

РОЗДІЛ 3. ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН

УДК 615.225.2.065

ВПЛИВ ЦЕРЕБРОКУРИНУ, КОРТЕКСИНУ І ЦЕРЕБРОЛІЗИНУ НА МІТОХОНДРІЙ НЕЙРОНІВ, ПОШКОДЖЕНИХ НАДЛИШКОМ ЦИТОТОКСИЧНИХ ФОРМ NO IN VITRO

Беленічев І.Ф., д.б.н., професор, Жернова Г.А., м.н.с.

Запорізький державний медичний університет

У статті наведені дані про ступінь ефективності різних концентрацій нейропептидів при модельованому порушенні проникності мембран мітохондрій нейронів головного мозку шурів. Досліджено вплив препаратів цереброкурин, церебролізин, кортексин та тіотриазолін на відкриття особливих мітохондріальних пор. Цей процес супроводжувався набуханням мітохондрій, які знаходилися у середовищі зі вмістом іонів Ca^{2+} під впливом $\text{NO}^{\bullet}$ і його активних інтермедіатів. У якості донора $\text{NO}^{\bullet}$ було використано нітропруссид натрію. Нами встановлено, що препарати пептидергічної природи підвищують поріг чутливості мітохондрій до індукторів відкриття пор у їх мембранах. Це дає підставу розглядати транспортні та ферментативні системи мітохондрій як перспективні мішені дії нових типів нейропротекторних препаратів – мітопротекторів.

Ключові слова: нейропептиди, мітохондріальна пора, оксид азоту, нейродеструктивні захворювання.

Беленічев И.Ф., Жернова Г.А. ВЛИЯНИЕ ЦЕРЕБРОКУРИНА, КОРТЕКСИНА И ЦЕРЕБРОЛИЗИНА НА МИТОХОНДРИИ НЕЙРОНОВ, ПОВРЕЖДЕННЫХ ИЗБЫТКОМ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ФОРМ NO IN VITRO / Запорожский государственный медицинский университет, Украина

В статье наведены данные о степени эффективности различных концентраций нейропептидов при моделированном нарушении проницаемости мембран митохондрий. Изучено влияние препаратов цереброкурин, церебролизин, кортексин и тиотриазолин на открытие особых митохондриальных пор. Этот процесс сопровождался набуханием митохондрий, находящихся в Ca^{2+} -содержащей среде при воздействии $\text{NO}^{\bullet}$ и его активных интермедиатов на митохондриальные мембраны. В качестве донора $\text{NO}^{\bullet}$ был использован натриевый нитропруссид. Нами установлено, что препараты пептидергичной природы повышают порог чувствительности митохондрий к индукторам открытия пор в их мембранах. Это дает основание рассматривать транспортные и ферментативные системы митохондрий как перспективные мишени действия новых типов нейропротекторных препаратов – митопротекторов.

Ключевые слова: нейропептиды, митохондриальная пора, оксид азота, нейродеструктивные заболевания.

Belenichev I.F., Gernova G.A. INFLUENCE OF CEREBROCURINUM, CORTEXINE AND CEREBROLYSINE ON DAMAGE OF NEURONES' MITOCHONDRIUMS IN VITRO, CAUSED BY ABUNDANCE OF CYTOTOXICAL FORMS OF NO[•] / Zaporozhye state medical university, Ukraine

An influence of compounds cerebrocurinum, cerebrolysinum, cortexine and thiotriazoline on opening of special mitochondrial pores is studied. This process was accompanied by swelling of mitochondria, which were present in the Ca^{2+} -containing medium under action of $\text{NO}^{\bullet}$ and its active intermediates on the mitochondrial membranes. As a donor of $\text{NO}^{\bullet}$ sodium nitroprusside was utilized. In this article data about power of effectivity of different concentrations of neuropeptides under modeling of breaches of mitochondrium membranes permeability. We have arranged, that drugs of peptidergic nature increase the threshold of sensitivity of mitochondria to inductors of pores opening on their membranes. It gives us basis for consideration of transport and enzymatic systems of mitochondrium as a perspective target of action of new types of neuroprotective drugs – mitoprotectors.

Key words: neuropeptides, mitochondrial pore, nitrogen oxide, neurodestructive diseases.

