

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

Государственное учреждение
«Научно-производственный центр
«Институт фармакологии и биохимии
Национальной академии наук Беларуси»

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
И КЛИНИЧЕСКАЯ
ФАРМАКОЛОГИЯ**

**МАТЕРИАЛЫ
МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ**

Гродно, 29-30 сентября 2011 г.

Гродно
2011

УДК 577.1:615(063)

Редакционная коллегия:
П.С. Пронько, П.Т. Петров, В.А. Аверин

Экспериментальная и клиническая фармакология: Материалы международной научной конференции / Отв. ред.: Пронько П.С. – Гродно: 29-30 сентября 2011 г.– Гродно: 2011.– 276 с.

В сборнике представлены материалы международной научно-практической конференции «Экспериментальная и клиническая фармакология», отражающие результаты исследований ученых из Беларуси, России и Казахстана.

Материалы конференции представляют интерес для фармакологов, биохимиков, физиологов, медицинских работников и организаторов здравоохранения, специалистов в области производства лекарственных препаратов, а также аспирантов и студентов факультетов медико-биологического профиля.

УДК 577.1:615(063)

© Коллектив авторов, 2011
© Государственное учреждение
«Научно-производственный центр
«Институт фармакологии и биохимии
Национальной академии наук Беларуси»,
2011

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА И СТРЕПТОКИНАЗЫ НА СОСТОЯНИЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ЗВЕНА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ФОНЕ ЭФФЕКТА СОЛЕЙ АММОНИЯ

В.С. Лукашевич, В.Н. Никандров

Институт физиологии НАН Беларуси, 220072 Беларусь, Минск, ул. Академическая, 28; E-mail: Lukashvs@rambler.ru

Изучение причин, вызывающих нейродегенеративные заболевания, а также поиск протекторов, нивелирующих патологические состояния, является одной из важных задач нейробиологии. Многие невропатологии сопровождаются воспалительными процессами, при которых появление активных форм кислорода вызывает повреждения клеток. Одной из причин, приводящих к увеличению случаев заболевания нервной системы, является гепатическая энцефалопатия, которая возникает при нарушении метаболизма аммония вследствие снижения синтеза мочевины в печени, в частности, при циррозе. В последнее время была получена совокупность пионерских данных, подтверждающих наличие у белка системы экстраклеточного протеолиза плазминогена (Pg) и его сильнейшего активатора по непротеиназному пути стрептокиназы (SK) регуляторных свойств в отношении клеток нервной ткани [1–4].

Целью данной работы явилось изучение активности основных энзимов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы) головного мозга крыс при действии хлорида аммония, Pg и SK, а также при сочетанном воздействии соли аммония с каждым из этих белков *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на самцах половозрелых крыс весом 200–300 г, содержащихся в стандартных условиях вивария.

Эксперименты in vitro. Животных декапитировали под эфирным наркозом. Мозг извлекали, взвешивали, измельчали и погружали в среду (0,32 М раствор сахарозы на 0,02 М трис-НСI буфере, рН 8,0) в отношении 1/10. Взвесь гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком до достижения гомогенности.

Ядерную фракция осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Из супернатанта выделяли митохондриальную фракцию путем центрифугирования на центрифуге ЦЛР-1 при 14000 об/мин в течение 20 мин. Осадок митохондрий суспендировали в 7 мл указанной среды и использовали для определения активности супероксиддисмутазы. Супернатант (фракция «легких митохондрий» + микросомы) использовали для определения активности каталазы и глутатионпероксидазы.

Все выше описанные операции проводили на холоду.

Эксперименты in vivo. Острую аммонийную интоксикацию создавали введением внутривентриально ацетата аммония в летальной дозе – 10мМ/кг [5]. Все эксперименты проведены на животных под стандартным уретан-небуталовым наркозом.

Крысам опытных групп вводили в межоболочечное пространство головного мозга SK – 40 МЕ и Pg – 20 мкг в виде растворов в объеме 20 мкл на животное. Через 10 мин,

после ведения ацетата аммония и наступления судорог, животных декапитировали, головной мозг гомогенизировали и центрифугировали при 2000g в течение 10 мин. С целью разрушения мембран внутриклеточных органелл проводили два цикла замораживания-оттаивания гомогенатов с помощью жидкого азота.

Активность энзимов определяли общепринятыми методами [6–8].

В работе использовали человеческий P_g (Sigma), SK (РУП «Белмедпрепараты»), NADH, NADPH, феназинметосульфат (Reanal), нитротетразолиевый синий (Chemapol). Все остальные реактивы были производства стран СНГ.

