**ВЛИЯНИЕ ДИАДЕНОЗИН ТЕТРАФОСФАТА
НА ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ ИНСУЛИНА**
**DIADENOSINE TETRAPHOSPHATE EFFECT
ON THE FIBRIL FORMATION OF THE INSULIN MOLECULE**

Н. В. Богданова¹, К. Я. Буланова¹, Е. И. Квасюк¹, В. И. Степура², В. В. Саган¹
N. Bogdanova¹, K. Bulanava¹, E. Kvasuk¹, V. Stepuro², V. Sagan¹

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

²Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, г. Гродно, Республика Беларусь
tasha.bo@mail.ru

¹Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

²Grodno State University Y. Kupaly, Grodno, Republic of Belarus

В результате исследований представлены данные об эффективности влияния динуклеотидов на процессы фибриллообразования молекул инсулина. В экспериментах *in vitro* выявлено, что диаденозин тетрафосфат снижает процесс фибриллообразования, в следствии чего сохраняется большее количество функционально-активных молекул инсулина.

As a result of studies, data on the effectiveness of the influence of dinucleotides on the processes of fibrillation of insulin molecules are presented. *In vitro* experiments is revealed that diadenosine tetraphosphate reduces the process of fibrillation, as a result of which a greater number of functionally active insulin molecules are retained.

Ключевые слова: фибриллообразование, инсулин, агрегация, диаденозин тетрафосфат.

Keywords: non-insulin dependent diabetes, insulin resistance, insulin receptor, chaperones HSP72, expression, heat shock proteins.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-30-32>

В процессе фолдинга белки приобретают уникальную пространственную структуру, определяющую их биологическую активность. Однако, под воздействием различных внешних условий при образовании пространственной структуры в многоэтапном процессе биосинтеза белка в клетке могут возникать развернутые или неправильно свернутые, ненативные формы белков, склонные к агрегации. Кроме того, агрегацию можно наблюдать при различных стрессовых условиях, вызывающих повреждения трехмерной структуры и образование развернутых форм вновь синтезированных полипептидных цепей в результате мутаций, посттрансляционных модификаций, окислительных процессов, изменений окружающей среды (pH, температуры, УФ-облучения) [1]. Все эти факторы могут действовать как независимо друг от друга, так и одновременно. Белки теряют свою нативную структуру, что приводит к самоассоциации и формированию различных надмолекулярных структур: растворимых олигомеров, аморфных агрегатов и фибрилл [2]. Особенно это стало актуально, когда выяснилось, что неправильная укладка некоторых белков может стать причиной патологических агрегаций и приводить к развитию многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабета второго типа, Бокового амиотрофического склероза (далее – БАС) и др. [3].

Многие белки содержат амилоидподобные домены, которые наделяют белок свойствами близкими к прионам. Эти домены наделяют белки способностью переходить из развернутой пространственной структуры в промежуточные состояния, которые в свою очередь предрасположены к различным конформационным переходам, в том числе и образованию амилоидных фибрилл. Обычно такие белки находятся в динамическом равновесии между двумя формами: развернутыми растворимыми мономерами и подрасплавленными олигомерами. Эти подрасплавленные олигомеры могут быть вовлечены во множественные конформационные состояния. По одному сценарию они могут организоваться в структурированные амилоидогенные олигомеры, которые потом преобразуются в патологические агрегаты неамилоидного типа, или амилоидные фибриллы. Амилоидные агрегаты образуются, когда свернутые или несвернутые интермедиаты фолдинга взаимодействуют между собой, в основном, посредством контактов гидрофобных поверхностей, превращаясь в крупные и стабильные комплексы. Промежуточные структуры могут формироваться в процессе разворачивания или сворачивания белка. Способность к образованию агрегатов у фрагментов, образующихся в результате протеолитической деградации белков, зачастую выше, чем у белков-предшественников. Агрегаты белков характеризуются низкой растворимостью в воде или детергентах, устойчивостью к действию протеолитических ферментов и ненативной структурой. В таком состоянии белки теряют функциональную активность [4].

В связи с тем, что в мире проблема сахарного диабета возрастает с каждым годом и за последние 35 лет количество больных возросло до 422 миллионов, мы считаем актуальным исследовать молекулярные механизмы образования фибриллярных форм молекул инсулина, вследствие его большой склонности к агрегации и формированию фибрилл.

