

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 616.636.547

**Сравнительное ингибирующее действие
 β -гетероциклически замещенного аналога
 α -аминомасляной кислоты и мексидола
на процесс рилизинга изоформ NADPH-оксидаз
нейрональных мембран**

Л.Ю. Саакян

*Ереванский государственный университет, Институт фармации
0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1*

Ключевые слова: аналог α -аминомасляной кислоты, мексидол, нейрональные мембраны, рилизинг, изоформы NADPH-оксидаз

В рамках современных представлений о наличии у хиральных небелковых аминокислот многочисленных проявлений биологической активности [11,12,14] значимы результаты исследований, выявивших у β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты – β -14-АМК, антиоксидантной активности, лежащей в основе ее мембраностабилизирующего действия. В частности, установлено, что гетероциклически замещенные аналоги 2-аминомасляной кислоты подавляют ферриНб-индуцируемый рилизинг суммарной фракции изоформ NADPH-оксидазы (Nox1+Nox2) из клеточной и субклеточных мембран [4,5]. Выявление указанного эффекта выдвинуло необходимость изучения антиоксидантной активности и ингибирующего действия β -14-АМК на изолированные мембраны нейронов (*плазматическую, ядерную и митохондриальную*). В качестве препарата сравнения был избран мексидол, обладающий, как и β -14-АМК, антиоксидантной активностью и мембраностабилизирующим действием [1-3]. Для более детального исследования были определены и сопоставлены значения удельной антиоксидантной активности приведенных соединений с использованием метода непосредственного определения удельной антиоксидантной активности [5,6]. Одновременно изучено влияние β -14-АМК и мексидола на оптические спектральные показатели суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2, выделенных из клеточной и субклеточных мембран нейронов.

Цель исследования – сравнительное изучение особенностей инги-

бирующего действия β -14-АМК и мексидола на рилизинг изоформ NADPH-оксидазы (Nox1+Nox2) из изолированных нейрональных мембран (*плазматической, ядерной и митохондриальной*) и их антиоксидантной активности. А также сравнительное изучение влияния β -14-АМК и мексидола на оптические спектральные характеристики изолированной суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2, выделенных из клеточных и субклеточных (*ядерных, митохондриальных*) мембран нейронов, *in vitro*.

Материал и методы

Клеточные и субклеточные нейрональные мембраны выделяли из коры больших полушарий головного мозга беспородных белых крыс ($n=30$). Выделение и очистку мембран осуществляли методом дифференциального центрифугирования гомогената нейронов в 0,25 М водном растворе сахарозы. После осаждения ядер (1500 об/мин, 10 мин) и митохондрий (14000 об/мин, 10 мин) плазматические мембраны осаждали центрифугированием супернатанта при pH 5,6 (6000 об/мин, 10 мин). Осадок мембран промывали водой (1:200 об/об) и после центрифугирования в аналогичных условиях получали мембраны, практически очищенные от следов сопутствующих белковых примесей. После замораживания в течение суток и последующего размораживания водного гомогената ядер и митохондрий мембраны этих субклеточных формирований осаждали центрифугированием в вышеприведенных условиях и очищали от следов водорастворимых антиоксидантных ферментов и других белковых примесей промыванием водой (1:400 об/об) с повторным центрифугированием. В результате получали практически очищенные мембраны.

Выделение суммарной фракции нативных изоформ Nox1+Nox2 из плазматических, митохондриальных и ядерных мембран нейронов осуществляли по ранее разработанной методике [7]. В контроле водные гомогенаты исследуемых мембран (по 20 мл) инкубировали в течение 1,5 ч, с $5 \cdot 10^{-5}$ М ферригемоглобином, выделенным из эритроцитов человека при pH 8,5-9,0, при 37°C. Выделение изоформ Nox1+Nox2 в опытных группах проводили аналогичным образом, но в присутствии возрастающих доз β -14-АМК и мексидола (2,4 и 8 мг/мл). После охлаждения инкубационные смеси центрифугировали (14 000 об/мин, 15 мин), а супернатанты подвергали ионообменной хроматографии на колонках с целлюлозой DE-52. Подвергшиеся рилизингу из исследуемых мембран суммарные фракции нативных изоформ Nox1+Nox2 элюировали 0,1М калий-фосфатным буфером, pH 7,4 (КФБ). В ходе получения изоформ Nox было исключено использование агентов, денатурирующих указанные гемопро-теины. Далее в контроле и опытных группах регистрировали оптические спектры поглощения растворов, полученных Nox1+Nox2.