Эксперименты выполняли 3–5-кратно, результаты обрабатывали непараметрическим методом вариационной статистики по программе Статистика 6,0. Достоверным считали уровень значимости $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Ранее было показано, что гипераммониемия в условиях *in vivo* приводит к падению активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы [4]. Установлено также, что внесение хлористого аммония в культуру астроцитов вызывает индукцию свободных радикалов в этих клетках. Однако эксперименты, проведенные при жизни, предполагают возможное опосредованное действие ионов аммония. При этом нельзя исключить, что аммоний может оказывать непосредственное влияние на активность ферментов антиоксидантной защиты в месте их локализации. Поэтому в наших исследованиях мы изучали действие хлористого аммония, P_g и SK как непосредственно на субклеточные фракции головного мозга крыс, так и в условиях их воздействия *in vivo*.

Действие in vitro. При исследовании активности СОД в митохондриях головного мозга крыс под воздействием хлорида аммония обнаружено зависящее от концентрации соли угнетение активности энзима. Причем, если при концентрациях соли аммония 0,5 или 5 мкМ наблюдалась лишь тенденция к уменьшению активности, то при концентрации 50 мкМ хлорида аммония выявлено подавление активности СОД на 66%.

Добавление к аликвотам митохондриальной фракции P_g не оказало существенного влияния на активность СОД – снижение активности не превышало 10%. При сочетанном воздействии P_g и соли аммония во всем диапазоне концентраций картина принципиально не менялась в сравнении с эффектом одной соли аммония, и при максимальной концентрации NH₄Cl угнетение активности достигало 60%.

Добавление в инкубационную среду SK обусловило тенденцию к подавлению активности дисмутаза на 15%. При совместном воздействии SK и хлорида аммония в концентрации 0,5 или 5 мкМ как и в случае с P_g наблюдалась лишь тенденция в сдвигах активности. Лишь при максимальной концентрации NH₄Cl активность СОД снижалась до 40% от уровня контроля.

Следует отметить, что использованные в настоящей работе концентрации P_g (50 нМ) и SK (20 МЕ) обусловлены результатами ранее проведенных исследований [87], в которых показано, что эти белки именно в указанных концентрациях уже оказывали заметное нейропротекторное действие на морфо-функциональное состояние клеток нервной ткани.

Активность каталазы во фракции «легкие митохондрий» + микросомы гомогенатов головного мозга крыс снижалась на 23% лишь под действием соли аммония в максимальной концентрации.

Добавлению в инкубационную среду самого по себе P_g снижало активность каталазы лишь на 15%. Совместное добавление зимогена с NH₄Cl оказало неоднозначное воздействие на активность этого энзима. Так, при минимальной концентрации соли действие зимогена усилилось – снижение активности каталазы составило 24%. Однако при больших концентрациях NH₄Cl, даже при его максимальной концентрации (50 мкМ) P_g способствовал росту энзиматической активности.

SK на активность каталазы существенно не влияла. Однако добавление ее на фоне хлористого аммония нивелировало эффекты этой соли.

В отличие от СОД и каталазы, NH_4Cl в максимальной концентрации (50мкМ) не оказал влияния на активность глутатионпероксидазы. Существенных изменений активности этого энзима не было выявлено при добавлении каждого из исследуемых белковых факторов, а также их совместном с хлоридом аммония воздействии.

Действие in vivo. При острой аммонийной интоксикации наблюдалось снижение активности СОД в гомогенатах мозга на 37%.

При введении Рg или SK в межоболочечное пространство головного мозга крыс на активность СОД практически не менялась. Рg усиливал ингибирующее действие ионов аммония на активность этого энзима, достоверно подавляя ее до 50,7%. В отличие от этого, SK при совместном действии с аммонием вызывала повышение активности СОД до контрольных величин.

Острая аммонийная интоксикация обусловила проявление тенденции к угнетению активности каталазы в гомогенатах мозга на 15%. Такие же изменения сопровождали введение Рg в межоболочечное пространство мозга. Совместное воздействие этих эффекторов не привело к проявлению суммарного эффекта. Действие SK выразалось в проявлении тенденции к нарастанию активности каталазы на 16%, причем, как и в случае с СОД, SK нивелировала ингибирующее действие ионов аммония.

В проведенных экспериментах *in vivo* отмечена тенденция активности глутатионпероксидазы к повышению в сравнении с контролем. Как и в случае с каталазой, SK усиливала активность пероксидазы, причем наиболее значимый эффект достигался при ее совместном введении с хлористым аммонием (рост активности на 70%), где наблюдалась суммация эффекта.

