

Список литературы / References:

1. Фаттахов С-Г.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис гидроксиметил) фосфиновой кислоты (Мелафен), как новый сильный регулятор роста растений. *Материалы 13 международной конференции химии фосфорных соединений*. С-Петербург, 2002, с. 80. [Fattachov S.G., Reznik V.S., Konovalov A.I. Melamine Salt of Bis(hydroxymethyl)phosphinic Acid. (Melaphene) As a New Generation Regulator of Plant growth regulator. *In set of articles. Reports of 13th international conference on chemistry of phosphorus compounds*, S. Petersburg, 2002, p. 80. (In Russ.)]
2. Никифоров Г.А., Белостоцкая В.Б., Вольева И.С., Комиссарова Н.Л., Горбунов Д.Б. Биоантиоксиданты "поплавокного" типа на основе производных 2,6 дитретбутил-фенола. *В сб.: Биоантиоксидант, Научный вестник мед. акад.*, 2003, с. 50-51. [Nikiforov G.A., Voleva V.B., Belostotskaya I.S., Komissarova N.L., Gorbunov D.B. Bioantioxidants float type at the base of derivatives 2,6 ditertbutyl-phenol. *In set of articles "Bioantioxidant" Scientific Gerald of Medical Academic*, 2003, pp. 50-51. (In Russ.)]
- 3 Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Бурлакова Е.Б., Шугаев А.И., Генерозова И.П., Фаттахов С-Г.Г., Коновалов А.И. Влияние фосфоорганического регулятора роста растений на структурные характеристики мембран растительного и животного происхождения. *Биол. Мембраны*, 2008, т. 25, № 2, с. 150-156. [Zhigacheva I.V., Fatcullina L.D., Burlakova E.B., Shugaev A.I., Generosova I.P., Fattachov S.G., Konovalov A.I. Influence of phosphoorganic plant growth regulator to the structural characteristics of membranes plant's and animal's origin. *Biological membrane*, 2008, vol. 25, no. 2, pp. 150-156. (In Russ.)]
4. Alekseeva O.M., Kremntsova A.V., Kim Yu.A., Krivandin A.V., Shatalova O.V., Zaikov G.E. Melafen effects to structural parameters of DMPC and egg phospholipids membranes. *Vestnik Kazan Technology University*, 2015, vol. 18, no. 2, pp. 14-22.
5. Alekseeva O.M., Krivandin A.V., Shatalova O.V., Kremntsova A.V., Kim Yu.A. Thermodynamic and structural Parameters of Phospholipid Membranes. *In book "Compositional Analysis of Polymers An Engineering Approach. Polimer surfaces and interfaces"* Editor: M.S. Adaramola, O.V. Stoyanov, G. Zaikov, R.M. Akhmetkhanov, 2015, Chapter 2. Apple Academic Press.
6. Fatkullina L.D., Vekshina O.M., Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Kim Yu.A. Stabilization of cell membranes by hybrid antioxidants in therapy of neurodegenerative diseases. *In book "In Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development"* Nova Science Publishers, New York, 2008. Ed. by P.E.Stott and G.E.Zaikov, Chapter 13, pp. 115-123.

НАРУШЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В МОЗГОВЫХ КЛЕТКАХ И ИХ КОРРЕКЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТОМ RAGE НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Симонян Р.А.¹, Самохин А.Н.², Вольпина О.М.³, Короев Д.О.³, Бобкова Н.В.², Аветисян А.В.¹

¹НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского, Московский государственный университет

Ленинские горы, 1/40, г. Москва, 119992, РФ

e-mail: avetis@genebee.msu.ru

²Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290, РФ

³Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ

Аннотация. Ольфакторно бульбэктомированные (ОБЭ) мыши линии NMRI через 5 недель после операции демонстрируют все признаки нейродегенерации альцгеймеровского типа, в том числе, нарушение пространственной памяти, накопление амилоида-бета (Абета) в мозговых тканях, представляя адекватную животную модель спорадической формы болезни Альцгеймера (БА) [1].

