

УДК 577.613

Стабилизирующий эффект плодов *Goji* на клеточные мембраны спинного мозга крыс при оксидативном стрессе, индуцированном фруктозой

Р. М. Симонян *, Л. Г. Аветисян **, Г. М. Симонян *,
К. В. Симонян **, Р. А. Аветисян **,
М. А. Симонян *, В. А. Чавушян **

* Институт биохимии им.Г.Х. Бунятыана НАН РА

** Институт физиологии им.Л.А.Орбели НАН РА
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22

Ключевые слова: NADPH оксидаза, плоды *Goji*, фруктоза, спинной мозг

Интенсивное потребление диетической фруктозы повышает степень заболеваемости метаболическим синдромом [14]. Оксидативный стресс – один из молекулярных механизмов метаболических дефектов организма, индуцированных фруктозой. Показана ключевая роль оксидативного стресса в условиях обогащенной фруктозой диеты у людей [20] и животных [9].

Новые взгляды на метаболические последствия богатых фруктозой диет обусловлены данными относительно влияния фруктозы на нервную ткань (увеличение активных форм кислорода и воспалительных процессов) [7]. При оксидативном стрессе различного характера в подавляющем большинстве наблюдается повышение уровня супероксидных радикалов (O_2^-) и их производных в клеточных формированиях мозговой ткани млекопитающих. В физиологических количествах O_2^- и его производные играют важную роль при регуляции процесса нейрональной сигнализации, а при повышенных концентрациях – вызывают нейротоксичность и нейродегенерацию [12]. В процессе развития спинного мозга физиологическая элиминация мотонейронов также регулируется реактивным кислородом [18]. При диабете, индуцированном стрептозотоцином, нейропатическая боль в спинном мозге крыс снижается путем подавления O_2^- -продуцирующей активности NADPH оксидазы (Nox), с соответствующим снижением фона оксидативного стресса [23]. Показана роль активированной спинальной Nox в болевой гиперчувствительности и механической аллодинии при нейропатии [6], а также взаимосвязь нейронального Nox и цитоскелетного актина конуса роста нервного волокна [16].

Антиоксиданты и сенситизаторы инсулина эффективны для предотвращения большинства аномалий, вызванных фруктозой. Отмечается обширный рост использования растительных препаратов при оксидативном стрессе, вызванном диетами с высоким содержанием фруктозы [17]. Современные фармакологические эксперименты доказывают, что полисахариды плодов *Goji* проявляют антиоксидантную, иммуномодуляторную, нейтропротекторную и антидиабетическую активность [13].

Целью работы явилось определение оптических спектральных показателей, удельного содержания, удельной NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности фракций изоформ Nox, выделенных из спинного мозга крыс при оксидативном стрессе, индуцированном фруктозой, и при применении плодов *Goji* в тех же условиях.

Материал и методы

В первой опытной группе (ОГ-1) у белых половозрелых крыс-самцов ($n=6$, массой 230-250г) вызывали оксидативный стресс путем подачи с питьевой водой 50% диетической фруктозы в течение девяти недель. Во второй опытной группе (ОГ-2) наряду с фруктозой животные ($n=6$) с пищей получали сухие плоды *Goji* (с 6-й по 9-ю недели от начала экспериментов ежедневно по 330 мг/кг). В контрольной группе (К) интактные животные ($n=6$) содержались на питьевой воде и стандартном корме.

Использованы высушенные плоды *Goji* (*Lycium barbarum*), выращенного методом открытой гидропоники в Институте проблем гидропоники им. Г.С.Давтяна НАН РА [11].

Выделение комбинированной фракции изоформ Nox из спинного мозга. Для изъятия спинного мозга на 9-й неделе животные были декапитированы в глубоком наркотическом сне (нембутал 45 мг/кг в/б).