Удельную антиоксидантную активность β -14-АМК и мексидола определяли методом снижения плотности максимального оптического поглощения кумасси бриллианта синего (КБС) супероксидными радикалами (O_2^-), продуцируемыми при расщеплении перекиси водорода гидроокисью аммония [5]. За единицу антиоксидантной активности принимается количество вещества (в мг), подавляющее под влиянием продуцируемых O_2^- снижение плотности максимального оптического поглощения КБС (при 580 нм) на 50%. Удельную антиоксидантную активность β -14-АМК и мексидола выражали в ед/мг/мл.

В следующей серии экспериментов определяли изменения оптических спектральных показателей суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2, выделенных из клеточных и субклеточных (*ядерных, митохондриальных*) мембран нейронов, под влиянием β -14-АМК и мексидола, *in vitro*.

Суммарные фракции нативных изоформ Nox1+Nox2, отщепленных от нейрональных мембран (*плазматической, ядерной и митохондриальной*) (по 3 мл с $A_{530}=0,18$), инкубировали с β -14-АМК и мексидолом (по 2,4 и 8 мг/мл) в течение часа, при 37°C, с последующей регистрацией их оптических спектров поглощения.

Оптические спектры поглощения были зарегистрированы на спектрофотометре «Specord UV/VIS» (Германия), с длиной оптического пробега 1 см. Статистическую значимость различий полученных результатов оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Согласно современным представлениям, являясь важными терминальными компонентами семейства NADPH-оксидаз, ответственными за перенос электрона к молекулярному кислороду и его превращение в супероксидный радикал (O_2^-) [10], изоформы NADPH-оксидазы (Nox1-Nox2) под влиянием гемоглобина подвергаются отщеплению (*рилизингу*), что сопровождается структурно-функциональными изменениями мембранных структур [9]. При изучении сравнительной мембраностабилизирующей активности β -14-АМК и мексидола методом регистрации плотности максимального оптического поглощения β -полосы (A_{530}) растворов Nox1+Nox2 установлено, что инкубация выделенных и очищенных клеточной и субклеточных нейрональных мембран с β -14-АМК и мексидолом в присутствии ферригемоглобина приводит к ингибированию Hb-индуцируемого рилизинга суммарной фракции изоформ нативных Nox1+Nox2. Как следует из представленных данных, в возрастающих концентрациях (2,4 и 8 мг/мл) ингибирующее действие β -14-АМК и мексидола на рилизинг изоформ нативных Nox1+Nox2 из плазматических, ядерных и митохондриальных мембран нейронов носит дозозависимый характер (рис.1-3).

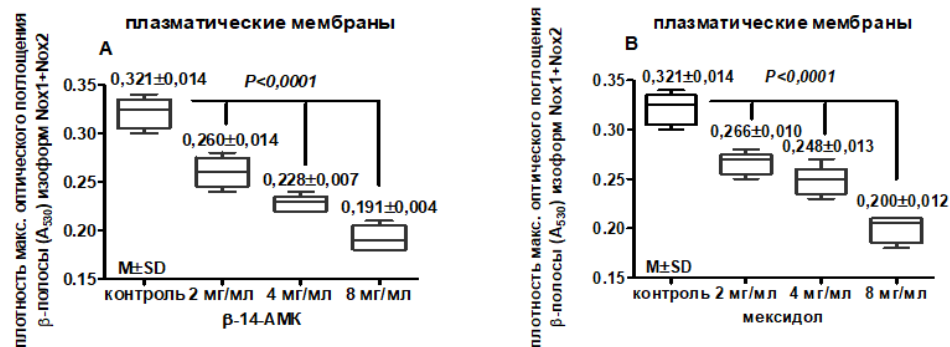


Рис.1. Дозозависимое ингибирующее действие возрастающих концентраций β -14-АМК (А) и мексидола (В) на релизинг изоформ Nox1+Nox2 из изолированных плазматических мембран нейронов

