пг/мл,  $M \pm SD$ )**

Цитокины	Группы							
	Инт		Г		В		Г+В	
	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10
ИЛ-1 $\alpha$	0,163 $\pm 0,057$	0,160 $\pm 0,055$	0,125 $\pm 0,035$	0,152 $\pm 0,085^{oo}$	0,203 $\pm 0,052$	0,184 $\pm 0,059$		0,135 $\pm 0,033^{oo}$
ИЛ-1 $\beta$	0,340 $\pm 0,633$	0,100 $\pm 0,125$	0,078 $\pm 0,203$	0,100 $\pm 0,137$	0,077 $\pm 0,032$	0,101 $\pm 0,064$		0,055 $\pm 0,028$
ИЛ-2	0,177 $\pm 0,139$	0,223 $\pm 0,135$	0,165 $\pm 0,112$	0,116 $\pm 0,149$	0,316 $\pm 0,092^*$	0,337 $\pm 0,111^{*+}$		0,319 $\pm 0,117$
ИЛ-4	0,018 $\pm 0,014$	0,022 $\pm 0,014$	0,014 $\pm 0,011$	0,021 $\pm 0,022$	0,069 $\pm 0,023^{**}$	0,072 $\pm 0,024^{**++}$		0,049 $\pm 0,024^*$
ИЛ-5	0,204 $\pm 0,061$	0,232 $\pm 0,074$	0,018 $\pm 0,015^*$	0,207 $\pm 0,072^x$	0,315 $\pm 0,041^{**}$	0,305 $\pm 0,065^{*+}$		0,301 $\pm 0,053^{**}$
ИЛ-6	0,121 $\pm 0,093$	0,149 $\pm 0,115$	0,076 $\pm 0,077$	0,152 $\pm 0,138$	0,572 $\pm 0,278^{**}$	0,648 $\pm 0,233^{**++}$		0,446 $\pm 0,189^{**}$
ИЛ-10	0,046 $\pm 0,034$	0,047 $\pm 0,033$	0,032 $\pm 0,043$	0,052 $\pm 0,050$	0,140 $\pm 0,049^{**}$	0,144 $\pm 0,058^{**++}$		0,122 $\pm 0,039^{**}$
ИЛ-12p70	0,016 $\pm 0,012$	0,023 $\pm 0,018$	0,012 $\pm 0,010$	0,014 $\pm 0,008$	0,065 $\pm 0,035^{**}$	0,078 $\pm 0,049^{**++}$		0,058 $\pm 0,018^{**}$
ИЛ-13	0,080 $\pm 0,144$	0,047 $\pm 0,040$	0,043 $\pm 0,033$	0,040 $\pm 0,037$	0,093 $\pm 0,032^*$	0,103 $\pm 0,042^{*++}$		0,081 $\pm 0,027^*$
ИФН- $\gamma$	0,055 $\pm 0,035$	0,067 $\pm 0,042$	0,037 $\pm 0,033$	0,072 $\pm 0,067$	0,220 $\pm 0,126^{**}$	0,243 $\pm 0,086^{**++}$		0,158 $\pm 0,078^{**}$
ГМ-КСФ	0,006 $\pm 0,006$	0,009 $\pm 0,007$	0,002 $\pm 0,011$	0,007 $\pm 0,014$	0,047 $\pm 0,025^{**}$	0,050 $\pm 0,023^{**++}$		0,035 $\pm 0,024^{**}$

**Протеомное исследование головного мозга и сыворотки крови и изучение активности катепсинов D и B в печени и мозге крыс**

