

13. Трашков А.П., Васильев А.Г., Коваленко А.Л., Тагиров Н.С. Метаболическая терапия мочекаменной болезни на различных моделях поражения почек у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, 2015, т. 78, № 3, с. 17-21. [Trashkov A.P., Vasiliev A.G., Kovalenko A.L., Tagirov N.S. Metabolic therapy of nephrolithiasis in two different rat models of kidney disease. *Experimental and clinical pharmacology*, 2015, vol. 78, no. 3, pp. 17-21. (In Russ.)]
14. Nicoli D., Chang Yu-Jain, Wu Jau-Sien *Methods and apparatus for electrophoretic mobility determination using phase light scattering analysis*. Patent US 7295311 B2, Date of publication 13.11.2007.
15. Serafini-Cessi F., Bellabarba G., Malagolini N., Dall'Olio F. Rapid isolation of Tamm-Horsfall glycoprotein (uromodulin) from human urine. *J Immunol Methods*, 1989, vol. 120, pp. 185-189.
16. Viswanathan P., Rimer J.D., Kolbach A.M., Ward M.D., Kleinman J.G., Wesson J.A. Calcium oxalate monohydrate aggregation induced by aggregation of desialylated Tamm-Horsfall protein. *Urol Res.*, 2011, vol. 39, no. 4, pp. 269-282.
17. Hess B., Nakagawa Y., Parks J.H., Coe F.L. Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am J Physiol.*, 1991, vol., 260, pp. F569-F578.
18. Mo L., Liaw L., Evan A.P., Sommer A.J., Lieske J.C., Wu X.R. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking osteopontin, Tamm-Horsfall protein, or both. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 2007, vol. 293, pp. F1935-F1943.
19. Hallson P.C., Rose G.A. Uromucoids and urinary stone formation. *Lancet*, 1979, vol. 1, pp. 1000-1002.
20. Greenwood R, Kendall K. Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions. *Journal of the European Ceramic Society*, 1999, vol. 19, no. 46, pp. 479-488.

ПРЕПАРАТ АНФЕН КАК АДАПТОГЕН К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Жигачева И.В.¹, Расулов М.М.²

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

e-mail: zhigacheva@mail.ru

²Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений

ш. Энтузиастов, 38, г. Москва, 105118, РФ

e-mail: eos2004@inbox.ru

Аннотация. Исследовано влияние пространственно-затрудненного фенола анфена натрия (1-карбокси-1-(N-метиламид)-2-(3',5'-ди-tert-бутил-4-гидрокси-фенил пропанат натрия) на функциональное состояние митохондрий печени крыс. Стрессовые воздействия вызывали 3-4 кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах этих органелл. Препарат снижал интенсивность ПОЛ до контрольных значений, что способствовало сохранению высокой функциональной активности митохондрий. Предотвращение дисфункции митохондрий, вероятно, было сопряжено с повышением устойчивости животных к действию стрессовых факторов. Предполагается, что протекторная активность анфена натрия обусловлена его антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: анфен, адаптоген.

ANPHEN AS ADAPTOGEN TO STRESS IMPACT

Zhigacheva I.¹, Rasulov M.²

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences

st. Kosygina, 4, Moscow, 119334, Russia

e-mail: zhigacheva@mail.ru

²State Research Institute of Chemistry and Technology of Elementoorganic Compounds

Enthusiasts highway, 38, Moscow, 105118, Russia

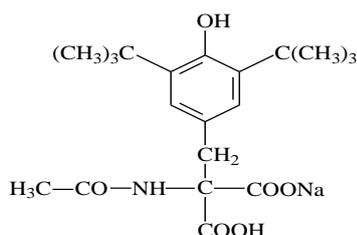
e-mail: eos2004@inbox.ru

Summary. In the present study we investigated the effect of the spatial-hindered phenol - sodium anphen (1-carboxy-1-(N-methylamide) -2-(3',5'-di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl sodium propanat) on the functional state of rat liver mitochondria. Stress actions caused 3-4 fold increase in fluorescence intensity of lipid peroxidation products in the membranes of these organelles. The preparation decreased the LPO intensity to control values, which contributed to maintaining high functional activity of mitochondria. The prevention of mitochondrial dysfunction, probable, was associated with an increased resistance of animals to stress factors. It is assumed that the protective activity of sodium anphen is due to its antioxidant properties.

