

Биолог. журн. Армении, 3-4 (59), 2007

УДК 577.152.612

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА МЕТАБОЛИЗМ НЕЙТРАЛЬНЫХ ГЛИКОЛИПИДОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Л.М. ОВСЕПЯН, А.В. ЗАКАРЯН, О.М. АМИРХАНИЯН, Г.В. ЗАХАРЯН,
М.В. ЛЬВОВ, М.А. АГАНЯНИЦ

Институт молекулярной биологии НАН РА, 0014, Ереван

Исследовалось влияние препарата, в структуру которого входят цистеин и никотиновая кислота, на обмен нейтральных гликолипидов (ГалЦер и СГалЦер), а также на процесс перекисного окисления в норме и при гипоксии. Результаты исследований показали, что при гипоксии наблюдается уменьшение содержания отмеченных гликолипидов с параллельным увеличением содержания сфингозина, а также активированием свободнорадикальных реакций. Введение препарата приводит к нормализации изученных процессов. Антигипоксическое действие препарата обусловлено наличием в фармакологической структуре никотиновой кислоты и серы.

Ուսումնասիրվել է պատրաստուկի ազդեցությունը չեզոք գլիկոլիպիդների նյութափոխանակության վրա, ինչպես նաև գերօքսիդացման պրոցեսները նորմայում և հիպօքսիայի ժամանակ: Չեղացողությունների աղյուսները ցույց տվեցին, որ հիպօքսիայի ժամանակ դիտվում է նշված գլիկոլիպիդների քանակության նվազում, որը զուգորդվում է աֆինոզոգինի քանակության աճով և ազատ-ռադիկալային ռեակցիաների խթանմամբ: Պատրաստուկի ներառությունը կարգավորում է նշված պրոցեսները: Պատրաստուկի հակահիպօքսանտային ազդեցությունը պայմանավորված է նրա բաղադրության մեջ մտնող միկոտինաթթվի և ծծմբի պարունակությամբ:

The influence of a medicine consists of cysteine and nicotinic acid on the metabolism of neutral glycolipids (galactosylceramide and sulfogalactosylceramides) and lipid peroxidation under normal and hypoxia conditions has been studied. The results obtained have shown the decrease in the mentioned glycolipids during hypoxia conditioned by ligature of carotid artery. Besides that the free radical reactions activated. Application of the mentioned medicine is conditioned by the presence of a sulfur and nicotinic acid in its structure. Antihypoxant action of that medicine is conditioned by the presence of a sulfur and nicotinic acid in its structure.

Гипоксия - гликолипиды - перекиси липидов - головной мозг

Развитие гипоксического синдрома характерно для многих заболеваний головного мозга - инсультов, инфарктов, опухолей и при оперативном вмешательстве. В этой связи проблема поиска фармакологических веществ, проявляющих себя как антигипоксиканты, является весьма актуальной. Одним из основных критериев оценки степени ишемических повреждений является констатация биохимических нарушений, возникающих в результате кислородной недостаточности. Представляют интерес гликолипиды, участвующие почти во всех процессах, обуславливающих и поддерживающих

нормальный уровень клеточной активности. К ним относятся процессы клеточного узнавания, регуляции роста и дифференцировки клеток, рецепции гормонов и токсинов, а также иммуномодулирующие свойства [11]. Процессы гидролиза, ресинтеза и окисления гликолипидов обеспечивают динамическое равновесие обменных процессов в клеточных мембранах, нарушения которых лежат в основе развития патологических процессов.

Исходя из вышесказанного, представлялось интересным изучить качественное и количественное содержание нейтральных липидов — галактозилцерамидов (ГалЦер) и сульфогалактозилцерамидов (СГалЦер), продукта их гидролитического распада — сфингозина, а также процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) в головном мозге животных с гипоксией.

Материал и методика. В качестве лечебного препарата был использован препарат, созданный на основе никотиновой кислоты и аминокислоты цистеина. Стимулирующее влияние никотиновой кислоты обусловлено тем, что она входит в состав многих ферментов и коферментов. Цистеин принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях в клетке, проявляя антигипоксантажное действие. Опыты поставлены на беспородных белых крысах массой 180–200 г, разделенных на 3 группы: 1 — интактные; 2 — животные с воспроизведенной гипоксией; 3 — животные с гипоксией, получавшие препарат. Препарат вводили в дозе 5 мг/кг массы животного в течение 3-х дней. Последнее введение проводили за 1 ч до гипоксии. Гипоксию головного мозга вызывали одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий под эфирным наркозом (30 мин).