Нами были изучены митохондриальные нарушения в неокортексе и гиппокампе ОБЭ мышей по сравнению с ложнооперированными (ЛО) животными, а именно, снижение скорости дыхания, нарушение дыхательного контроля, снижение трансмембранного потенциала, ингибирование комплексов дыхательной цепи. Дисфункция митохондрий у ОБЭ мышей проявлялась в низкой скорости окислительно-восстановительных реакций ферментативных комплексов дыхательной цепи. Было обнаружено значительное падение активности NADH:убихинон оксидоредуктазы (комплекс I) и цитохром с оксидазы (комплекс IV) в митохондриях неокортекса и гиппокампа.

Для терапии БА и устранения указанных нарушений нами были синтезированы синтетические пептиды к неструктурированным фрагментам рецептора конечных продуктов гликилирования RAGE, являющимся также рецептором Абета. Интраназальное введение в течение 3 недель фрагмента RAGE (60-76) выявил отчетливый терапевтический эффект. Улучшилась пространственная память ОБЭ мышей, восстановился энергетический метаболизм в митохондриях неокортекса и гиппокампа. В отличие от пептида (60-62), который не оказывал положительного эффекта, фрагмент (60-76) восстановил активность комплексов I и IV электрон-транспортной цепи митохондрий.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, митохондрии, дыхательные комплексы, RAGE, синтетические пептиды.

IMPAIRMENT OF RESPIRATORY COMPLEXES IN THE BRAIN OF BULBECTOMIZED MICE AND THEIR RECOVERY AFTER INTRANASAL ADMINISTRATION OF RAGE FRAGMENTSimonyan R.A.¹, Samokhin A.N.², Volpina O.M.³, Koroev D.O.³, Bobkova N.V.², Avetisyan A.V.¹¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University*Leninskiye gory, 1/40, Moscow, 119992, Russia*²Institute of Cell Biophysics RAS*Institutskaya St., 3, Moscow Region, Pushchino, 142290, Russia*³Shemyakin and Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the RAS*Miklukho-Maklaya St., 16/10, Moscow, 117997, Russia*

Abstract. Five weeks after bilateral olfactory bulbectomy (OBX) NMRI mice displayed considerable impairment of spatial memory and increased level of beta-amyloid in the brain and seems to be appropriate model of sporadic Alzheimer's disease [1]. We investigated the resting and phosphorylating respiratory rates and respiration control ratio as well as membrane potential and activity of respiratory complexes in mitochondria isolated from the neocortex and hippocampus. We have found impairments of mitochondrial oxygen metabolism and inhibition of the respiratory complexes in mitochondria from the neocortex and hippocampus in OBX mice. Obtained data was shown to be significantly decrease the rate of the respiratory chain functioning that could be result from the reduced activities of the electron transport chain complexes, namely NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) and cytochrome *c* oxidase (complex IV).

Synthetic peptides corresponding to nonstructural region of the extracellular domain of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) known as amyloid- β receptor have been examined as therapeutic substances under intranasal administration. The treatment of mice with fragment RAGE (60-76) for 3 weeks was shown an improving the spatial memory in OBX mice with simultaneous reactivation of impaired electron transport chain complexes I and IV in cortical and hippocampal mitochondria, whereas peptide RAGE (60-62) did not show such positive effect.

Key words: Alzheimer's disease, mitochondria, respiratory complexes, RAGE, synthetic peptides.