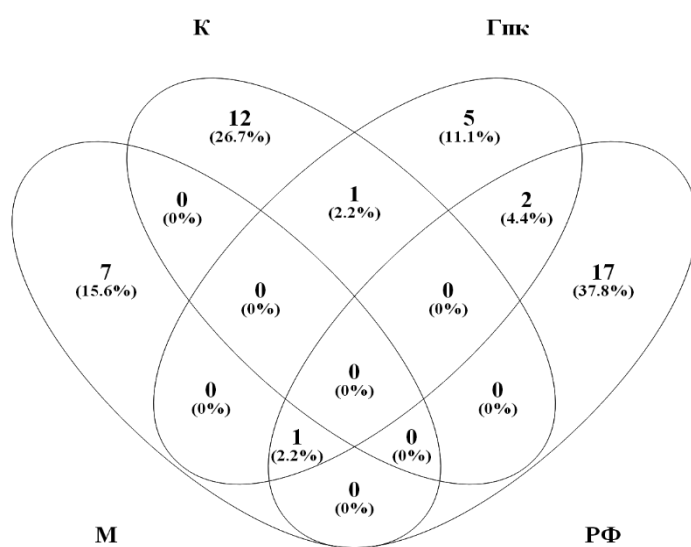
Результаты протеомного исследования сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга крыс с различной поведенческой активностью демонстрируют влияние метаболического стресса на изменение экспрессии ряда белков, а также отражают роль алиментарного воздействия при употреблении животными в составе рациона коэнзима Q10.

Среди идентифицированных белков головного мозга крыс в зависимости от выполняемых ими функций были выделены следующие группы: белки-ферменты, регуляторные, структурные, транспортные и защитные белки. Четыре дифференциально экспрессирующихся белка были обнаружены сразу в нескольких исследуемых отделах головного мозга животных: Rho GTPаза контроля деления клетки CDC42 в коре и гиппокампе, белок-фермент пероксиредоксин-2 в миндалине, гиппокампе и ретикулярной формации головного мозга, регуляторные белки ANXA3 и Rab-6A в гиппокампе и ретикулярной формации (рис.1).

Среди структурных белков были идентифицированы 3 белка Комплекса 1 митохондрий: НАДН дегидрогеназа [убихинон] железосерный белок 8 в миндалине, НАДН дегидрогеназа



[убихинон] флавопротеин 2 и электронпереносающий флавопротеин субъединица альфа (ETFА) в коре головного мозга крыс; а также 2 протеасомные субъединицы: PSB2 в коре и PSA5 в ретикулярной формации. К регуляторным белкам, осуществляющим контроль за двигательными функциями клетки, относятся: тропомодулин-2 в миндалине, описанный ранее CDC42 в коре, RhoВ в ретикулярной формации, актин-связывающие белки F-актин кэпирующий белок субъединица альфа 2 и профилин-2 в гиппокампе. К белкам, регулирующим везикулярный транспорт можно отнести ГТФ-связывающий белок SAR1a, идентифицированный в миндалине головного мозга крыс, белки SNAP-25, альфа-синуклеин в коре, упоминавшиеся ранее белки Rab-1a и Rab-6A в коре и гиппокампе соответственно, белки PEBP1, ERp29, ГТФ-связывающий ядерный белок Ran и описанный выше RhoВ в ретикулярной формации. Среди идентифицированных белков, регулирующих клеточный цикл, выделены: описанный ранее белок CDC42, белок NDPK в гиппокампе, белки 14-3-3 эпсилон, WDR61 и PP1 в коре головного мозга. К белкам-ферментам, выполняющим защитные функции, в т.ч. антиоксидантные, относятся идентифицированные глутатион S-трансфераза омега-1 и Tcstb белок в миндалине головного мозга экспериментальных животных, белок TXL-1 в гиппокампе, OTUB1 и DJ-1 в коре, IMPase 1 и упоминавшийся ранее RhoGDI1 в ретикулярной формации.