Экстракцию липидов проводили по методу Фолча. После промывки перхлорной, полно-метаноловой слой экстракта использовали для определения глицеролипидов, а нижний слой, содержащий хлороформ, для определения ГалЦер и СГалЦер. Смесь ГалЦер и СГалЦер выделяли из общего липидного экстракта, освобождали от фосфолипидов, хроматографировали в тонком слое силикагеля (пластины фирмы Мерк, Германия) в системе растворителей хлороформ:метанол:концентрированный аммиак (80:20:0,4). Количество ГалЦер определяли по углеводному компоненту реакции с резорцином, а СГалЦер — по сульфатной группе в реакции с азуром [7]. Для выделения сфингозиновых оснований ГалЦер и СГалЦер подвергали кислотному метанолизу смесью H₂SO₄-метанол (1:20) при температуре 78–80° в течение 6 ч, с последующей экстракцией сфингозиновых оснований диэтиловым эфиром. Количество сфингозина определяли цветной реакцией его с метилоранжем при длине волны 415 нм [13].

Об активности ПОЛ судили по количеству образования липидных конъюгатов, гидрокперекисей и малонового диальдегида. Содержание липидных конъюгатов оценивали по характерному для них поглощению при 232 нм [4], гидрокперекиси — по цветной реакции с тиошанатом аммония при максимальном поглощении 480 нм [4], малоновый диальдегид — по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [1]. Белок определяли методом Лоуриса [15]. Статистическую значимость результатов оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как показали результаты исследования (табл. 1), в головном мозге интактных животных выявлены две фракции ГалЦер и две фракции СГалЦер, различающиеся между собой содержанием жирных кислот. Известно, что ГалЦер преимущественно локализованы в миелине, тогда как СГалЦер определяются в немиелиновой части белого вещества [2]. Результаты наших исследований показали, что гипоксия головного мозга сопровождается уменьшением содержания как суммарного, так и фракционного состава ГалЦер и СГалЦер.

Изучение продуктов гидролитического распада указанных гликолипидов

позволило обнаружить увеличение содержания сфингозина, что, по всей видимости, является результатом активации сфингомиелиназ. Известно, что сфингозин и церамид являются вторичными мессенджерами, входящими в состав сфингомиелинового цикла, передающими внеклеточный сигнал с цитоплазмы в ядро [10]. Основным ферментом сфингомиелинового цикла являются кислая и нейтральная сфингомиелиназы. Указанные ферменты обнаружены практически во всех клетках, но наибольшее количество их содержится в миелиновой фракции головного мозга. Установлено, что при действии на клетку HL-601L фактора некроза опухоли, α - γ -интерферона и интерлейкина происходит активация нейтральной сфингомиелиназы, которая сопровождается накоплением церамида [12, 14, 16], в дальнейшем превращающегося в сфингозин, который в свою очередь подвергается фосфорилированию, либо метилированию [5]. Именно накопление церамида и сфингозина является определяющим в регуляции функциональной активности нормальных клеток или в развитии патологических состояний. В литературе имеются данные [16] о том, что сфингозин и церамид могут имитировать клеточные эффекты цитокинов, в конечном клеточном ответе - дифференцировку, апоптоз и остановку клеточного цикла. В последнее время появились данные о зависимости активности основного фермента сфингомиелинового цикла - сфингомиелиназы от уровня окислительных процессов в клетке [6].

Таблица 1. Содержание сульфолактозилцерамидов, галактозилцерамидов и сфингозина в мозговой ткани при гипоксии (n=7)

	Контроль		Гипоксия ¹		Препарат ²	
	мг/г	% от суммы	мг/г	% от суммы	мг/г	% от суммы
СГалЦер-1	1.26±0.09	7.66	0.85±0.11 p < 0.02	8.72	1.18±0.08 p < 0.02	8.07
СГалЦер-2	1.4± 0.12	8.52	0.92±0.08 p < 0.01	9.44	1.38± 0.09 p < 0.01	9.43
ГалЦер-1	6.51±0.4	39.62	4.12±0.32 p < 0.001	42.29	5.51±0.23 p < 0.002	37.68
ГалЦер-2	7.16±0.38	44.18	3.85±0.27 p < 0.001	39.5	6.55±0.4 p < 0.001	44.5
Сумма галактолипидов	16.43		9.54		14.62	
Содержание сфингозина, мг/г	3.23±0.53		4.54±0.25 p < 0.01		3.62 ± 0.18 p < 0.01	

Примечание: ¹ - приводится достоверность отличий по сравнению с контролем.