Keywords: anphen, adaptogen.

В условиях стресса наблюдается активация симпатoadреналовой системы и рост уровня катехоламинов в крови, что приводит к выходу Ca^{2+} из сосудистого русла в клетки. Повышение содержания внутриклеточного Ca^{2+} вызывает накопление этих ионов в митохондриях, что влечет за собой рост генерации АФК, АФА и нарушение биоэнергетических функций этих органелл, приводящее к развитию ряда патологических состояний [1,2]. В связи с этим довольно актуальна проблема поиска новых препаратов-адаптогенов, повышающих

устойчивость организмов к стрессу. Впервые термин «адаптогены» был введен Н.В. Лазаревым (1959, 1962), сформулировавшим концепцию о состоянии неспецифически повышенной сопротивляемости организма (СНПС), а лекарственные средства, вызывающие это состояние, были названы им «адаптогенами». Он вместе со своими сотрудниками доказал способность этих препаратов повышать устойчивость организма к широкому спектру повреждающих воздействий: кислородному голоданию, резким колебаниям температуры, интоксикациям, инфекционным возбудителям и пр. [3]. Сходство эффектов, вызываемых совершенно различными по своей природе фармакологическими средствами, навело Н.В. Лазарева на мысль о том, что существует некий единый неспецифический механизм повышения устойчивости организма. Как известно в условиях стресса происходит смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения содержания АФК в клетке. По литературным данным одним из основных источников АФК в условиях стресса являются митохондрии [4,5]. Избыточная генерация АФК, приводят к окислению тиоловых групп белков, перекисидации липидов мембран, прежде всего кардиолипина, и набуханию митохондрий. Следствием «перекисного» набухания митохондрий (или образования больших пор во внешней мембране) является высвобождение апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму и активация митохондриального пути апоптоза [6,7]. Кроме того, избыточная генерация АФК может оказывать влияние на функциональное состояние редокс-чувствительных внутриклеточных сигнальных путей запуска программы клеточной гибели [8]. В данных условиях образуются токсические для клеток продукты: альдегиды и 4-гидрокси-2,3-ноненали. Эти токсики ингибируют ферменты, вовлеченные в основные метаболические пути, главным образом в цикл трикарбоновых кислот, что влияет на транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий за счет истощения пула NADH в матриксе митохондрий [9]. В связи с этим можно было предположить, что препараты-адаптогены должны влиять на генерацию АФК этими органеллами. На эту роль в первую очередь претендуют антиоксиданты, в частности синтетические фенольные антиоксиданты, имеющие довольно высокие коэффициенты взаимодействия с пероксильными радикалами (k_7) [10]. В качестве объекта исследования был выбран препарат, являющийся пространственно-затрудненным фенолом анфен натрия (1-карбокситетра-1-(N-метиламид)-2-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-фенил)пропанат натрия):



Целью работы было также изучение функционального состояния митохондрий печени крыс в условиях стресса и влияние на него исследуемого препарата

Материалы и методы.

Работу проводили на митохондриях печени крыс Вистар массой 120-130 г.

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [11]. Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 минут, второе – при 9000 g, 10 минут. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань: среда – 1:0.25. Среда выделения: 0,25 М сахароза, 10 мМ HEPES, pH 7,4.

Скорости дыхания митохондрий печени крыс регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий печени содержала: 0,25 М сахарозу, 10 мМ Трис-НСl, 2 мМ MgSO₄, 2 мМ KН₂PO₄, 10 мМ KCl (pH 7.5) (28 °C).