**Рисунок 1** - Диаграмма Эйлера-Венна для идентифицированных белков эмоциогенных структур мозга

Выявленные изменения экспрессии идентифицированных белков в стрессорный период, в частности, сниженная экспрессия пероксиредоксина-2, ANXA3 и ANXA5, EFHD2, PSB2 и PSA5, НАДН дегидрогеназа [убихинон] железосерного белка 8, ГТФ-связывающего ядерного белка Ran, альфа-, бета-1 и бета-2 субъединиц G белка, глутатион S-трансферазы омега-1,

IMPase 1, ENOPH1, пируватдегидрогеназы E1 и белка TP1, повышенная экспрессия CDC42, Rab-6A и Rab-14, EPr29, 14-3-3 эпсилон, TXL-1, в различных структурах головного мозга крыс свидетельствуют о том, что метаболический стресс способствует разворачиванию комплекса компенсаторных реакций в организме и может приводить к негативным изменениям функционирования систем органов и тканей.

Полученные данные по изменению экспрессии кальций-связывающих белков в различных отделах головного мозга крыс указывают на вовлеченность белков данного типа в реализацию стрессорного и постстрессорного ответа организма и важную роль кальция, как универсального вторичного посредника, в регуляции жизненно важных физиологических процессов.

Различия в изменении экспрессии ряда белков в различных эмоциогенных структурах вероятно отражают динамику их распределения в мозге в условиях стрессорной нагрузки.

Имеющиеся результаты также подтверждают существующие в литературе данные о разворачивании многих негативных последствий стресса в период после окончания воздействия на организм экстремальных факторов [Пшенникова М.Г., 2000]. Например, повышение экспрессии F-актин кэпирующего белка альфа-2 в период восстановления у активных крыс вероятно указывает на снижение мобильности клеток в постстрессорный период с целью сохранения клеточной энергии.

Различия в экспрессии белков в различных условиях эксперимента у животных с разными индивидуально-типологическими параметрами указывают на существование специфических путей адаптации поведенчески активных и пассивных особей к стрессу. При этом наиболее значимые изменения отмечены для поведенчески пассивных крыс, что свидетельствует об их большей реактивности и лабильности в ответ на стрессорное воздействие.

Наблюдавшиеся изменения экспрессии ряда белков и достижение дострессовых показателей при введении в рацион животных коэнзима Q10 указывают на нивелирование негативных процессов, вызванных острой стрессорной нагрузкой, и свидетельствует о модулирующем и компенсаторном действии коэнзима Q10 на организм.

При исследовании активности катепсина В в головном мозге крыс были выявлены достоверные различия между активностью фермента у пассивных и активных крыс на всех этапах эксперимента: у активных в среднем на 20 – 30% ниже уровня активности данной протеазы у пассивных. Динамика изменения активности катепсина В в головном мозге крыс с различной поведенческой активностью характеризовалась значимым повышением активности фермента к концу пятидневного голодания на 39 и 58% у активных и пассивных особей соответственно, по сравнению с контролем, и достоверным, хотя и выраженным в меньшей степени, сохранением повышенной активности катепсина В в восстановительный период

(табл.7). Полученные данные в совокупности с результатами по изменению экспрессии ряда белков головного мозга крыс (Rab-14, Rab-1a и Rab-6A, SAR1a, кальцинейрин субъединица В тип 1, кальцинейрин В гомологичный белок 1, альфа-синуклеин, ANXA3, F-актин кэпирующий белок субъединица альфа 2, rhob, Ran, DJ-1 и PP-1, PSB2 и PSA5) потенциально свидетельствуют о взаимодействии катепсина В с рядом сигнальных и транспортных белков головного мозга в процессе микротубулярного транспорта данной протеазы между клеточными структурами. Полученные результаты также согласуются с исследованиями [Tu C. et al., 2008; Zwicky R., Baici A., 2000], где выявлено, что энзиматически активная форма катепсина В всегда ассоциирована с полимеризованным тубулином, транслоцируется к поверхности клетки и колокализуется вместе с аннексином А2 (ANXA2), представителем семейства аннексинов, несколько из белков которого (ANXA3 и ANXA5) показали дифференциальную экспрессию в структурах мозга в нашем исследовании. В совокупности ранее проведенные исследования и полученные нами данные позволяют сделать заключение об участии катепсина В в формировании протеомного пула ткани головного мозга при адаптационной реакции клеток на стресс. Данное положение является обоснованным, принимая во внимание, что катепсин В характеризуется высокой скоростью обновления ( $t_{1/2}$  составляет не более 24 часов) [Mort J.S., Buttle D.J., 1997], и он обнаружен в 80% тканей, в том числе в значительной концентрации в коре, гипоталамусе и гиппокампе крыс, мышей и человека [Bernstein H.G. et al., 1988; Uhlen M. et al., 2015].