ВСТУП

Спектр нейродеструктивних захворювань, в основі яких лежать порушення біоенергетичних процесів мітохондрій нейронів надзвичайно широкий і включає гостру недостатність мозкового кровообігу, черепномозкову травму, алкогольні енцефалопатії, нейроінфекції, родову травму, фетоплацентарну недостатність та ін. [1].

Мітохондрії є найважливішими внутрішньоклітинними структурами, що визначають долю нейронів при нейродеструктивних патологіях. Численні експериментальні дані вказують на те, що мітохондрії одними з перших зазнають патологічних впливів, що у більшості випадків обумовлено порушенням внутрішньоклітинного Ca^{2+} -балансу, надлишком $\text{NO}^{\bullet}$, вільних радикалів [2]. З'ясовано, що дисбаланс між продукцією активних форм кисню та азоту і антиоксидантними системами захисту клітини призводить до хронічного оксидативного стресу [3]. Останніми дослідженнями доведено, що зміна

проникності внутрішньої мембрани мітохондрій пов'язана з відкриттям мітохондріальної пори (МП). Цей мегаканал неспецифічної проникності відіграє важливу роль у порушеннях різних клітинних функцій [4]. Мітохондріальне набухання є характерною рисою формування мітохондріальної пори.

У фізіологічних умовах відкриття пори ініціюється сумісною дією таких чинників, як вільнорадикальні та пероксидні сполуки, в т.ч. активні форми кисню і азоту, інгібітори дихання і деполяризуючі агенти (відокремлювачі). Діючи погоджено, ці агенти сприяють відкриттю пори при патологічних станах клітин, що супроводжується їх Ca^{2+} -перенавантаженням, наприклад при інтрацеребральному крововиливі або ішемічному пошкодженні головного мозку [5, 6]. Таким чином, необхідність комплексної фармакологічної корекції не викликає сумніву. З цією метою використовуються різноманітні лікарські препарати (антиагреганти, тромболітики, нейропротектори, ноотропи, вазотропи, ангіопротектори, нейротрофічні чинники та ін.) [7]. Разом з тим, найважливішим завданням відміченої терапії слід вважати використання лікарських засобів з комплексним, багатобічним механізмом дії, здатних ефективно впливати на різні етапи порушення енергетичного обміну нейронів [8, 9]. У зв'язку з цим велика увага зараз приділяється вивченню властивостей низькомолекулярних нейропептидів. Ці сполуки вільно проходять через гематоенцефалічний бар'єр і багатосторонньо впливають на ЦНС, що супроводжується високою ефективністю та вираженою спрямованістю дії за умови їх дуже малої концентрації в організмі.

Особливістю структури нейропептидів є наявність декількох лігандних груп з'єднання, призначених для різних клітинних рецепторів [10]. На сьогодні недостатньо досліджено вплив індукторів відкриття МП у присутності препаратів пептидергічної природи. З цієї метою нами була досліджена мітопротективна активність церебралізину, цереброкурину та кортексину в умовах викликаного надлишком цитотоксичних форм $\text{NO}^{\bullet}$ пошкодження мітохондріальних мембран.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У досліджах використовували білих щурів лінії Вістар обох статей з масою тіла 190 - 230 гр. Усі експериментальні процедури здійснювали відповідно до «Положення про використання тварин у біомедичних дослідках» [11]. Щурів наркотизували тіопенталом натрію (40 мг/кг). Головний мозок ретельно промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl (3-4 °C), подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища (в ммоль): сахарози – 250, трис-HCl-буфера – 20, ЄДТА -1 (pH 7,4). Мітохондрії головного мозку виділяли методом диференціального центрифугування при температурі 4 °C. Для цього гомогенат центрифугували 7 хв. при 700 g. Потім супернатант центрифугували повторно 15 хв. при 11000 g. Отриманий осад мітохондрій суспендували у невеликому об'ємі середовища виділення, що не містить ЄДТА і зберігали на кризі при температурі від 0 °C до +1 °C.