Болезнь Альцгеймера (БА) является хроническим, социально-значимым, системным нейродегенеративным заболеванием, приводящим к потере памяти, деменции и неизбежной смерти больного. Несмотря на значительный прогресс в изучении патогенеза, БА до сих пор остается неизлечимым заболеванием. Причина увеличения содержания амилоида-бета (Абета) в мозге при наиболее распространенной спорадической форме БА остается неясной. Накоплению Абета в мозге больных, помимо возрастания количества его предшественника – белка APP, способствуют еще два процесса – усиленный вход Абета из крови в мозг и его замедленный выход из цереброспинальной жидкости в кровяное русло. Оба процесса обусловлены изменениями в количестве и активности транспортеров Абета, в том числе рецептора конечных продуктов неферментативного гликирования RAGE [2]. Олигомерный и агрегированный Абета является лигандом RAGE, помимо образованных неферментативным путем гликированных белков AGE. Установлено, что RAGE, связывая мономерные и фибриллярные формы амилоида, участвует в транспорте А β через гематоэнцефалический барьер и в накоплении его в мозге [3]. Также Абета с помощью клеточного рецептора RAGE транспортируется с поверхности клеток внутрь нейронов. С другой стороны, растворимая часть – sRAGE, без трансмембранного домена, не утрачивает способность связываться с Абета через эктодомены – V, C1, способствует их выносу в кровяное русло и очищению мозга [4]. Исходя из вышесказанного, было сделано предположение, что синтетические фрагменты неструктурированных участков внеклеточных доменов V и C1 sRAGE рецептора – предполагаемые сайты связывания Абета, могут оказаться перспективным терапевтическим средством при терапии БА.

Были синтезированы синтетические фрагменты, моделирующие потенциальные участки связывания Абета на внеклеточных доменах V и C1, исходя из трехмерной модельной структуры sRAGE, построенной согласно данным рентгено-структурного анализа [5]. Два пептида - (163-175) PLVPNEKGVSVKE-G и (331-340) GSVGGGLTG, относились к C1-домену, два других - (60-76) AWKVLSPQGGGPWDSVA и (60-62) AWKV, структурно воспроизводили фрагменты V домена. Всем животным ежедневно интраназально вводили стерильный раствор пептида в течение 3 недель после операции, по завершении курса терапии проводили обучение мышей в водном лабиринте Морриса и тестирование пространственной памяти (см. рис. 1).

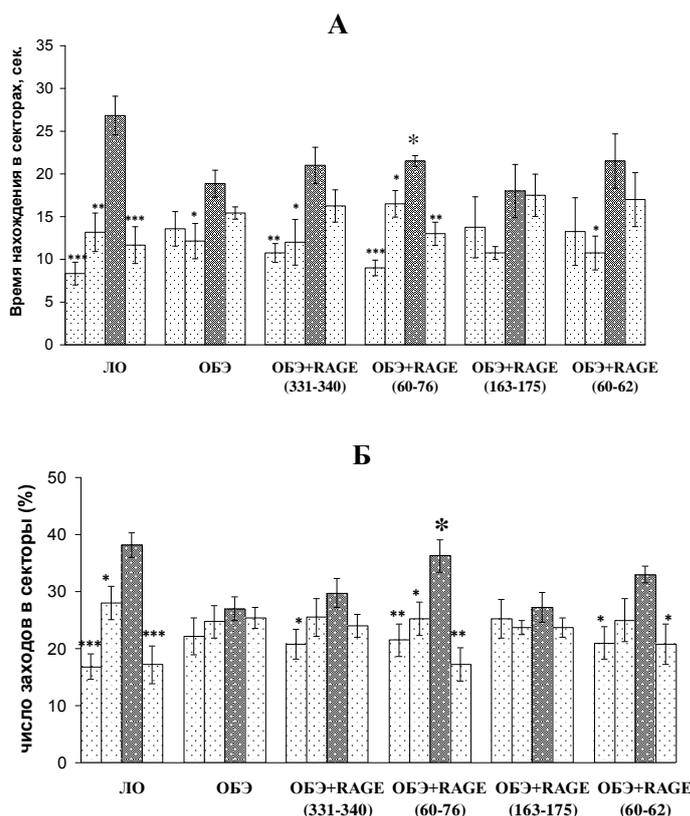


Рисунок 1 – Поведенческие характеристики животных. Тестирование пространственной памяти ложнооперированных (ЛО), бульбэктомированных (ОБЭ) и ОБЭ+RAGE мышей в водном бассейне Мориса с помощью регистрации времени, проведенной в разных секторах (А), и числа заходов в каждый сектор в процентах (Б). Цифры указывают: нейтральные сектора в бассейне 1, 2, 4 - серые столбики; отсек обучения 3 - серый столбик; n = 6. (*) $p < 0,05$. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$

Интраназальное введение ОБЭ мышам синтетического пептида – фрагмента (60-76), соответствующего свободному неструктурированному участку V домена молекулы sRAGE, показывал достоверный терапевтический эффект. Предположительно, синтетический пептид, связываясь с Абета, усиливает транспорт последнего из мозга в кровяное русло, тем самым, способствуя очистке мозга.