Катепсин В осуществляет роль триггера в запуске каспазного звена в ткани головного мозга [Яковлев А.А., Гуляева Н.В., 2015; Onufriev M.V. et al., 2009; Yu Z.Q. et al., 2014]. Введение в состав рациона пассивных особей дополнительного CoQ10 компенсирует негативное влияние стресса на организм животных. При этом как у пассивных, так и у активных животных при употреблении коэнзима Q10 на стадии острого стресса сохраняется повышенный по сравнению с контролем уровень активности катепсина В, но выраженный в меньшей степени, что отражает антиапоптозный эффект коэнзима Q10.

В свою очередь увеличение активности катепсина В в головном мозге и одновременное повышение экспрессии коронина в условиях метаболического стресса, сохраняющиеся вплоть до восстановительного периода дает основание предположить существование опосредованной связи энзиматически активной формы катепсина В с коронином, осуществляющим интеграцию внеклеточных сигналов к актиновому цитоскелету в лейкоцитах, определяющему их способность к реакциям миграции и фагоцитоза и, соответственно, апоптоза, поскольку фагоцитоз является завершающей стадией апоптоза. Данное заключение находит подтверждение в исследованиях, выживших однонаправленное увеличение активности катепсина В и экспрессии коронина [Innocenti F. et al., 2011]. Таким образом снижение

активности катепсина В и экспрессии коронина в период стресса при приеме коэнзима Q10 в совокупности отражают антиапоптозный эффект коэнзима Q10 [Манских В.Н., 2007].

Наряду с этим, в литературе имеются сведения о том, что нарушения внутриклеточного гомеостаза ионов кальция может вести к высвобождению и активации прокаспазы-12, локализованной в эндоплазматическом ретикулуме, что также инициирует процесс апоптоза. С учетом полученных в ходе нашего исследования данных об изменении экспрессии большого количества кальций-связывающих белков, отражающих их участие в реализации адаптационного ответа организма, мы предполагаем также возможность реализации данного механизма индукции апоптоза. Потребность в кальций-связывающих белках, обеспечивающих перенос ионов кальция и выступающих в качестве своеобразного буфера, поддерживающего низкий уровень  $Ca^{2+}$  внутри клетки, возрастает в ответ на повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  при нарушении гомеостаза [Колобынина К.Г. с соавт., 2015; Domínguez D.C. et al., 2015]. В ходе протеомного исследования была обнаружена повышенная экспрессия идентифицированных кальций-связывающих белков в период острой стрессорной нагрузки, и мы полагаем, что полученные данные можно также считать свидетельством антиапоптозного эффекта коэнзима Q10.

**Таблица 7** - Активность катепсина В в ткани мозга при метаболическом стрессе (мкмоль/мг белка,  $M \pm m$ , n=10)

Тип поведенческой активности	Группы							
	Инт		Г		В		Г+В	
	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10	-	Коэнзим Q10
А	11,9 ±0,69	10,25 ±0,74	16,5 ±0,71* **	15,5 ±0,71*	14,1 ±0,65* **	12,9 ±0,65		11,8 ±0,7
П	14,9 ±0,64	12,4 ±0,76	23,5 ±0,16	20,4 ±0,66*	18,1 ±0,66	18,6 ±0,69*		17,4 ±0,51*

\* $p < 0,05$  по сравнению с группой интактных животных; \*\* $p < 0,05$  по сравнению с группой пассивных животных

Выявленные протеомные маркеры, идентифицированные в условиях метаболического стресса при включении в рацион коэнзима Q10, характеризуют особенности адаптационного потенциала поведенчески различных животных (рис.2) и являются убедительным свидетельством необходимости использования методов протеомного картирования с целью разработки персонализированных подходов к предупреждению неблагоприятных последствий стрессовых нагрузок путем включения в рацион питания модулятора энергообмена в клетке коэнзима Q10.