Для получения антител против Nox используется детергент и ультразвук, которые в некоторой степени денатурируют этот фермент [1, 2]. Для предотвращения такой денатурации было исключено применение детергента и ультразвука: разработан простой способ выделения фракции комбинированных изоформ или одной изоформы Nox из клеточных и внутриклеточных мембран и мембранных формирований наночастиц – экзосом млекопитающих. При этом было использовано открытое недавно явление гемоглобининдуцирующего избирательного отщепления (рилизинга) Nox из перечисленных биомембран [3]. Комбинированную фракцию изоформ Nox из тканей спинного мозга (1 г) выделяли указанным лицензированным способом, используя явление избирательного комплексообразования между ферри- или феррогемоглобином (5-10 мкМ) с изоформами Nox, локализованными в мембранах клеток, мембранах внутриклеточных формирований, плазматических мембранах, а также в мембранных формированиях наночастиц – экзосомах сыворотки крови [3]. Гомо-

генизацию тканей (1 г в 20 мл воды) осуществляли стеклянным гомогенизатором с тефлоновым пестиком в течение 2 мин при 4°C и 1000 об/мин. К гомогенизатам добавляли свежий ферригемоглобин из гемолизата эритроцитов человека и инкубировали при 37°C и pH 7,4-8 в течение часа. Далее инкубационные смеси, pH 5,6, центрифугировали при 10 000 x g в течение 10 мин. Надосадочные растворы разбавляли водой (20-25 раз) и подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 ("Whatman", Англия). Фракции комбинированных изоформ Nox или отдельных изоформ Nox из колонок с DE-52 элюировали 0,1 М калий-фосфатным буфером (КФБ), pH 7,4.

NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox определяли методом нитротетразолиевого синего. За единицу O_2^- -продуцирующей активности изоформ Nox принимали количество этого фермента, которое на 50% стимулирует образование формазана при восстановлении нитротетразолиевого синего супероксидными радикалами [19]. Удельную NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox определяли в расчете на 1 г ткани (ед/г).

Расчетное удельное содержание комбинированных изоформ Nox определяли по плотности характерного максимального оптического поглощения (в оптических единицах – «ое») при 530 нм (β – полоса поглощения) для 1 мл Nox, выделенного из 1 г тканей.

Опыты повторялись 6 раз. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности «р». В ходе работ были использованы центрифуги К-24 («Janetski», Германия) и спектрофотометр «Hitachi – 2000», Япония).

Результаты и обсуждение

Фракции изоформ Nox (семейство Nox: 22 phox, 91 gphox, 40phox, 47 phox, 67 phox), выделенные из спинного мозга крыс группы К, ОГ-1 и ОГ-2 отличаются по оптическим спектральным индексам (A_{412}/A_{360} и A_{412}/A_{530}), как это показано в табл. 1. Величины оптических спектральных индексов (отношения A_{412}/A_{360} и A_{412}/A_{530}), приведенных Nox в К, ОГ-1 и ОГ-2, существенно отличаются от таковых у Nox из других тканей, в частности из легких крыс, за счет увеличения плотности оптического поглощения при 350-360 нм, как результат повышения содержания флавинадениндинуклеотида (ФАД) в молекуле Nox [10, 21]. Как показано в табл. 1, по сравнению с показателями группы К в ОГ-1 наблюдается неадекватное снижение оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{360} и A_{412}/A_{530}) суммарной фракции изоформ Nox из клеточных компонентов спинного мозга. С другой стороны, под влиянием применения *Goji* в ОГ-2 эти показатели приближаются к показателям группы К. Известно, что

изоформы Nox являются ФАД-содержащими гемопротеинами – цитохромами b_{558} , при этом ФАД играет роль активатора Nox, как источника электронов [5, 10, 21].

Таблица 1

Оптические спектральные индексы отношения A_{412}/A_{360} (1) и A_{412}/A_{530} (2) суммарной фракции изоформ Nox, выделенных из спинного мозга крыс указанных групп ($M \pm m$; $n=6$; $p<0,05$)

Ткань	К		ОГ-1		ОГ-2	
	1	2	1	2	1	2
Спинной мозг	$1,75 \pm 0,4$ ($p=0,005$)	$7,23 \pm 0,3$ ($p=0,003$)	$1,52 \pm 0,5$ ($p=0,01$)	$7,12 \pm 0,6$ ($p=0,005$)	$1,73 \pm 0,1$ ($p=0,005$)	$7,22 \pm 0,2$ ($p=0,001$)

На этом фоне изменение расчетного удельного содержания и NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности комбинированной фракции изоформ Nox в К, ОГ-1 и ОГ-2 происходит также неадекватным образом (табл. 2).