Патогенез болезни Альцгеймера сопровождается дисфункцией митохондрий в мозговых клетках. Одним из ранних признаков БА является ухудшение функционирования митохондрий в коре и гиппокампе, участках мозга, отвечающих за оперативную память и обучение [6]. Известно, что Абета прежде всего накапливается в митохондриях нейронов больных БА, и этот процесс предваряет внеклеточное отложение олигомерного Абета, увеличивающийся с возрастом. Нейротоксическое действие Абета на митохондрии приводит к ингибированию дыхательных комплексов электрон-транспортной цепи во внутренней мембране митохондрий [7]. Вследствие этого снижается скорость дыхания на сукцинате в состоянии покоя (V2) и при фосфорилировании ADP (V3), а также мембранный потенциал, величина дыхательного контроля, что вызывает энергетический дефицит в клетках мозга и, в конечном итоге, гибель нейронов (см. рис. 2).

Сравнительное изучение биоэнергетических характеристик митохондрий, активность комплексов дыхательной цепи до и после интраназального введения синтетических фрагментов RAGE выявил отчетливый терапевтический эффект фрагмента (60-76). Изолированные из неокортекса и гиппокампа ОБЭ мышей митохондрии демонстрировали значительное падение активности комплексов I и IV электрон-транспортной цепи, которая была предотвращена пептидом V домена молекулы sRAGE (60-76) после 3-недельного введения. В то же время, другой пептид V домена (60-62) не оказывал никакого влияния на биоэнергетические характеристики митохондрий (см. табл. 1 и 2).