## ВЫВОДЫ

1. Метаболический стресс, обусловленный пищевой депривацией, приводит к возникновению системных нарушений на биохимическом и протеомном уровнях, что проявляется в изменении состояния органов-маркеров стресса, уровней глюкозы и цитокинов, содержании эндогенного коэнзима Q10 в сыворотке крови, активности катепсина В в головном мозге, экспрессии ряда характеристических белков в сыворотке крови и эмоциогенных структурах головного мозга крыс с различной поведенческой активностью.
2. Выявлены различия в биохимических путях адаптации поведенчески активных и пассивных животных к стрессу: наиболее выраженные изменения в условиях метаболического стресса и в период восстановления отмечены у поведенчески пассивных крыс, что проявляется в изменении уровней глюкозы в крови, коэнзима Q10 в тканях головного мозга и печени, содержания про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови, активности катепсина В в мозге.
3. Установлены особенности протеомных профилей сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга (гиппокампа, ретикулярной формации, миндалина и сенсомоторной коры) поведенчески активных и пассивных крыс, характеризующиеся дифференциальной экспрессией ряда белков в условиях метаболического стресса. Различия в изменении экспрессии характеристических белков у поведенчески активных и пассивных крыс свидетельствуют о существовании различий в биохимических путях адаптации животных с разными индивидуально-типологическими параметрами к стрессу.
4. Коэнзим Q10 в дозировке 10 мг/кг м.т. в составе рациона оказывает компенсаторное влияние на состояние органов-маркеров стресса, уровень глюкозы в крови, содержание эндогенного коэнзима Q10 в сыворотке крови, ткани головного мозга и печени, активность катепсина В в головном мозге; употребление коэнзима Q10 в период метаболического стресса нивелирует снижение уровня про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Большинство выявленных изменений было одинаковым при потреблении коэнзима Q10 исключительно в восстановительный период и с начала стрессорного воздействия (при пролонгированном приеме добавки).
5. Введение коэнзима Q10 в состав рациона поведенчески активных и пассивных крыс в условиях метаболического стресса приводило к изменению протеомных профилей сыворотки крови и эмоциогенных структур головного мозга (гиппокампа, ретикулярной формации, миндалина и сенсомоторной коры), о чем свидетельствует изменение экспрессии ряда характеристических белков. Также выявлены различия в скорости реализации адаптивного ответа животных с разными индивидуально-типологическими параметрами.

6. Показано участие кальций-связывающих белков и белков, регулирующих везикулярный транспорт, в реализации стрессорного и постстрессорного ответа организма, о чем свидетельствует характер изменения экспрессии белков ANXA3, ANXA5, кальцинейрин В гомологичного белка 1, кальбиндина D-28K, кальцинейрин субъединицы В тип 1, EFHD2, Rab-14, Rab-1a, Rab-6A, SAR1a, F-актин кэпирующий белок субъединица альфа 2, RhoB, Ran, DJ-1, PP-1, PSB2, PSA5.
7. Выявленные изменения в различных функциональных системах при метаболическом стрессе свидетельствуют о специфичности компенсаторных адаптационных реакций организма на протеомном уровне. Установлено участие катепсина В в формировании специфического протеомного пула эмоциогенных структур головного мозга и сыворотки крови крыс с различной поведенческой активностью, о чем свидетельствует характер изменения экспрессии коронина, белков DJ-1, PP1, PSB2, PSA5 и ряда сигнальных и транспортных белков головного мозга животных.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