По сравнению с показателями группы К, в ОГ-1 наблюдается существенное повышение уровня отщепленных изоформ Nox и их NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности. В ОГ-2 под влиянием применения *Goji* эти данные приближаются к показателям группы К (табл. 2).

Указанным способом [3] из тканей спинного мозга получают суммарные (комбинированные) фракции изоформ мембранных Nox, с которыми гемоглобин избирательно образует нестабильный комплекс, отщепляя их из гетерогенной фазы (из мембран клеток или цитоплазматических мембран) в гомогенную фазу (в раствор). Отщепленные этим путем изоформы Nox более нативные, чем те, которые получают с использованием детергента.

При индуцированном фруктозой оксидативном стрессе у крыс *Goji* путем снижения повышенного уровня O_2^- играет антистрессорную, мембраностабилизирующую роль, снижая степень рилизинга изоформ Nox из клеток спинного мозга, а также снижает мембранодестабилизирующий эффект экстраэритроцитарного гемоглобина (ферригемоглобина или феррогемоглобина) в ткани спинного мозга.

Таблица 2

Расчетное удельное оптическое поглощение суммарной фракции изоформ Nox спинного мозга в оптических единицах (1) и расчетная удельная NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность суммарной фракции изоформ Nox (ед/г ткани) (2) в указанных группах ($M \pm m$; $n=6$; $p<0,05$)

Ткань	К		ОГ-1		ОГ-2	
	1	2	1	2	1	2
Спинной мозг	$1,0 \pm 0,04$ ($p=0,001$)	$50,5 \pm 5,3$ ($p=0,01$)	$1,40 \pm 0,2$ ($p=0,005$)	$68,8 \pm 6,7$ ($p=0,003$)	$1,1 \pm 0,2$ ($p=0,003$)	$59,4 \pm 4,1$ ($p=0,002$)

Увеличение удельного содержания отщепленной суммарной фракции изоформ Nox тканей спинного мозга в ОГ-1 ассоциировано с повышением липидной пероксидации этих тканей [8]. Этим путем повышается доступ гемоглобина к Nox, локализованной на поверхности мембран, увеличивается степень комплексообразования с гемоглобином и уровень отщепления Nox [4]. *Goji* оказывает мембраностабилизирующий эффект на клетки спинного мозга, предотвращая мембранодестабилизирующий эффект внеэритроцитарного гемоглобина, вытекающего из эритроцитарных мембран при повреждениях ткани спинного мозга.

Увеличение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ фракции Nox, отщепленной из спинного мозга, в ОГ-1 по сравнению с показателями Nox группы К связано с повышением уровня ФАД (увеличение плотности максимального оптического поглощения при 350-360 нм или снижение оптического спектрального индекса A_{412}/A_{360} на оптическом спектре поглощения фракции изоформ Nox). Фактически ФАД, являясь активатором для Nox [5, 10, 21] других тканей, выполняет ту же функцию и в спинном мозге. Другим фактором активации Nox может быть повышение степени фосфорилирования, поскольку имеются данные о повышенном уровне фосфорилирования Nox, отщепленных из ряда тканей ЦНС [12]. Как результат этого, в ОГ-1 наблюдается увеличение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности фракций изоформ Nox, отщепленной из спинного мозга (на 15%).

С тех пор как игнорирование физиологического значения реактивного кислорода привело к неудовлетворительным клиническим результатам, классическая антиоксидантная терапия пересматривается: более оправданным и приемлемым подходом могут быть натуральные селективные ингибиторы Nox [15]. При этом немаловажно, что в ткани спинного мозга нейропротекторный и иммунорегуляторный эффект плодов *Goji* взаимосвязаны [22].