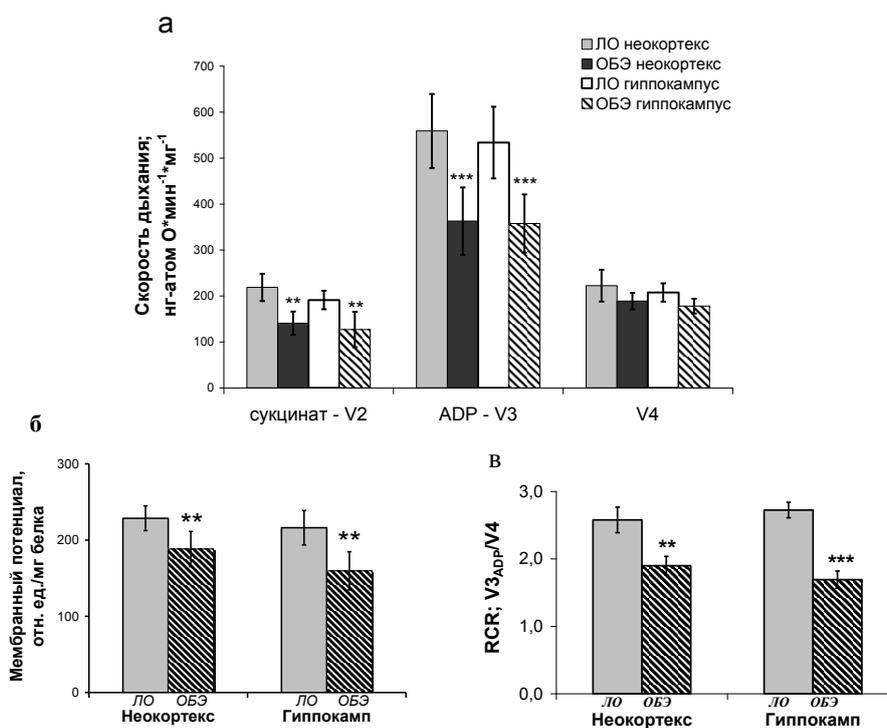


Рисунок 2 – Нарушение дыхания в состоянии покоя и синтеза АТФ (а), снижение мембранного потенциала (б), снижение величины дыхательного контроля (в) в митохондриях неокортекса и гиппокампа бульбэктомированных (ОБЭ) и ложнооперированных (ЛО) мышей. Все данные приведены в виде среднего ± SEM, n = 6, достоверность выражена в величине *p* - (*) *p* < 0.001, (**) *p* < 0.01, (***) *p* < 0.05

Таблица 1 – Активность NADH:убихинон-оксидоредуктазы - комплекса I в митохондриях из неокортекса и гиппокампа ЛО, ОБЭ и ОБЭ+sRAGE мышей; n = 12. Данные представлены в виде среднего ± SD, достоверность выражена в величине *p*

Группы мышей	Активность в неокортексе	Статистическая достоверность	Активность в гиппокампе	Статистическая достоверность
А ЛО	220 ± 20	A vs Б ** <i>p</i> < 0.01	200 ± 22,5	A vs Б ** <i>p</i> < 0.01
Б ОБЭ	161 ± 20	Б vs В ** <i>p</i> < 0.01	122,5 ± 22	Б vs В ** <i>p</i> < 0.01
В ОБЭ + (60-76) sRAGE	211 ± 20	В vs Д ** <i>p</i> < 0.01	176 ± 16,5	В vs Д ** <i>p</i> < 0.01
Д ОБЭ + (60-62) sRAGE	128 ± 13	А vs Д ** <i>p</i> < 0.05	107 ± 32	А vs Д ** <i>p</i> < 0.01

Как видно из таблицы 2, активность цитохром *c* оксидазы не только восстанавливается фрагментом (60-76) в митохондриях ОБЭ мышей, но и превышает активность в контрольных ЛО митохондриях. Длительное введение другого фрагмента V домена (60-62) после бульбэктомии незначительно повышает активность комплекса IV в митохондриальной фракции из гиппокампа, но не из неокортекса.

Таблица 2 – Активность цитохром *c* оксидазы - комплекса IV в митохондриях из неокортекса и гиппокампа ЛО, ОБЭ и ОБЭ+sRAGE мышей; n = 12. Данные представлены в виде среднего ± SD, достоверность выражена в величине *p*.

Группы мышей	Активность в неокортексе	Статистическая достоверность	Активность в гиппокампе	Статистическая достоверность
А ЛО	265 + 32	A vs Б ** <i>p</i> < 0.01	262 + 33	A vs Б ** <i>p</i> < 0.01
Б ОБЭ	177 + 28	Б vs В ** <i>p</i> < 0.01	160 + 19,5	Б vs В ** <i>p</i> < 0.01
В ОБЭ + (60-76) sRAGE	305 + 27	В vs Д ** <i>p</i> < 0.01	308 + 20	В vs Д ** <i>p</i> < 0.01
Д ОБЭ + (60-62) sRAGE	207 + 28	А vs Д * <i>p</i> < 0.05	217 + 35,5	Б vs Д * <i>p</i> < 0.05

Таким образом, синтетический пептид (60-76) к неструктурированному фрагменту V домена sRAGE может служить перспективным терапевтическим средством для лечения БА.

Список литературы / References:

1. Bobkova N., Vorobyov V., Medvinskaya M., Aleksandrova I., Nesterova I., Interhemispheric EEG differences in olfactory bulbectomized rats with different cognitive abilities and brain beta-amyloid levels. *Brain. Res.*, 2008, vol. 1232, pp. 185-194.
2. Ma L.Y., Fei Y.L., Wang X.Y., Wu S.D., Du J.H., Zhu M., Jin L., Li M., Li H.L., Zhai J.J., Ji L.P., Ma R.R., Liu S.F., Li M., Ma L., Ma X.R., Qu Q.M., Lv Y.L., The Research on the Relationship of RAGE, LRP-1, and A β Accumulation in the Hippocampus, Prefrontal Lobe, and Amygdala of STZ-Induced Diabetic Rats. *J Mol Neurosci.* 2017, vol. 62, no. 1, pp. 1-10.
3. Cho H.J., Son S.M., Jin S.M., Hong H.S., Shin D.H., Kim S.J., Huh K., Mook-Jung I., RAGE regulates BACE1 and Abeta generation via NFAT1 activation in Alzheimer's disease animal model. *FASEB J.*, 2009, vol. 23, no. 8, pp. 2639-49.
4. Cheng C., Tsuneyama K., Kominami R., Shinohara H., Sakurai S., Yonekura H., Watanabe T., Takano Y., Yamamoto H., Yamamoto Y., Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol.*, 2005, vol. 18, no. 10, pp. 1385-96.
5. Вольпина О.М., Короев Д.О., Волкова Т.Д., Камынина А.В., Филатова М.П., Запорожская Я.В., Самохин А.Н., Александрова И.Ю., Бобкова Н.В. Фрагмент рецептора конечных продуктов гликозилирования восстанавливает пространственную память животных в модели болезни Альцгеймера. *Биоорг. химия*, 2015, т. 41, № 6, с. 709-16. [Volpina O.M., Korojev D.O., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Zaporozhskaya Y.V., Samokhin A.N., Aleksandrova I.J., Bobkova N.V. Fragment of Receptor for Advanced Glycation End Products Improves Memory State in a Model of Alzheimer's Disease. *Bioorg Khim.*, 2015, vol. 41, no. 6, pp. 709-16. (In Russ.)]
6. Swerdlow R.H., Burns J.M., Khan S.M., The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2014, vol. 1842, pp. 1219-31.
7. Аветисян А.В., Самохин А.Н., Александрова И.Ю., Зиновкин Р.А., Симонян Р.А., Бобкова Н.В., Функциональное нарушение митохондрий неокортекса и гиппокампа у мышей с бульбэктомией – модели болезни Альцгеймера. *БИОХИМИЯ*, 2016, т. 81, вып. 6, с. 802-812. [Avetisyan A.V., Samokhin A.N., Alexandrova I.Y., Zinovkin R.A., Simonyan R.A., Bobkova N.V., Mitochondrial Dysfunction in Neocortex and Hippocampus of Olfactory Bulbectomized Mice, a Model of Alzheimer's Disease, *Biochemistry (Mosc)*, 2016, vol. 81, no. 6, pp. 615-23. (In Russ.)]

ПРИМЕНЕНИЕ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ БЕЛКОВ МОЛОКА ОВЕЦ

Волнин А.А.¹, Шералиев Ф.Д.¹, Шапошников М.Н.², Зайцев С.Ю.², Багиров В.А.¹

¹ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. акад. Л.К. Эрнста"
Дубровицы, 60, Московская обл., 142132, РФ

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА им. К.И. Скрябина»
ул. Акад. Скрябина, 23, г. Москва, 109472, РФ
e-mail: volnin.a@mail.ru

Аннотация. Оценка биологической ценности продукции животноводства – актуальное направление современной науки и сельскохозяйственной практики, кроме того, количественный анализ аминокислотного состава белков играет важную роль в биохимических, фармацевтических и биомедицинских исследованиях. Данная работа посвящена вопросам использования ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией проб нингидрином при исследовании аминокислотного состава и оценке биологической ценности белков молока овец. Представлен аминокислотный состав белков молока романовской породы овец, полученного на 20 день лактации, выполнен расчет аминокислотного сора этих белков, определено соотношение незаменимых и заменимых аминокислот, произведена оценка биологической ценности белков молока в сравнении с «идеальным» белком (ФАО ВОЗ). Установлено, что в белках молока овец романовской породы, полученных на 20 день лактации, треонин является лимитирующей аминокислотой.

Ключевые слова: ионообменная хроматография, постколоночная дериватизация, нингидрин, аминокислотный скор, молоко овец.