##### *А. Статьи, опубликованные в ведущих журналах, рекомендованных ВАК РФ*

1. **Кирбаева Н.В.**, Шаранова Н.Э., Перцов С.С. Современные методы нутриметаболомных и протеомных исследований в биохимии питания // Вопросы питания, 2014. Т.83, №2. – С.4-15. (1,41 печ.л.)
2. **Кирбаева Н.В.**, Кулакова С.Н., Батурина В.А., Карагодина З.В., Шаранова Н.Э., Перцов С.С., Васильев А.В. Особенности биохимических изменений у крыс с разными характеристиками поведения при метаболическом стрессе. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014.-Т. , №10.-С.430-435. (0,7 печ.л.)
3. **Кирбаева Н.В.**, Шаранова Н.Э., Жминченко В.М., Торопыгин И.Ю., Коплик Е.В., Перцов С.С., Васильев А.В. Влияние коэнзима Q10 на протеомный профиль миндалины головного мозга крыс в условиях острого метаболического стресса. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. - №4. – с. 444-448. (0,58 печ.л.)
4. **Кирбаева Н.В.**, Шаранова Н.Э., Батурина В.А., Жминченко В.М., Перцов С.С., Васильев А.В. Влияние метаболического стресса на содержание коэнзима Q10 в тканях активных и пассивных крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, №5. – С.593-595. (0,35 печ.л.)

##### *Б. Статьи, опубликованные в других изданиях*

5. **Кирбаева Н.В.**, Шаранова Н.Э., Васильев А.В., Перцов С.С., Коплик Е.В. Влияние коэнзима q10 на состояние органов-маркеров стресса и динамику концентрации глюкозы в крови крыс

с различной поведенческой активностью в условиях метаболического стресса // Научный журнал «Puxis», 2016, Т.4, №3. – С.14-24. (1,28 печ.л.)

6. **Кирбаева Н.В.**, Шаранова Н.Э., Малинкин А.Д., Васильев А.В. Влияние коэнзима Q10 на протеомные профили гиппокампа и ретикулярной формации головного мозга крыс в условиях метаболического стресса // Наука в современном мире, 2016, № 5. – С.4-8. (0,58 печ.л.)
7. **Kirbaeva N.V.**, Sharanova N.E., Vasil'ev A.V. Stress-induced changes and effect of coenzyme Q10 supplementation in amygdale and cortex proteomic profiles of rats with different behavioral characteristics under the conditions of acute metabolic stress // Международный научно-исследовательский журнал, 2016. Т.3, №45. – С.21-22. (0,25 печ.л.)
8. **Kirbaeva N.V.**, Sharanova N.E., Malinkin A.D., Vasil'ev A.V. Proteomic profiles of amygdale and cortex in rats with different behavioral characteristics during the metabolic stress and the additional supplement of CoQ10 // The scientific heritage, 2016, Vol.1, №1(1). – P.4-6. (0,35 печ.л.)

*В. Материалы научных конференций*

9. **Кирбаева Н.В.**, Батурина А.К., Шаранова Н.Э., Васильев А.В. Влияние метаболического стресса на уровень коэнзима Q10 в сыворотке крови крыс с различной поведенческой активностью // Вопросы питания. Приложение. Материалы XV Всероссийского конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Здоровое питание: от фундаментальных исследований к инновационным технологиям», Москва, 2014. Т.83, №3. – С.260-261. (0,23 печ.л.)
10. **Кирбаева Н.В.** Содержание коэнзима Q10 в сыворотке крови крыс с различной поведенческой активностью в условиях метаболического стресса // Сборник материалов II международной научно-практической конференции «Современная биология: актуальные вопросы», СПб, 2014, №2. – С.11-15. (0,58 печ.л.)
11. **Кирбаева Н.В.**, Батурина В.А., Шаранова Н.Э., Жминченко В.М., Перцов С.С. Стресс-индуцированный ответ у поведенчески активных и пассивных крыс в условиях пищевой депривации при введении в рацион коэнзима Q10 // Сборник материалов 10 международной научно-практической конференции «Научная индустрия европейского континента», Прага, 2014. – С.41-43. (0,19 печ.л.)
12. **Кирбаева Н.В.**, Батурина В.А., Шаранова Н.Э., Жминченко В.М., Перцов С.С. Влияние коэнзима Q10 при введении его в рацион на стресс-индуцированный ответ у поведенчески активных и пассивных крыс в условиях метаболического стресса // Сборник материалов 11 международной научно-практической конференции «Стратегические вопросы мировой науки», Пшемысль, 2015. – С.51-53. (0,19 печ.л.)