Процесс формирования фибриллярных молекул инсулина является нежелательным явлением при использовании инсулина в терапии. Инсулин, который используют для инъекций способен при различных внешних воздействиях формировать фибриллы. Так же, частое явление при получении, хранении, транспортировке инсулина – его спонтанная полимеризация. Агрегация инсулина в нерастворимые фибриллы может приводить к осложнениям у пациентов с диабетом, таким как снижение терапевтического эффекта инсулина, закупорка устройств доставки инсулина или потенциально повышенный иммунологический ответ. Образование фибрилл может влиять на гликемический контроль и снижать эффективность лечения. В связи с выше сказанным, следует указать, что такие соединения нуклеиновой природы, как диаденозинполифосфаты (Ar_nA) выступают в роли молекул –«алармонов», образующихся в клетках в ответ на повреждающее действие оксидантов или факторов теплового шока [5]. Известно, что при стрессовых ситуациях, температурных шоках в организме происходит массивный выброс алармона Ar_4A , повышающего устойчивость белковых молекул к инактивации и деградации. В целом, Ar_4A принимает участие в процессах восстановления, коррекции, защиты функционального состояния целого организма, отдельных его органов, структур и макромолекул. Так, Ar_4A обеспечивает коррекцию нарушенных функций при гипертензии, ишемической болезни, диабете, глаукоме, болезни Паркинсона и других видах патологии. Для Ar_4A , как для алармона, доказана возможность встраивания в гидрофобные полости белков с целью придания им структурно-функциональной устойчивости в условиях окислительного стресса, действия тяжелых металлов и повышенных температур [4].

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

Фибриллы из инсулина были получены путем его инкубирования в течении суток при температуре 50 °С. Инсулин взят в количестве 1мг на 1мл раствора Tris (трис) буфера pH=7.4 (для 50 °С).

Для контроля за процессом образования амилоидных фибрилл из инсулина был также использован ThT Бензотиазолиновый зонд. ThT широко используется в гистологическом анализе амилоидов *ex vivo* и *in vitro*. Этот зонд используется для определения поперечных сшивок β -слоя во время агрегации амилоидных фибрилл. При связывании ThT с фибриллой интенсивность флуоресценции может возрасти в 1000 раз. Измерение проводилось с помощью спектрофлуориметра CM2203 (ЗАО «СОЛАР», Беларусь). Для измерения брали 10 мкл пробы, 1 мл Tris, 1 мл дистиллированной воды и 10 мкл зонда. В качестве вещества, замедляющего образование фибрилл, использовали диаденозин тетрафосфат 10мкл, $10^{-3}M$.

Поскольку инсулин является гормоном, белковой природы, в клетках он находится в гексомерной форме, и в растворе отсутствуют шапероны и другие стабилизирующие вещества, инсулин был помещен в стрессовые для молекулы условия: температура 50 °С, механическое воздействие. Вследствие этого, молекулы инсулина утрачивают нативную структуру, переходя в амилоидную форму.

В ходе проведенных экспериментов было получено, что интенсивность флуоресценции, в пробе с инсулином, составляет $1,738 \pm 0,013$ относительных единиц (отн. ед.), после инкубирования в течение 24 часов и при температуре 50 °С.

Рисунок 1 – Спектр флуоресценции ThT в контрольной пробе

Известно, что в процессе фибриллообразования спиральные части молекул инсулина преобразуются в β -складчатые структуры. Можно полагать, что адениловые нуклеотиды будут способны к аллостерическим взаимодействиям с молекулой инсулина и затруднять доступность α -спиралей к преобразованию в β -складчатые структуры.

Для Ар₄А, как для алармона, доказана возможность встраивания в гидрофобные полости белков с целью придания им структурно-функциональной устойчивости в условиях окислительного стресса, действия тяжелых металлов и повышенных температур [4].

В представленных рисунках 1,2,3 приведены данные сравнительного анализа максимальных величин флуоресценции тиофлавина Т, обусловленных формированием максимального количества фибриллярных структур в контроле (1 мг инсулина/мл среды) и при введении 10 мкл 10⁻³М Ар₄А.

Интенсивность флуоресценции в контроле и при добавлении динуклеотида составляет 1,738±0,013 отн.ед. и 0,861±0,010 отн.ед соответственно, после инкубирования в течение 24 часов и при температуре 50 °С.

Рисунок 2 – Спектр флуоресценции ThT в инсулине с добавлением Ар₄А

Рисунок 3 – Интенсивность флуоресценции ThT в инсулине с добавлением Ар₄А

В ходе проведенного эксперимента было показано, что Ар₄А в концентрации 10⁻³м вызывал снижение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем в 2,02 раза.

Снижение интенсивности флуоресценции говорит о том, что количество образовавшихся фибрилл уменьшилось. Это значит, что процесс фибриллообразования был снижен; сохранилось большее количество функционально-активных молекул инсулина.