Для проведення фармакологічних досліджень в інкубаційну суміш, що складається з: 120 ммоль KCl, 0,5 ммоль KH_2PO_4 , 2 ммоль глутамату, 1 ммоль малату, 20 ммоль трис-HCl-буфера (pH 7,4), вносили суспензію мітохондрій (1 мг/мл білка у пробі). Перед дослідом вносили досліджувані препарати (10 – 80 мкмоль у пробі) і інкубували 2 хв. Утворення МП визначали спектрофотометрично, як зниження поглинання світла при 540 нм, викликане набуханням мітохондрій.

Вивчення NO^- -індукованого відкриття мітохондріальних пор проводили, додаючи в інкубаційне середовище 20 мкмоль нітропрусида натрію і через 2 хвилини - 50 мкмоль Ca^{2+} (виявлено, що порогові концентрації Ca^{2+} та нітропрусида натрію, необхідні для відкриття пори, значно нижчі, і становлять 17-19 мкмоль для Ca^{2+} та 8-10 мкмоль для нітропрусида натрію, однак після ретельного дослідження впливу різних концентрацій Ca^{2+} та нітропрусида натрію нами відібрані найбільш оптимальний вміст цих речовин у інкубаційному середовищі мітохондрій для індукції відкриття МП).

Зниження оптичної густини, яке відповідає відкриттю МП у пробах, що не містять досліджуваних препаратів вважалось контрольним і приймалося за 100%. Мітопротективна активність досліджуваних препаратів визначалася по здатності речовини запобігати відкриттю МП, що реєструвалося спектрофотометрично ($\lambda=540$ нм) при 25 °C при постійному перемішуванні протягом 25 хвилин. Зміни оптичної густини (ΔA) суспензій, що містять досліджувані препарати в концентрації 10-80 мкмоль на 20-й хвилині набухання після дії на них індукторів МП порівнювали з ΔA контрольної суспензії.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням стандартного пакету аналізу програми статистичної обробки результатів версії Microsoft Office Excel 2003. Достовірність оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. При перевірці статистичних гіпотез нульову гіпотезу відхиляли при рівні значущості $p<0,05$.

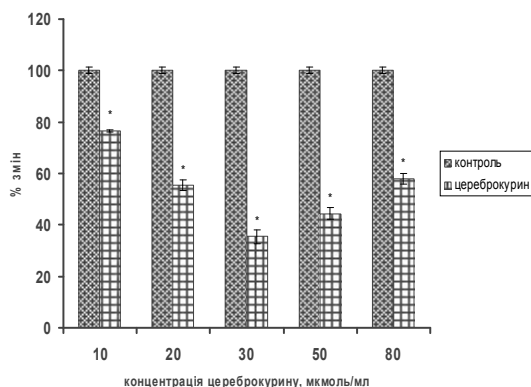
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для вивчення індукції відкриття МП під дією надлишку цитотоксичних форм $\text{NO}^{\bullet}$ в мітохондріях нейронів головного мозку щурів ми використали той факт, що утворення мітохондріальної пори характеризується зниженням поглинання світла суспензією, викликаним набуханням мітохондрій і виходом Ca^{2+} у позамітохондріальний простір (у середовище) після Ca^{2+} -перенавантаження органели.

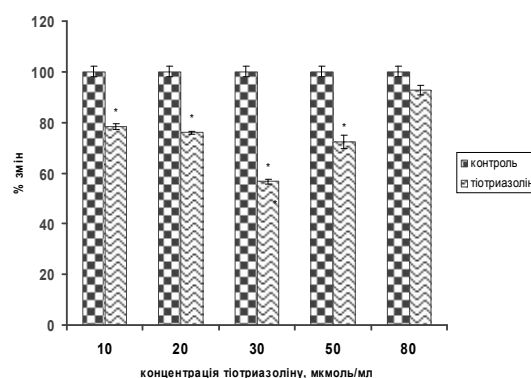
На ізольованих мітохондріях головного мозку щурів ми спостерігали, що попередня інкубація *in vitro* суспензії мітохондрій з препаратами пептидергічної природи за умов моделювання оксидативного стресу значно знижувала ступінь $\text{NO}^\bullet$ -індукованого набухання мітохондрій мозку щурів порівняно з такою за відсутністю нейропептидів.