13. **Кирбаева Н.В.**, Шаранова Н.Э., Перцов С.С. Влияние коэнзима Q10 на протеомный профиль миндалины головного мозга крыс с различными характеристиками поведения в условиях метаболического стресса // VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Материалы симпозиума, Новосибирск, 2015. – С.126. (0,08 печ.л.)
14. Шаранова Н.Э., **Кирбаева Н.В.**, Батурина В.А., Перцов С.С., Васильев А.В. Динамика концентрации коэнзима Q10 в сыворотке, мозге и печени крыс с различной поведенческой активностью в условиях острого метаболического стресса // Сборник материалов 4й международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», Москва, 2015. – С.693-696. (0,47 печ.л.)
15. **Кирбаева Н.В.** Исследование влияния коэнзима Q10 на протеомные показатели сыворотки крови крыс с различной поведенческой активностью в условиях метаболического стресса // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы естественных и математических наук в современных условиях развития страны», СПб, 2016, Вып.3. – С.48-50. (0,06 печ.л.)
16. **Кирбаева Н.В.**, Васильев А.В., Перцов С.С. Влияние коэнзима Q10 на протеомный профиль коры головного мозга крыс с различными характеристиками поведения в условиях метаболического стресса // Вопросы питания. Приложение. Материалы XVI Всероссийского конгресса нутрициологов и диетологов с международным участием, посвящённого 100-летию со дня рождения основателя отечественной нутрициологии академика А.А. Покровского «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Качество пищи», Москва, 2016, Т.85, №2. – С.53. (0,12 печ.л.)
17. **Кирбаева Н.В.**, Шаранова Н.Э., Васильев А.В. Исследование влияния коэнзима q10 на протеомные показатели эмоциогенных структур головного мозга крыс с различными характеристиками поведения // Научные труды V съезда физиологов СНГ, V съезда биохимиков России, конференции ADFLIM. Спецвыпуск. Сочи, Дагомыс, 2016, Т.2. – С.66. (0,12 печ.л.)
18. **Кирбаева Н.В.**, Абрамова А.Ю., Васильев А.В., Перцов С.С. Исследование цитокинового профиля сыворотки периферической крови у крыс в условиях метаболического стресса // Сборник материалов школы молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний», Москва, 2016. – С.95-96. (0,23 печ.л.)
19. **Кирбаева Н.В.**, Шаранова Н.Э., Малинкин А.Д., Васильев А.В. Роль пероксиредоксина-2 в адаптации к пищевой депривации // Сборник материалов школы молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний», Москва, 2016. – С.97-100. (0,47 печ.л.)