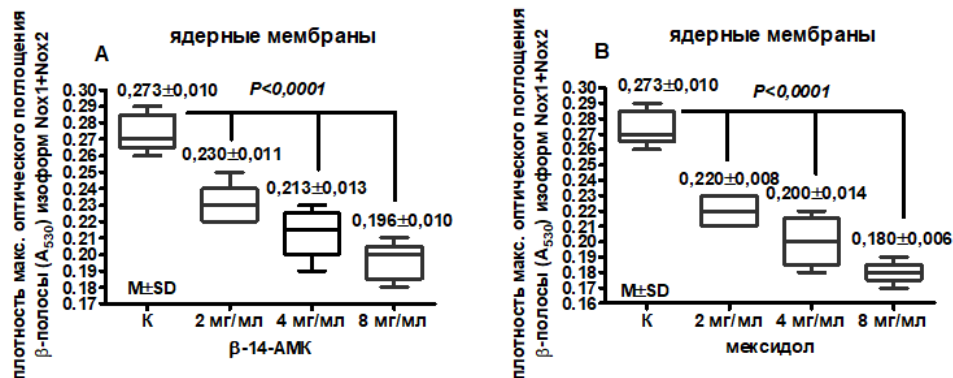


Рис.2. Дозозависимое ингибирующее действие возрастающих концентраций β -14-АМК (А) и мексидола (В) на релизинг изоформ Nox1+Nox2 из изолированных ядерных мембран нейронов

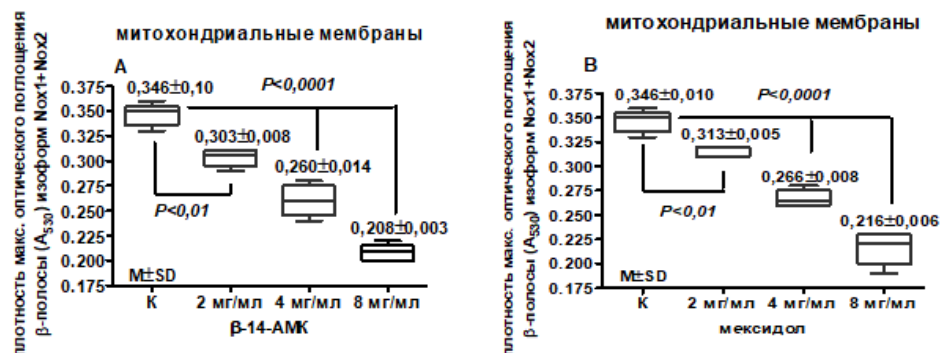


Рис.3. Дозозависимое ингибирующее действие возрастающих концентраций β -14-АМК (А) и мексидола (В) на релизинг изоформ Nox1+Nox2 из изолированных митохондриальных мембран нейронов

Результаты сравнительного анализа выраженности дозозависимого ингибирующего действия возрастающих концентраций β -14-АМК и мексидола на Нв-индуцируемый релизинг суммарной фракции изоформ нативной Nox1+Nox2 из клеточной и субклеточных мембран нейронов свидетельствуют, что в целом существенных количественных различий в степени ингибирующего действия исследуемых соединений на процесс индуцированного релизинга Nox1+Nox2 из мембранных структур не выявлено. В то же время заслуживает внимания тот факт, что в возрастающих концентрациях β -14-АМК лишь в несколько большей степени ингибирует индуцированный релизинг Nox1+Nox2 из изолированных плазматических мембран нейронов, а мексидол – из ядерных и митохондриальных (рис.4).