У якості донора $\text{NO}^\bullet$ ми обрали нітропрусид натрію. Відомо, що $\text{NO}^\bullet$ в клітинах-мішенях утворює активні інтермедіати, такі як нітрозоній (NO^+), нітроксил ($\text{NO}^\bullet$) і пероксинітрит ($\text{ONOO}^\bullet$). У зв'язку з цим деякі дослідники вважають, що більшість цитотоксичних ефектів $\text{NO}^\bullet$ належать $\text{ONOO}^\bullet$. Можливо під дією $\text{NO}^\bullet$ і його більш агресивних форм у АТФ/АДФ-антипортері (білок внутрішньої мембрани мітохондрій) відбувається нітрування SH-групи Cys-56, що веде до перетворення цього переносника аденіннуклеотидів на неспецифічний канал, проникний для будь-яких низькомолекулярних речовин. Комплекс гігантської пори містить безліч мішеней для зовнішньої дії і регулюється безліччю ендогенних фізіологічних ефекторів. До їх числа можна віднести: оксид азоту, активні форми кисню; концентрація іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} , зміни мембранного потенціалу; концентрація аденінових нуклеотидів (АДФ, АТФ); піримідиновий редокс-статус, тіоловий редокс-статус; деякі пептиди; зміни у складі Bcl-2 комплексу [12].

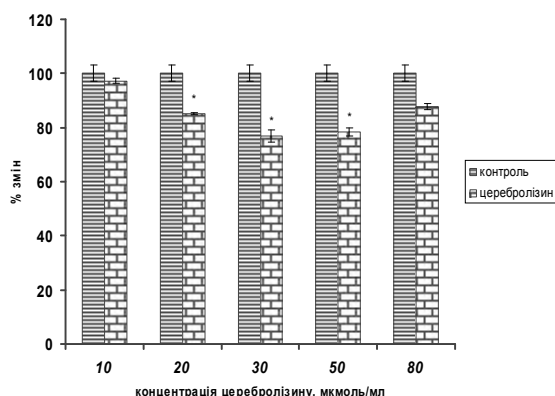
При дослідженні інтенсивності відкриття МП нами було встановлено, що найбільш ефективно цей процес пригнічувався у присутності цереброкуруну в концентрації 30 мкмоль/мл (Мал. 1). Величина ΔA у досліджених зразках склала 35,5% від контролю. Для препаратів тіотриазолін і церебролізин при тій самій концентрації вона склала 56,6% і 77% відповідно (Мал. 2,3). Кортексин найефективніше запобігає відкриттю МП у концентрації 50 мкмоль/мл. ΔA в даному випадку склала 49,9% від контролю, а при концентрації 30 мкмоль/мл - 78,3% від контролю (Мал. 4). При концентрації 30 мкмоль/мл дія всіх препаратів, що вивчаються, достовірно відрізняється.



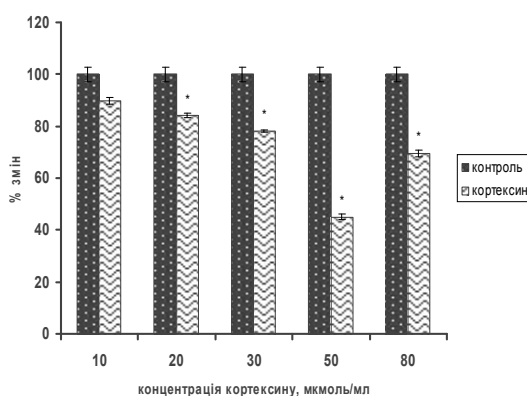
Мал. 1 Вплив різних концентрацій цереброкуруну на відкриття мітохондріальних пор
Примітка - * - зміни достовірні по відношенню до контрольної групи ($p < 0,05$)



Мал. 2 Вплив різних концентрацій тіотриазоліну на відкриття мітохондріальних пор
Примітка - * - зміни достовірні по відношенню до контрольної групи ($p < 0,05$)



Мал. 3 Вплив різних концентрацій церебролізину на відкриття мітохондріальних пор
Примітка - * - зміни достовірні по відношенню до контрольної групи ($p < 0,05$)



Мал. 4 Вплив різних концентрацій кортексину на відкриття мітохондріальних пор
Примітка - * - зміни достовірні по відношенню до контрольної групи ($p < 0,05$)