Исследования в этой области направлены на решение проблем сохранения структурно-функциональных свойств лекарственных форм инсулина при экстремальных механических, температурных воздействиях и в условиях продолжительного хранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Uversky, V. N. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded / V. N Uversky, A. L. Fink // Biochim Biophys Acta. 2004. – V. 1698. – P. 131-135.
2. Dobson, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation / C. M. Dobson // Semin Cell Dev Biol. 2004. – V. 15. – P. 3-16.
3. Doi, H. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases / H. Doi, Koyano [et al] // Neuroscience research. 2010. – V. 66 – P.131-133.
4. Довидченко, Н. В. Механизмы образования амилоидных фибрилл / Н. В. Довидченко, Е. И. Леонова, О. В. Галзитская // Успехи биологической химии, т. 54, 2014. – С. 203-230.
5. Brange, J. Toward understanding insulin fibrillation / J.Brange, L. Andersen, E. D. Laursen, G. Meyn, E. J. Rasmussen // Pharm. Sci. – 1997. – P. 517-525.

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ДОЗИМЕТРИЧЕСКОЙ ВЕРИФИКАЦИИ ПЛАНОВ ОБЛУЧЕНИЯ В ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ С МОДУЛЯЦИЕЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

CRITERIA FOR EVALUATING DOSIMETRIC VERIFICATION OF TREATMENT PLANS IN RADIATION THERAPY WITH MODULATION OF INTENSITY

А. И. Бринкевич, Е. В. Титович, М. Н. Петкевич
A. Brynkevich, E. Titovich, M. Piatkevich

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
annabrijerry@gmail.com*

Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Для проверки эффективности системы доставки дозы IMRT плана используются системы QA. Основным инструментом проверки соответствия между эталонным и оцениваемым распределением дозы является γ -индексирование. В процессе γ -индексирования сравниваются распределения дозы с геометрической точки зрения, оценивая смещение между эталонным и оцениваемым распределениями. Для проверки соответствия распределений используются понятия уровней действия и допусков. Уровни действия определяются как суммарный коэффициент, на который допускается отклонение показателей, проверяемых системой QA, без риска причинения вреда пациенту. Допуски определяются как границы, в пределах которых процесс считается работающим нормально. Использование описанной в докладе процедуры для установления уровней действия и допусков позволит медицинским физикам сравнивать процессы QA в разных учреждениях.

To test the effectiveness of the dose delivery system of the IMRT plan, QA systems are used. The main tool for checking compliance between the reference and estimated dose distribution is the γ -analysis. In the process of γ -analysis, dose distributions are compared from a geometric point of view, evaluating the displacement between the reference and estimated distributions. To check the conformity of distributions, the concepts of action limits and tolerances are used. Action limits are defined as the total coefficient by which the deviation of the indicators checked by the QA system is allowed, without the risk of harming the patient. Tolerances are defined as boundaries within which a process is considered to be operating normally. Using the procedures described in the report to establish action limits and tolerances will allow medical physicists to compare QA processes in different institutions.

Ключевые слова: лучевая терапия, IMRT, гарантия качества, верификация, γ -индексирование.

Keywords: radiation therapy, IMRT, quality assurance, verification, γ -analysis.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-33-36>

Критерии оценки результатов тестов, проводимых перед вводом в эксплуатацию лечебной техники и систем дозиметрического планирования хорошо известны [1]. Однако критерии приемлемости для процедур гарантии качества (далее – QA) плана лечения в лучевой терапии с модуляцией интенсивности (далее – IMRT) для конкретного пациента установить труднее из-за больших различий между системами планирования, системами доставки дозы и инструментами измерений [2].

Для проверки эффективности системы доставки дозы используются системы QA [3]. Уровни действия определяются как суммарный коэффициент, на который допускается отклонение показателей, проверяемых системой QA, без риска причинения вреда пациенту [2], а также предельные значения для случаев, когда потребуются клиническое действие. Примером такого уровня действия является решение не лечить пациента, если сравнение между измеренным значением дозы в точке и запланированным значением превышает предварительно определенный критерий приемлемости (например, 5%). Эти уровни будут зависеть от того, использует ли физик при анализе относительные или абсолютные значения доз и/или исключает области низких доз из анализа. Уровни действия должны быть установлены на основе клинических требований относительно приемлемости конкретного отклонения.

Допуски определяются как границы, в пределах которых процесс считается работающим нормально, т.е. подвержен только случайным ошибкам. Результаты за пределами допусков (или в случае быстрого движения к этим границам) указывают на то, что система отклоняется от нормальной работы. Результаты измерений, которые находятся за пределами допусков, должны быть исследованы, чтобы определить, может ли их причина быть идентифицирована и исправлена. Целью этого подхода является устранение проблем до того, как они достигнут клинически неприемлемых порогов. При использовании уровней действия и допусков предполагается, что был выполнен тщательный процесс ввода в эксплуатацию всех систем, влияющих на результат прохождения анализа. Этот подход может также идентифицировать ошибки, при которых существует неопределенность в отношении клинического действия превышения разрешенных допусков [4].