Можно заключить, что *Goji* подавляет релизинг суммарной фракции изоформ Nox из ткани спинного мозга, с регуляцией NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности этого фермента, проявляя мембраностабилизирующий эффект путем подавления мембранодестабилизирующего воздействия гемоглобина. Полученные данные о подавлении плодами *Goji* индуцируемого ферригемоглобином релизинга изоформ NADPH оксидазы из мембран клеток спинного мозга указывают на проявление мембраностабилизирующего эффекта, ассоциируемого с защитой от тканевого оксидативного стресса.

Авторы выражают благодарность Оганнисян Л.Э. (Институт проблем гидропоники им.Г.С.Давтяна НАН РА) за предоставление плодов Goji

Поступила 24.03.16

Ֆրուկտոզով հարուցված օքսիդացնող սթրեսի ժամանակ *Goji*-ի պտուղների կայունացնող ազդեցությունը առնետների ողնուղեղի բջջաթաղանթների վրա

**Ռ. Մ. Սիմոնյան, Լ. Գ. Ավետիսյան, Գ. Մ. Սիմոնյան, Կ. Վ. Սիմոնյան,
Ռ. Ա. Ավետիսյան, Մ. Ա. Սիմոնյան, Վ. Ա. Չավուշյան**

Ֆրուկտոզով հարուցված (9 շաբաթ շարունակ ստանալով 50% դիետիկ ֆրուկտոզ խմելու ջրի հետ) օքսիդացնող սթրեսի ժամանակ առնետների մոտ նկատվում է ողնուղեղից անջատված NADPH օքսիդազի իզոֆորմի ֆրակցիաների NADPH կախյալ O_2^- -ի առաջացման ակտիվության մեծացում (15%): Ֆրուկտոզով հարուցված օքսիդացնող սթրեսի ժամանակ *Goji*-ի պտուղների օգտագործումը (6-9 շաբաթում օրական մինչև 330 մգ/կգ) ողնուղեղի հյուսվածքում ճնշում է NADPH օքսիդազի իզոֆորմի գումարային ֆրակցիայի արտազատումը: *Goji*-ի պտուղները պաշտպանում են ողնուղեղի բջջաթաղանթները լիպիդային պերօքսիդացման ակտիվ խթանիչների՝ գերօքսիդների և հիդրօքսիլ ռադիկալների վնասակար ազդեցությունից: Ենթադրվում է, որ *Goji*-ի պտուղները NADPH օքսիդազի ընտրողական արգելակիչներ են:

Stabilizing effect of *Goji berries* on cell membrane in the rat spinal cord in fructose-induced oxidative stress

R. M. Simonyan, L. G. Avetisyan, G. M. Simonyan, K. V. Simonyan, R. A. Avetisyan, M. A. Simonyan, V. A. Chavushyan

We have found increased (15%) NADPH dependent O_2^- -producing activity of fractions of NADPH oxidase isoform released from the spinal cord in fructose-induced (obtained with drinking water dietary fructose (50%) for 9 weeks) oxidative stress in rats. Administration of *Goji berries* (330 mg/kg daily for 6-9 weeks) in fructose-induced oxidative stress inhibits the release of total fractions of NADPH oxidase isoform from the spinal cord. *Goji berries* protect the spinal cord cell membrane from damage by superoxide and hydroxyl radicals which initiate lipid peroxidation in cellular membranes. It is assumed that *Goji berries* are a selective NADPH oxidase inhibitor.