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**В** – Восстановление

**Г** – Голод

**ГМ-КСФ** – Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

**ГПК** – Гиппокамп

**ИЛ** – Интерлейкин

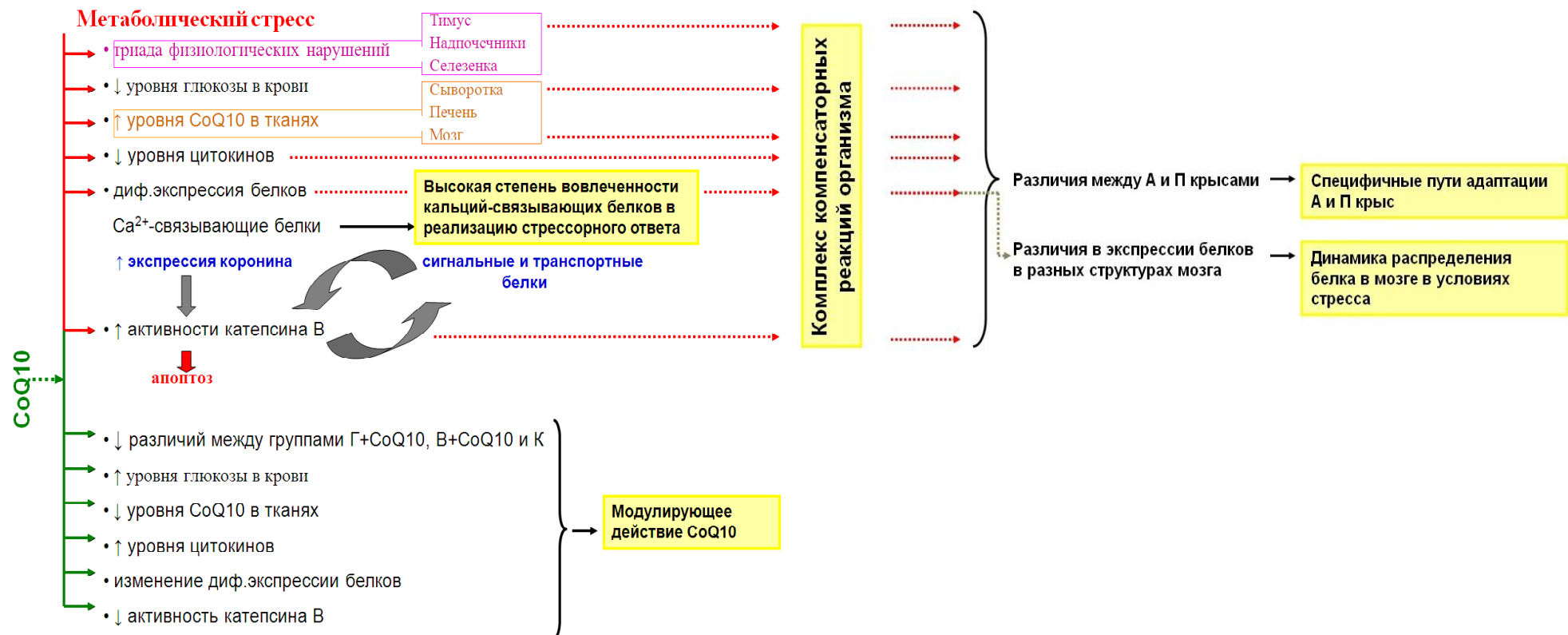
**Инт** – Интактные животные

**ИФН- $\gamma$**  – Интерферон- $\gamma$

**К** – Кора головного мозга

**М** – Миндалины

**РФ** – Ретикулярная формация



**Рисунок 2** – Схема функциональных взаимосвязей, выявленных между исследуемыми показателями органов-маркеров стресса, сыворотки крови, печени и ткани головного мозга крыс с различной поведенческой активностью в условиях метаболического стресса и при включении в рацион коэнзима Q10. Обнаруженные в период острой стрессорной нагрузки изменения, наблюдавшиеся в различных функциональных системах, демонстрируют запуск комплекса компенсаторных реакций организма, а различия в динамике показателей у поведенчески активных и пассивных крыс указывают на существование специфических путей адаптации к стрессу у животных с разными индивидуальнотипологическими особенностями. Анализ результатов протеомного исследования выявил участие кальций-связывающих белков в реализации стрессорного ответа. Установленные различия в экспрессии белков в эмоциогенных структурах мозга характеризует динамику их распределения в мозге в условиях стресса. Данные экспериментального исследования тех же показателей при введении в рацион животных коэнзима Q10 выявили его модулирующее действие на различных уровнях функционирования организма.

Для заметок

Для заметок