² - приводится достоверность отличий от данных, полученных при изучении животных с гипоксией, не получавших препарат.

В этой связи нами проведено исследование для определения содержания продуктов ПОЛ в головном мозге животных, подвергнутых гипоксии. Гипоксия сопровождается активированием процесса ПОЛ, что выражается

увеличением содержания диеновых конъюгатов, гидроперекисей и малонового диальдегида (МДА) (табл. 2).

Таблица 2. Содержание продуктов ПОЛ в головном мозге животных с гипоксией (n=7)

	Контроль	Гипоксия	Введение препарата
Диеновые конъюгаты, нмоль/мг белка	1.63 ± 0.2	3.8 ± 0.23 $p < 0.001$	1.76 ± 0.18 $p < 0.001$
Гидроперекиси E_{500} , нмоль/мг белка	0.55 ± 0.02	0.91 ± 0.032 $p < 0.001$	2.5 ± 0.08 $p < 0.001$
МДА, нмоль/мг белка	5.8 ± 1.2	10.3 ± 1.4 $p < 0.001$	7.0 ± 1.3 $p < 0.001$

Примечание: ¹ - приводится достоверность отличий по сравнению с контролем.

² - приводится достоверность отличий от данных, полученных при изучении животных с гипоксией, не получавших препарат.

Введение препарата животным с экспериментально вызванной гипоксией приводит к частичному уменьшению содержания продуктов ПОЛ, что может служить доказательством способности препарата как антиоксиданта подавлять окислительные процессы в клетке. В настоящее время в литературе появились доказательства регуляции активности кислой и нейтральной сфингомиелиназ природными антиоксидантами [8] и содержанием глутатиона [9]. Изучение количественного состава нейтральных гликолипидов и сфингозина при введении препарата позволило обнаружить частичную нормализацию содержания указанных гликолипидов. Нам представляется, что введение животным с гипоксией производных цистеина, который принимает участие в синтезе глутатиона, одного из основных компонентов ферментов антирадикальной защиты клетки — глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы способствует проявлению антигипоксических свойств препарата. Исследование препарата, отличающегося близостью к продуктам, синтезирующимся в организме, обеспечивает фармакологическую эффективность и низкую токсичность. Синтезированный препарат может быть применен при различных патологических состояниях, характеризующихся нарушением окислительных процессов, в связи с чем представляет определенный научно-практический интерес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972.
2. Крекс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л., Наука, 1981, 338.
3. Раманова Л.А., Стальная И.Д. В кн.: Современные методы исследования. М., Наука, 1977.
4. Стальная И.Д. Там же.
5. Футерман А.Х. Биохимия. 63. вып.1, 89-100, 1998.

6. Цюпко А.Н., Дудник Л.Б., Евстигнеева Р.Б. Биохимия. 66, 1263-1270, 2001.
7. Чаева Л.С. В кн.: Методы биохимических исследований. 85-100 (под ред. Прохоровой) Л., Из-во ЛГУ. 1982.
8. Denisova N.A., Fischer R.D., Provost M. Free Rad. Med., 27, 1292-12301, 1999.
9. Dudnik L.B., Zyupko A.N. Chemistry and Physics of Lipids. 110, 123-124, 2001.
10. Hannun Y.A., Bell R.M. Science. 243, 500-506, 1989.
11. Hannun Y. J.Biol.Chem. 269, 3125-3128, 1994.
12. Kim M.Y., Linardik C., Obeid L., Hannun Y. J.Biol.Chem. 266, 1, 484-489, 1991.
13. Lauter C.J., Trams E.G. J Lipid Res. 3, 136-138, 1962.
14. Liu B., Hassler D.F., Smith G.A. J Biol.Chem. 273, 34472-34479, 1998.
15. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.J. J Biol.Chem. 193, 265-275, 1951.
16. Okazaki T., Bell R.M., Hannun Y. J.Biol.Chem. 264, 19076-19080, 1989.

Получена 16.VII 2007