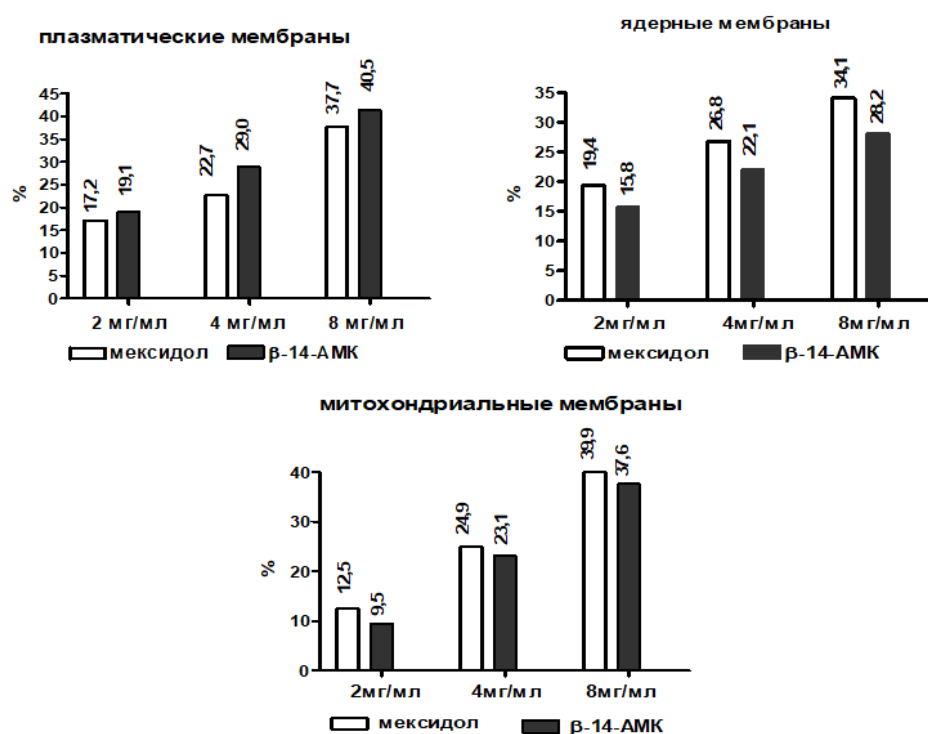


Рис.4. Сравнительная количественная характеристика ингибирующего действия возрастающих концентраций мексидола и β -14-АМК на релизинг изоформ Nox1+Nox2 из изолированных мембран нейронов (в %)

Представленные данные являются дальнейшим развитием и подтверждением, на уровне нейрональных мембран, состоятельности сформулированного нами представления [5] о том, что в основе мембраностабилизирующего эффекта β -14-АМК, помимо антиоксидантной активности, также обладает способностью дозозависимо ингибировать индуцированный релизинг Nox1+Nox2 из изолированных плазматических,

ядерных и митохондриальных мембран нейронов, что свидетельствует о наличии у β -14-АМК нейропротекторных свойств.

Об этом свидетельствуют и результаты сравнительного изучения антиоксидантной активности β -14-АМК и мексидола методом, основанным на регистрации снижения плотности максимального оптического поглощения КБС супероксидными радикалами, продуцируемыми при расщеплении перекиси водорода гидроокисью аммония. В частности, установлено, что, хотя по уровню показателя удельной антиоксидантной активности β -14-АМК (27,5 ед/мг/мл) значительно уступает мексидолу (40,1 ед/мг/мл), степень выраженности их дозозависимого ингибирующего действия на релизинг изоформ Nox1+Nox2 из плазматических, ядерных и митохондриальных мембран нейронов в количественном отношении примерно равнозначна. Следовательно, имеются основания заключить, что в основе реализации нейропротекторного действия β -14-АМК на мембранные нейроны лежит совокупность механизмов защиты нейронов: ингибирование релизинга изоформ NADPH-оксидаз (Nox1+Nox2) и антиоксидантное действие.

Изучение влияния β -14-АМК и мексидола на оптические спектральные показатели суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2, выделенных из клеточных и субклеточных мембран нейронов, позволило выявить, что при инкубации изоформ суммарной фракции нативных Nox1+Nox2 из плазматических мембран нейронов с мексидолом (8мг/мл) отмечается повышение оптического спектрального индекса (A_{412}/A_{360}) на 20-23%, что не наблюдается при изучении в аналогичных условиях β -14-АМК (рис.5).

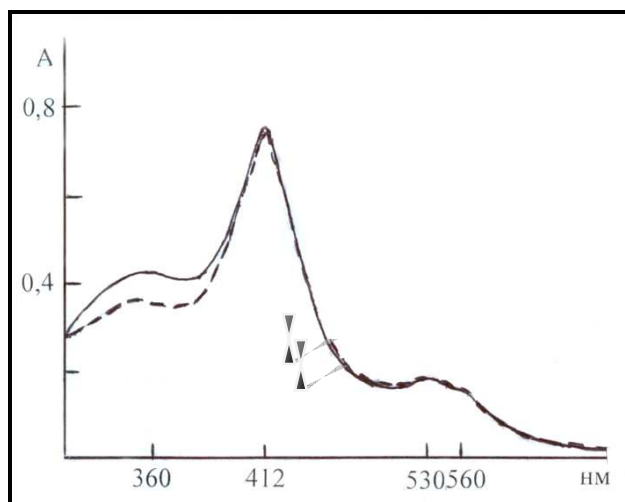


Рис.5. Оптические спектры поглощения суммарной фракции нативных изоформ Nox1+Nox2, выделенных из плазматических мембран нейронов в отсутствие (—) и присутствии (---) 8 мг/мл мексидола