Белок определяли биуретовым методом.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [11]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десяти миллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvonGmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг. белка.

Протекторную активность препарата исследовали, используя модели острой гипобарической гипоксии и острого алкогольного отравления.

Острую гипобарическую гипоксию моделировали у крыс в стеклянной барокамере в атмосфере низкого давления, (230,40 мм рт. ст.), что соответствует высоте 9000 м над уровнем моря. В первые минуты в камере создавали разрежение, соответствующее 5 тысяч метров (давление 405 мм рт. ст.) над уровнем моря. В каждую последующую минуту проводили «подъем» еще на одну тысячу метров. (Время пребывания крыс "на высоте" 9,0 тыс. метров над уровнем моря - 5.0 минут).

Острое алкогольное отравление вызывали введением мышам линии Balb/c массой 20-25 г этанол в дозе 8 г/кг подкожно.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили путем определения средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение.

Поскольку в условиях стресса основным источником АФК являются митохондрии, необходимо было разработать модель имитирующую стресс, т.е. найти условия, при которых будет увеличиваться продукция АФК митохондриями, а, следовательно, будет активироваться ПОЛ [12]. Эту задачу мы решили, разработав модель «старения» (инкубация митохондрий печени крыс в солевой среде при комнатной температуре). Для активации ПОЛ митохондрии на 15 мин помещали в 0,5 мл среды, содержащей 70мМ КСl, 10 мМ НЕРЕС и 1мМ KH_2PO_4 , рН 7,4. Инкубация митохондрий в гипотоническом растворе КСl вызвала слабое набухание митохондрий и рост генерации АФК, что нашло отражение в увеличении интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в 3-4 раза (см. рис. 1). Введение анфена в среду инкубации митохондрий приводило к снижению флуоресценции продуктов ПОЛ и носило дозозависимую зависимость. Препарат в концентрациях 10^{-6} - 10^{-8} , 10^{-13} и 10^{-15} М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольного уровня, что указывало на антистрессовую активность анфена, наличие которой проверяли на модели острого алкогольного отравления (ОАО) и острой гипобарической гипоксии (ОГГ).

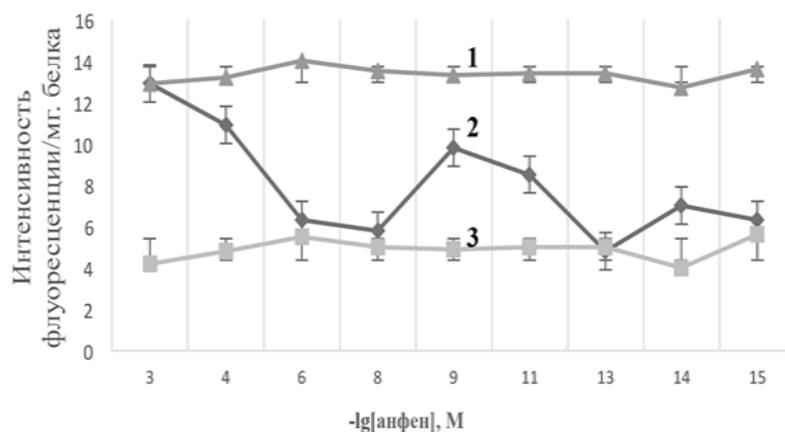


Рисунок 1 – Влияние «старения» митохондрий и различных концентраций анфена на интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (Основания Шиффа). 1 – «старение» митохондрий; 2 – «старение» митохондрий + анфен; 3 – контроль (без введения в среду инкубации митохондрий анфена)

Выбор данных моделей обусловлен активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) и дисфункцией митохондрий в условиях ОГГ и острого алкогольного отравления [13]. ОГГ и ОАО приводили к 1,5-3-кратному увеличению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс. Однократное введение крысам 10^{-6} М, 10^{-13} М анфена за 45 минут до воздействия предотвращало активацию ПОЛ (см. рис. 2, 3).