Литература

1. Мелконян Л.Г., Симонян Р.М., Секоян Э.С., Симонян М.А. Изменение NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности цитохрома b_{558} из мембран клеток селезенки и эритроцитов, индуцированных излучением различной природы. ДНАН РА, 2009, т. 109(3), с. 225-235.
2. Симонян М.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М. Цитохром b_{558} из сыворотки крови и мембран эритроцитов: выделение, очистка и краткие характеристики. Биохимия, 1995, т. 60(12), с. 1977-1987.
3. Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А. Способ выделения изоформ NADPH оксидазы (Nox) из биосистем. Лицензия изобретения агентства индивидуальной собственности РА N2818 А, Ереван, 2014.
4. Фесчан С.М., Симонян Р.М., Саргсян А.С., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. α -Токоферол подавляет рилизинг изоформ NADPH оксидазы из мембран клеточных компонентов тканей крыс. Вopr.теорет.клин.мед., 2013, т. 16(1), с. 36-39.
5. Case Ch.L., Rodriguez J.R., Mukhopadhyay B. Characterization of an NADH oxidase of the flavindependent disulfide reductase family from *Methanocaldococcus jannaschii*. Microbiology, 2009, 155, p. 69-79.
6. Choi Sh.R., Roh D.H., Yoon S.Y. et al. Spinal sigma-1 receptors activate NADPH oxidase 2 leading to the induction of pain hypersensitivity in mice and mechanical allodynia in neuropathic rats. Pharmacological Research, Aug 2013, Vol. 74, p. 56-67.
7. Dekker M.J., Su Q., Baker C., Rutledge A.C., Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and metabolic syndrome. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2010, 299, p. 685-694.
8. Devasagayam T.P.A., Kamat J.P., Hari M., Kesavan P.C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1996, 1282, 1, p. 63-70.
9. Fariña J.P., García M.E., Alzamendi A. et al. Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. Clin. Sci. (Lond), 2013 Jul 1, 125(2), p. 87-97.
10. Hashida Sh., Yuzawa S., Suzuki N.N. et al. Binding of FAD to Cytochrome b_{558} Is Facilitated during Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase, Leading to Superoxide Production. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279, p. 26378-26386.
11. Hovhannisyan L.E., Hovsepyan G.Y. Introduction of Matrimony vine (*Lycium barbarum*) to Armenia. Bulletin of National Agrarian University of Armenia, 2014; 3, p. 5-8.
12. Infanger D.W., Sharma R.V., Davisson R.L. A Forum Review NADPH Oxidases of the Brain: Distribution, Regulation, and Function. Antioxid. Redox Signal, 2006, 8-10, p. 1583-1596.
13. Jin M., Huang Q., Zhao K., Shang P. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. Int. J. Biol. Macromol., 2013; 54, p. 16-23.
14. Le K.A., Tappy L. Metabolic effects of fructose. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2006, 9, p. 469-475.
15. Maraldi T. Natural Compounds as Modulators of NADPH Oxidases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013, p.10.
16. Munnamalai V., Weaver C.J., Weisheit C.E. et al. Bidirectional interactions between NOX2-type NADPH oxidase and the F-actin cytoskeleton in neuronal growth cones. Journal of Neurochemistry, Aug 2014, Vol. 130, 10, p. 526-540.
17. Rasineni K., Desireddy S. Preventive effect of *Catharanthus roseus* (Linn.) against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in male Wistar rats. Journal of Diabetes Mellitus, 2011, Vol.1, 3, p. 63-70.
18. Sánchez-Carbente M.R., Castro-Obregón S., Covarrubias L., Narváez V. Motoneuronal death during spinal cord development is mediated by oxidative stress. Cell Death and Differentiation, 2005, vol. 12, 3, p. 279-291.

19. *Simonyan R.M., Galoyan K.A., Hachatryan A.R. et al.* Ferrihemoglobin induces the release of NADPH oxidase from brain- membrane tissue ex vivo: the suppression of this process by galarmin. *Neurochemical Journal*, 2013, 7(3), p. 221-225.
20. *Stanhope K.L., Schwarz J.M., Keim N.L. et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119, p. 1322-1334.
21. *Yoshida L.S., Saruta F., Yoshikawa K., Tatsuzawa O., Tsunawaki S.* Mutation at histidine 338 of gp91 (phox) depletes FAD and affects expression of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(43), p. 27879-27886.
22. *Zhang Y.K., Wang J., Liu L., Chang R.C., So K.F., Ju G.* The effect of Lycium barbarum on spinal cord injury, particularly its relationship with M1 and M2 macrophage in rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2013; 22, 13:67.
23. *Zhao W.Ch., Zhang B., Liao M.J. et al.* Curcumin ameliorated diabetic neuropathy partially by inhibition of NADPH oxidase mediating oxidative stress in the spinal cord. *Neuroscience Letters*, 2014, 560, p. 81-85.