Учитывая, что флавинадениндинуклеотид (ФАД) играет ключевую роль в регуляции NADPH-зависимого продуцирования O_2^- NADPH-оксидазами, обращает на себя внимание следующее: по данным спектрального анализа, уровень ФАД, являющегося ответственным за поглощение изоформ Nox1+Nox2 в оптическом спектре при 360 нм, под влиянием мексидола в плазматических мембранах нейронов снижается, что не обнаружено в случае изучения β -14-АМК. Одновременно выявлено, что под влиянием 8 мг/мл мексидола наблюдается потеря (до 20%) супероксид-продуцирующей активности изоформ суммарной фракции нативных Nox1+Nox2, выделенной из плазматических мембран нейронов. Указанный феномен заслуживает внимания с учетом данных, свидетельствующих, что в отличие от суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2 содержание ФАД в Nox1+Nox2 и, соответственно, O_2^- -продуцирующая активность в нейронах значительно выше, чем в других тканях [8].

Таким образом, установлено, что в механизмах нейропротекторного действия нового β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты – β -14-АМК на клеточные и субклеточные мембраны нейронов, наряду с ее антиоксидантной активностью, существенную роль играет ингибирование ферриHb-зависимого рилизинга из биомембран суммарной фракции изоформ Nox1+Nox2, NADPH-оксидазы, являющихся важным функциональным компонентом мембранных структур [10].

Результаты проведенного исследования, являясь свидетельством перспективности проведения научных изысканий в области синтеза и изучения различных проявлений биологической активности небелковых β -гетероциклически замещенных α -аминокислот, одновременно диктуют необходимость проведения дальнейших исследований эффективности β -14-АМК как потенциального нейропротектора, особенно с учетом того, что в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе и при цереброваскулярной патологии, особое значение придается повышению O_2^- -продуцирующей активности изоформ NADPH-оксидазы [9,13].

Поступила 27.04.18

Նեյրոնալ բջջաթաղանթներից ՆԱԴՔԻH-օքսիդաների արտազատման գործընթացի վրա α -ամինակարազաթթվի β -հետերոցիկլիկ տեղակալված ածանցյալի և մեքսիդոլի արգելակող ազդեցության համեմատական հետազոտություն

Լ.Յու. Սահակյան

Իրականացվել է առանձնացված նեյրոնալ թաղանթներից (պլազմատիկ, կորիզային և միտոքոնդրիալ) ՆԱԴՔԻH-օքսիդազի իզոմերների գումարային ֆրակցիայի՝ հեմոգլոբինով հարուցված արտազատման

վրա β -14-AMK-ի և մեքսիդոլի արգելակող ազդեցության առանձնահատկությունների և հակաօքսիդանտային ակտիվությունների համեմատական հետազոտություն: Իրականացվել է նաև նեյրոնների բջջային և ենթաբջջային թաղանթներից (կորիզային, միտոքոնդրիալ) առանձնացված Nox1+Nox2 իզոմերների գումարային ֆրակցիայի օպտիկական սպեկտրային հատկանիշների վրա նշված նյութերի ազդեցության համեմատական ուսումնասիրություն, *in vitro*:

Հաստատվել է, որ β -14-AMK-ի նյարդապաշտպան ազդեցության մեխանիզմի հիմքում, իր հակաօքսիդիչ ակտիվության հետ մեկտեղ, մեծ դեր է կատարում կենսաթաղանթներից ֆերիHb-կախյալ ՆԱԴՓH-օքսիդազի իզոմերների գումարային ֆրակցիայի արտազատման ընկճումը: Նշված ազդեցությունը խտություն-կախյալ բնույթի է: Նեյրոնների պլազմատիկ թաղանթներից առանձնացված նատիվ Nox1+Nox2 իզոմերների գումարային ֆրակցիայի հետ մեքսիդոլի (8 մգ/մլ) ինկուբացիայի արդյունքում դիտվում է օպտիկական սպեկտրային ինդեքսի (ցուցանիշի) (A_{412}/A_{360}) աճ 22-23%-ով, ինչը համանման պայմաններում չի դիտվում β -14-AMK –ի մոտ:

Comparative Inhibiting Action of β -heterocyclic Substituted Analogue of α -aminobutyric Acid and Mexidol on the Process of Releasing of NADPH oxidase Isoforms of Neuronal Membranes

L. Yu. Sahakyan

A comparative study of the inhibitory effects of β -14-AMK and mexidol on the releasing of NADPH oxidase isoforms (Nox1 + Nox2) from isolated neuronal membranes (plasma, nuclear and mitochondrial) and their antioxidant activity was carried out. A comparative study of the effect of β -14-AMK and mexidol on the optical spectral characteristics of the isolated total fraction of Nox1 + Nox2 isoforms isolated from cell and subcellular (nuclear, mitochondrial) neuronal membranes was conducted *in vitro*.