Найбільший ефект захисту мембран мітохондрій від пошкоджувальної дії цитотоксичних концентрацій $\text{NO}^\bullet$ показав цереброкурин (30 мкмоль/мл). Можливо це пов'язано з наявністю у складі препарату високоактивних регуляторних пептидів, що безпосередньо впливають на мембранні рецептори та на білки, що входять до складу порового комплексу. Можна також припустити, що препарат перешкоджає окисленню ендогенних піридинових нуклеотидів, а також пригнічує окислювально-відновні та вільнорадикальні реакції, що проходять у дихальному ланцюгу мітохондрій. У наших подальших дослідженнях ці припущення будуть вивчені більш детально. Препарат цереброкурин містить до того ж ряд гальмівних амінокислот, що особливо важливо для мітохондрій, які знаходяться у середовищі з глутаматом під впливом агресивних форм $\text{NO}^\bullet$.

Кортексин менш активно перешкоджає відкриттю мітохондріальних пор, хоча не треба недооцінювати його впливу на процес, що вивчається. Маючи у своєму складі комплекс гальмівних і збудливих амінокислот, а також ряд мінеральних речовин, кортексин впливає на ступінь відкриття мітохондріальних пор, можливо, через модуляцію активності мітохондріальних білків і ферментів. Так, наприклад, марганець активізує синтез мітохондріальної супероксиддисмутази; цинк – стабілізує функціонування ряду рецепторів на мембрані мітохондрій і т. д.

Що ж до церебраліну, то його активність відносно мітохондріальних пор менш істотна. Можливо це пов'язано з особливостями технології отримання препарату і ступенем активності пептидів, що входять до його складу.

Стосовно тіотриазоліну можна припустити, що тіольні групи препарату конкурують з SH-групами цистеїнозалежної ділянки АТФ/АДФ-антипортеру, білка внутрішньої мембрани мітохондрій, за АФК і піроксинітри, утворюючи з останніми стійкі комплекси. Цей процес має захисний вплив на мембрани мітохондрій і тим самим гальмує відкриття МП.

ВИСНОВКИ

В результаті досліджень *in vitro*, проведених на ізольованих мітохондріях головного мозку щурів було встановлено, що присутність в інкубаційному середовищі Ca^{2+} та $\text{NO}^\bullet$ індукує відкриття особливих мітохондріальних пор.

Внесення в інкубаційне середовище препаратів цереброкурин, церебралізин, кортексин, а також ноотропного препарату тіотриазоліну в концентраціях 10-80 мкмоль показало дозозалежну зміну величини $\text{NO}^\bullet$ -індукованого відкриття мітохондріальних пор.

Найбільш виражену мітопротективну дію показав препарат цереброкурин у концентрації 30 мкмоль/мл.

Препарати пептидергічної природи значно знижують чутливість мітохондрій до індукторів відкриття пор у їх мембранах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беленичев И.Ф. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином / И.Ф.Беленичев, Ю.М.Колесник, С.В.Павлов, А.В.Абрамов // Международный неврологический журнал. – 2008. - №4 (20). – С. 20-26.
2. Halestrap A.P., Kerr P.M., Javadov S., Woodfield K.Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. 1366, N 1-2. P. 79-94.
3. Беленичев И.Ф. Фармакологическая коррекция повреждений нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения / И.Ф.Беленичев, С.В.Горбачева, В.В.Дунаев, Н.В.Бухтиярова // Эксперим. и клинич. фармакология – 2007. – Т. 70, № 6. – С. 13 – 16.
4. Crompton M. // Biochem.J. 1999. 341. P. 233-249.
5. Акопова О.В. Индукция открытия митохондриальной поры под действием Ca^{2+} в миокарде крыс / О.В.Акопова, В.Ф.Сагач // Укр. біохім. журн., 2004. - Т. 76, № 1. – С. 48-55.
6. Залесский В.Н. Механизмы цитотоксических эффектов активных молекул кислорода и развитие апоптоза / В.Н.Залесский, Н.В.Великая // Совр. пробл. токсикол. —2003. —№1. —С. 11.
7. Сухоруков В.С. Врожденные дисфункции митохондриальных ферментов и их роль в формировании тканевой гипоксии и связанных с ней патологических состояний // В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Под ред. Л.Д. Лукьяновой и И.Б. Ушакова. – М.: Истоки, 2004. – С. 439-455.
8. Лукьянова Л.Д. Регуляторная роль митохондриальной дисфункции при гипоксии и ее взаимодействие с транскрипционной активностью / Л.Д. Лукьянова, А.М.Дудченко // Вестн. РАМН. – 2007. - №2. – С. 3-13