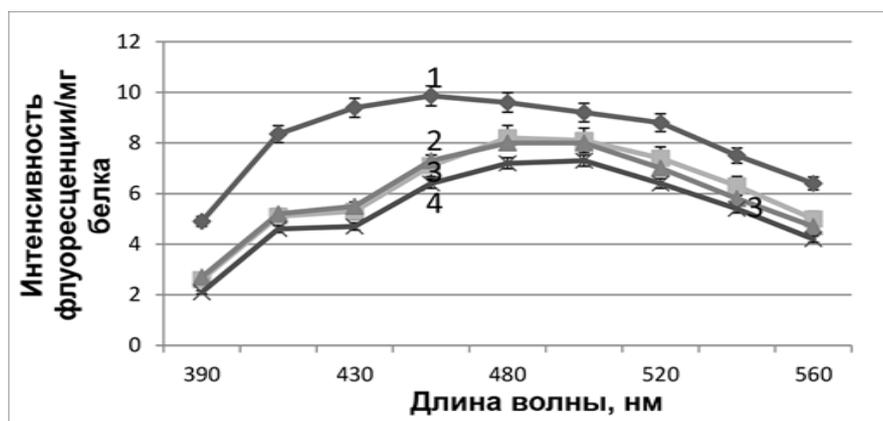


Рисунок 2 – Влияние острого алкогольного отравления (ОАО) и анфена натрия (АНФ) на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ. 1 - ОАО; 2 - ОАО+ 10^{-6} М АНФ; 3 - ОАО+ 10^{-13} М АНФ; 4- контроль

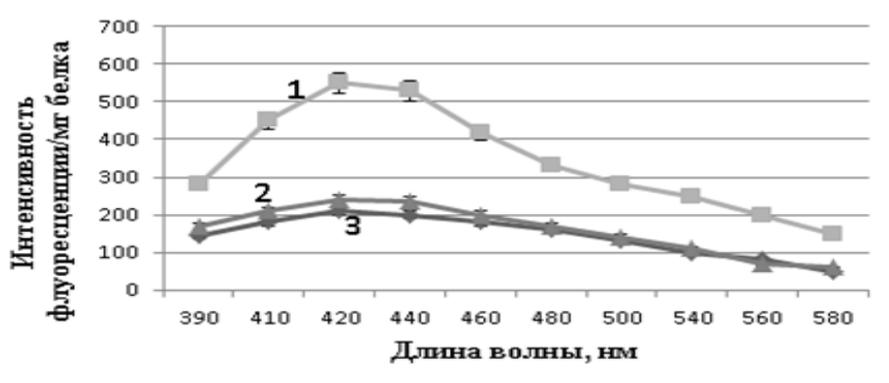


Рисунок 3 – Влияние острой гипобарической гипоксии (ОГГ) и анфена натрия (АНФ) на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ. 1 - ОГГ; 2 – ОГГ+ 10-13М АНФ; 3 – контроль

При этом однократная инъекция животным 10^{-13} М анфена вызывала изменения в характеристиках дыхания и энергетического сопряжения митохондрий. Уже через 30 мин. после введения препарата скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ возрастали на 13%, а через 1,5 часа – на 16%. Величина дыхательного контроля увеличивалась с $2,30 \pm 0,10$ до $2,83 \pm 0,02$. Скорости окисления сукцината при этом не изменялись, однако эффективность окислительного фосфорилирования возрастала на 40%. Известно, что в условиях стресса происходит снижение активности I комплекса дыхательной цепи митохондрий. При этом на 25% снижаются скорости окисления НАД-зависимых субстратов в фосфорилирующем состоянии (т.е. в присутствии АДФ) [14]. Исходя из этих данных можно предположить, что анфен, повышая активность НАД-Н-дегидрогеназного комплекса, способствует активации энергетического метаболизма клетки, что, возможно, обеспечивает повышение устойчивости организма к стрессовым воздействиям. Действительно, в условиях ОГГ происходило снижение скоростей окисления НАД-зависимых субстратов в фосфорилирующем состоянии на 24,5%. При этом максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов снижались на 29%, а эффективность окислительного фосфорилирования - на 35% (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние острой гипобарической гипоксии и анфена на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями печени крыс. (Скорости окисления представлены в нг молях O_2 /мг. белка мин). (Число экспериментов – 10).