Заключение. Итак, в результате проведенных исследований установлено, что *in vitro* ионы аммония вызвали заметное угнетение СОД активности митохондриальной фракции гомогенатов головного мозга и менее выраженное снижение активности каталазы во фракции «легкие митохондрии» + микросомы. Добавление в реакционную смесь Рg или SK само по себе существенно не влияло на активность этих энзимов, но в ряде случаев меняло характер действия ионов аммония на каталазу. Активность глутатионпероксидазы оказалась индифферентна ко всем эффекторам и их сочетаниям.

Несколько иная картина наблюдалась в экспериментах на животных. Так, введение в межоболочечное пространство ацетата аммония также угнетало СОД активность в мозгу. В сравнении с этим активность каталазы или глутатионпероксидазы менялась мало. На активность СОД введение самих по себе Рg или SK существенно не влияло, однако при совместном введении с солью аммония зимоген усиливал эффект ионов аммония, а SK – нивелировала его. Зимоген также не оказал воздействие на активность каталазы, тогда как SK нивелировала небольшое снижение, обусловленное ионами аммония. В отличие от экспериментов *in vitro*, практически во всех случаях активность глутатионпероксидазы нарастала. Однако наиболее заметен этот рост был при сочетанном введении соли аммония со SK – на 70% в сравнении с контролем.

Следует отметить, что в ряде случаев выявленные изменения не могут быть объяснены прямым воздействием на изученные энзимы. Нельзя также исключить возможного участия в их частичной трансформации реакций аминирования. Примечательно, что в использованных низких концентрациях плазминоген и стрептокиназа очень слабо влияли на активность изучаемых энзимов в обоих вариантах эксперимента, хотя ранее полученные нами результаты свидетельствуют о заметных сдвигах в клетках нервной ткани активности отдельных энзимов углеводно-энергетического метаболизма [9].

Нам представляется целесообразным продолжить эти исследования в нескольких направлениях и, прежде всего, влияние стрептокиназы или плазминогена на активность всех трех очищенных энзимов, в том числе – совместное с солями аммония, действие белков-эффекторов на физико-химические свойства митохондрий головного мозга. При

этом надо учесть, что стрептокиназа сама обладает выраженной супероксид-конвергирующей активностью [например, 10].

Список литературы

1. Никандров В.Н., Жук О.Н., Гронская Р.И., Полукошко Е.Ф., Пыжова Н.С., Петрусенко Г.П., Романовская А.А. Проблемы биотехнологии клеток нервной ткани: исследования белковых факторов трофического характера // In: "Materials, methods and technology. Scientific articles 2007". Sci. Invest. LTD-branch Bourgas. Bulgaria. – 2007. – P. 48-66.
2. Никандров В.Н., Жук О.Н., Гронская Р.И., Полукошко Е.Ф., Романовская А.А. Действие плазминогена и стрептокиназы на жизнедеятельность клеток нервной ткани в культуре // Биомед. химия, 2008, т. 54, № 2, с. 192–200.
3. Никандров В.Н., Жук О.Н. Нейротрофические и нейропротекторные свойства и стрептокиназы и плазминогена // В кн.: «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. Сб. трудов первой международной научно-практической конференции. Том. 1.». СПб, 2010, с. 181–184.
4. Никандров В.Н., Жук О.Н. Стрептокиназа и плазминоген в биотехнологии клеток нервной ткани // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2011, т. 6, № 1, с. 36–48.
5. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Клеточные механизмы токсичности аммиака. М: 2008.
6. Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen // Biochem. biophys. Res. commun. 1972, vol. 46, № 2, p. 849-856.
7. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988, № 1, с. 16–19.
8. Paglia D.E, Walentine W.N Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Lab. Clin. Med. 1967, vol. 70, p.158–169.
9. Никандров В.Н., Лукашевич В.С., Гронская Р.И. Модуляция углеводно-энергетического метаболизма клеток нервной ткани при воздействии плазминогена и стрептокиназы // В кн.: «Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии. Матер. респ. конф. с междунар. участием». Гродно, 2010, с. 165–169.
10. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Кислородзависимый путь активации плазминогена и новые физико-химические механизмы протеолиза // Весці НАН Беларусі, сер. мед.-біял. навук, 2001, № 1, с. 54-60.

EFFECT OF STREPTOKINASE AND PLASMINOGEN ON THE STATE OF BRAIN ENZYMES OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN THE PRESENCE OF AMMONIUM SALTS

V.S. Lukashevitch, V.N. Nikandrov

Institute of Physiology of NAS of Belarus, 220072 Belarus, Minsk

Research was carried out into the effect of ammonium ions, plasminogen, streptokinase as well as plasminogen(streptokinase) + ammonium ions on superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase of brain homogenates either *in vitro* or after injections of their solutions into the rat brain subdural space. The enzymatic activity changes were characterized.