9. Dhar-Mascreano M., Sacramo J.M. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – V. 38. – № 10. – P. 1548-1554.
10. Виленский Б.С. Препараты нейротрофического действия в лечении инсульта. Качество жизни / Б.С.Виленский // Медицина. Болезни сердечно-сосудистой системы. – 2003. – № 2. – С. 53-56.
11. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // Експер. та клін. фізіол. Біохімія. – 2003. – 2003. – №2 (22). – С. 108-109.
12. Estevez A.G., Spear N., Pelluffo H., Kamaid A., Barberro L., Beckman J.S. – 1999. *Methods in Enzymology*. 301. P. 393-402.

УДК 57.043:577.11:612.014.464

ВОЗДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР И ОЗОНА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Белых И.А., к.б.н., доцент

Сакун А.В., к.б.н., начальник научно-исследовательской лаборатории

Национальный технический университет "Харьковский политехнический институт"

На основе анализа первых производных спектров собственной флуоресценции и активности холинэстеразы рассмотрен механизм влияния замораживания-отогревания водных растворов ХЭ на её структуру. Медленное замораживание-отогревание, вероятно, приводит к конформационным изменениям ХЭ на уровне четвертичной структуры, что сопровождается увеличением ферментативной активности. Экспериментально установлено, что воздействие озона в низких дозах на ХЭ после её медленного замораживания-отогревания не влечёт за собой изменения ферментативной активности.

Ключевые слова: холинэстераза, замораживание-отогревание, озон, флуоресценция.

Белых И.А., Сакун О.В. ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР І ОЗОНУ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ І СТРУКТУРУ ХОЛІНЕСТЕРАЗИ / Національний технічний університет "Харківський політехнічний інститут", Україна

На основі аналізу перших похідних спектрів власної флуоресценції й активності холинестерази розглянутий механізм впливу заморожування-відігрівання водних розчинів ХЕ на її структуру. Повільне заморожування-відігрівання, вірогідно, призводить до конформаційних змін ХЕ на рівні четвертинної структури, що супроводжується збільшенням ферментативної активності. Експериментально встановлено, що вплив озону в малих дозах на ХЕ після її повільного заморожування-відігрівання не спричиняє змін ферментативної активності.

Ключові слова: холинэстераза, заморозування-відігрівання, озон, флуоресценція.

Belykh I.A., Sakun A.V. LOW TEMPERATURE AND OZONE EFFECT ON ENZYMATIC ACTIVITY AND STRUCTURE OF CHOLINE ESTERASE / National Technical University "Kharkov Polytechnical Institute", Ukraine

Basing on the analysis of first derivatives of own fluorescence spectra and activity of choline esterase (CE) the mechanism of CE aqueous solutions freeze-thawing effect on its structure is considered. Slow freeze-thawing is believed to lead to conformation changes in CE on the quaternary structure level, followed by the increase in enzymatic activity. It was experimentally found that low dose ozone effect on CE after its slow freeze-thawing cause no changes in enzymatic activity/

Key words: choline esterase, freeze-thawing, ozone, fluorescence.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие криобиологии всегда было связано с поиском методов искусственной защиты клеток от повреждений при замораживании-отогревании. Открытие криопротекторов стало той отправной точкой, с которой началось практическое применение криогенных биотехнологий. Наряду с изучением криопротекторных методов защиты, проводились исследования способов повышения устойчивости клеток к процедуре криоконсервирования, эффект которых дополнял бы защитное действие криопротекторов и не основывался на коллигативных эффектах. Известен ряд веществ, которые, в зависимости от дозы, могут оказывать на клетки либо положительное, либо негативное действие. Например, токсичный (в больших дозах) газ NO может вырабатываться клетками и является вазодилатором [1]. Потенциально токсичный CO выделяется с билирубином при распаде гема [2, 3, 4],