Группа	V_0	V_3	V_4	V_3/V_4	FCCP
Контроль	$6,5 \pm 1,4$	$28,1 \pm 1,1$	$8,0 \pm 0,4$	$3,51 \pm 0,04$	$27,5 \pm 1,0$
ОГГ	$7,3 \pm 1,2$	$21,2 \pm 1,6$	$9,3 \pm 0,2$	$2,27 \pm 0,03$	$19,4 \pm 2,0$
ОГГ+ Анфен	$7,0 \pm 2,0$	$27,6 \pm 1,4$	$7,8 \pm 0,9$	$3,54 \pm 0,2$	$28,4 \pm 1,3$

Среда инкубации: содержала 0,25 М сахараза, 10 мМ трис-НCl, 2 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, 10 мМ KCl, pH 7,5. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ, 10^{-6} М FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразон), 4 мМ глутамат, 1 мМ малат.

Условные обозначения: V_0 – скорости окисления субстратов; V_3 – скорости окисления субстратов в присутствии АДФ; V_4 – скорости окисления в состоянии покоя (скорости окисления субстрата при исчерпании АДФ).

Однократное введение крысам 10^{-13} М анфена за 45 минут до воздействия предупреждало изменения в биоэнергетических характеристиках митохондрий печени.

Активация ПОЛ в условиях стресса, вызывающая изменения функциональных характеристик митохондрий, отразилась и на физиологических показателях и прежде всего на выживаемости животных в условиях гипоксии и острого алкогольного отравления. Продолжительность жизни животных в условиях различных видов гипоксии возрастала в 1,8-4,5 раза и в 3,9 раза – в условиях острого алкогольного отравления, а выживаемость животных увеличивалась на 12-40%. Кроме того, по литературным данным анфен проявлял радиопротекторные свойства. Введение его в дозе $2,5 \times 10^{-4}$ моль/кг за 15 мин. до начала воздействия повышал выживаемость животных на 40% после облучения дозой в 650 Р [15].

Исходя из полученных данных, можно предположить, что протекторная активность анфена натрия обусловлена его антиоксидантными свойствами. Препарат, предотвращая активацию ПОЛ, вероятно, предохраняет ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов мембран митохондрий, от перекисного окисления. В результате предупреждается изменение физико-химических свойств мембран митохондрий, которые, возможно, влекут за собой изменение липид-белковых взаимодействий, а следовательно, и активности связанных с мембранами ферментов. При этом сохраняется высокая функциональная активность митохондрий, обеспечивающая устойчивость организма к действию стрессовых факторов.

Список литературы / References:

1. Bachurin S.O., Shevtsova E., Kireeva E.G., Oxenkrug G.F., Sablin S.O. Mitochondria as a Target for Neurotoxins and Neuroprotective Agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003, vol. 993, pp. 334-344.
2. Robinson A.D., Ramanathan K.B., Newman K.P., Weber K.T., McGee J.E. [et al.] Oxidative stress and cardiomyocyte necrosis with elevated serum troponins: pathophysiologic mechanisms. *Am. J. Med. Sci.*, 2011, vol. 342, pp. 129-134.
3. Яременко К.В. Учение Н.В. Лазарева о СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины. *Психофармакология и биологическая наркология*, 2005, т. 5, № 4, с. 1086-1092. [Yremenko K.V. N.V. Lazarev doctrine about INRO and adaptogens as a basic theory of preventive medicine. *Psychopharmacologia and biologicheskaya narcologiya*, 2005, vol. 5, no. 4, pp. 1086-1092. (In Russ.)]
4. Тодоров И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе. *Рос. хим. Журнал*, 2007, т. 51, с. 93-106. [Todorov I.N. Mitochondria: oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in the development of pathologies, the aging process and apoptosis. *Russian. Chem. Journal*, 2007, vol. 51, pp. 93-106. (In Russ.)]
5. Kirkinezos I.G., Moraes C.T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell & Developmental Biology*, 2001, vol. 12, pp. 449-457.
6. Vladimirov Yu.A., Olenev V.I., Suslova T.V., Cheremisina Z.V. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.*, 1980, vol. 17, no. 1, pp. 173-249.
7. Munoz-Pinedo C., Guio-Carrion A., Goldstein J.C., Fitzgerald P., Newmeyer D.D., Green D.R. Different mitochondrial inter membrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *PNAS*, 2006, vol. 103, no. 31, pp. 11573-81.
8. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю., Кайгородова Н.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В., Радзивил Т.Т., Крат И.В. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе. *Цитология*, 2009, т. 51, № 4, с. 329-334. [Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Chasovskikh N.Yu., Kaigorodova N.V., Starikova E.G., Starikov Yu.V., Radzivil T.T., Krat I.V. The role of redox-dependent signaling systems in the regulation of apoptosis in oxidative stress. *Cytologiya*, 2009, vol. 51, no. 4, pp. 329-334. (In Russ.)]
9. Tailor N.L., Day D.A., Millar A.H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. *J. of Exp. Botany*, 2003, vol. 55, no. 394, pp. 1-10.
10. Ковтун Г.А. Реакционная способность взаимодействия фенольных антиоксидантов с пероксильными радикалами. *Катализ и нефтехимия*, 2000, № 4, с. 1-9. [Kovtun G.A. Reactivity of the interaction of phenolic antioxidants with peroxy radicals. *Cataliz and neftehimiya*, 2000, no. 4, pp. 1-9. (In Russ.)]
11. Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. Activation of the external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. *BBA*, 1977, vol. 501, pp. 415-423.
12. Pryor W.A., Porter N.A. A suggested mechanism for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Research and Communications*, 1990, vol. 8, pp. 541-543.
13. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции. *Бюл. эксперим. биол. мед.*, 1997, т. 124, № 9, с. 244-254. [Lukyanova L.D. Bioenergetic hypoxia: concept, mechanisms and methods of correction. *Bul. Experiment. Biol. And medecina.*, 1997, vol. 124, no. 9, pp. 244-254. (In Russ.)]
14. Paradies G., Petrosillo G, Pistolesse M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circulation Research*, 2004, vol. 94, pp. 53-59.
15. Володькин А.А., Ерохин В.Н., Бурлакова Е.Б., Заиков Г.Е., Ломакин С.М. Строение и биологические свойства 1-карбоксо-1-(N-метиламид)-2-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-пропанатов натрия и калия. *Хим. физика*, 2013, т. 32, № 2, с. 66-72. [Volodkin A.A., Erokhin V.N., Burlakova E.B., Zaikov G.E., Lomakin S.M. The structure and biological properties of 1-carboxy-1-(N-methylamide)-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propanates of sodium and potassium. *Journal of Physicheskoy Khimii*, 2013, vol. 32, no. 2, pp. 66-72. (In Russ.)]

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ИНУЛИНАЗЫ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет
Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ
e-mail: marinaholyavka@yahoo.com

Аннотация. В сравнительном аспекте исследованы структурно-функциональные, физико-химические и кинетические свойства инулиназ из различных продуцентов. Проведен анализ методов их иммобилизации, т.е. закрепления на нерастворимых полимерных матрицах очищенных ферментов или ферментных систем, что приводит к стабилизации каталитической активности препаратов и превращает их в технологически более удобные гетерогенные катализаторы. Рассмотрены некоторые пути и перспективы практического использования иммобилизованных инулиназ.

Ключевые слова: инулиназа, иммобилизация, гетерогенные биокатализаторы.