It was established that in the mechanisms of neuroprotective effects of β -14-AMK at the cellular and subcellular neuronal membranes, along with its antioxidant activity, inhibition of ferriHb-induced releasing of the total fraction of NADPH oxidase isoforms (Nox1 + Nox2) from biomembranes plays a significant role. It is a dose-dependent inhibitory effect. During incubation of the total fraction of native isoforms Nox1 + Nox2 from plasma membranes of neurons with mexidol (8 mg / ml), optical spectral index (A_{412} / A_{360}) is increased by 20-23%, which is not observed when studying β -14-AMK under the similar conditions.

Литература

1. Воронина Т.А. Мексидол: основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия. Фарматека, 2009, 6, с. 28-31.
2. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Хури Е.И., Рыбалко А.Е. Сравнение антиоксидантной активности мексидола при повреждениях головного мозга различного генеза в эксперименте. Современные проблемы науки и образования, 2016, 6, URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25392> (дата обращения: 09.02.2018)
3. Пожилова Е.В., Новиков В.Е., Новикова А.В. Фармакодинамика и клиническое применение препаратов на основе гидроксипиридина. Вестник Смоленской гос. мед. академии, 2013, т. 12(3), с. 56-66.
4. Саакян Л.Ю., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А., Секоян Э.С., Сагян А.С. Механизмы протекторного действия β -гетероциклически замещенного аналога α -аминомасляной кислоты на клеточные и субклеточные мембраны. Вopr.теорет.клин.мед., 2017, 20(4), с. 16-19.
5. Саакян Л.Ю., Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А., Секоян Э.С., Сагян А.С. Сравнительное изучение антиоксидантной активности β -гетероциклически замещенных аналогов α -аминомасляной кислоты и некоторых эндогенных антиоксидантов. Вopr.теорет.клин.мед., 2018, 21(1), с. 3-6.
6. Симонян Р.М., Бабаян М.А., Оксюзян Г.Р. Симонян Г.М., Фесчан С.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А., Матевосян Р.Ш. Образование супероксидных и гидроксильных радикалов при расщеплении перекиси водорода гидроксидом аммония. Биол. журн. Арм., 2017, т. LXIX, 2, с. 53-58.
7. 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.
8. Симонян Р.М., Чавушян В.А., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Чалян С.Г., Симонян М.А. Различия в изменении активности и ассоциации с гемоглобином изоформ NADPH-оксидазы из клеток мозга коровы. Нейрохимия, 2017, 34(2), с. 129-136.
9. Симонян Р.М., Ширинян С.В., Бабаян М.А. и соавт. Активность, степень отщепления и комплексообразование с ферригемоглобином изоформ NADPH-оксидазы из эритроцитарных мембран и экзосом сыворотки пациентов носителей рака желудка. Биол. журн. Арм., 2014. Приложение 1 (66), с. 83-88.
10. Panday A., Sahoo M.K., Osorio D., Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. Cellular & Molecular Immunology, 2015, 12, p. 5-23.
11. Saghyan A.S., Langer P. Asymmetric Synthesis of Non-Proteinogenic Amino Acids. First Edition. Published 2016 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016, p. 3-11.
12. Saghyan A.S., Simonyan H.M. et al. Asymmetric synthesis of new β -heterocyclic (S)- α -aminopropionic acids. Tetrahedron: Asymmetry, 2012, 23, p. 891-897.
13. Shiraki M., Shimizu M., Moriwaki H. et al. Carnitine dynamics and their effects on hyperammonemia in cirrhotic Japanese patients. Hepatol Res., 2017, 47(4), p. 321-327.
14. Kimura T., Hamase K., Miyoshi Y., Yamamoto R., Yasuda K., Mita M., Rakugi H., Hayashi T. & Isaka Y. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. Scientific Reports, 2016, 6:26137, DOI: 10.1038/srep26137.