

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Диссертационный совет Д. 03.10.418.

На правах рукописи

УДК 577.1:577.3

МОЛДАЛИЕВ ЖООМАРТ ТУМАКОВИЧ

**ОБРАЗОВАНИЕ ОКСИДА АЗОТА И ИЗМЕНЕНИЯ
МЕТАЛЛОФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ
ПРИ ГИПОКСИИ И ПОД ДЕЙСТВИЕМ МЕКСИДОЛА**

Специальность: **03.01.04** - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Бишкек – 2012

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля (ИБХФ РАН) и на кафедре ботаники, общих биологических дисциплин и методики преподавания биологии (МПБ) Ошского государственного университета

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Жумабаева Таасилкан Токтомаматовна

**Официальные
оппоненты:** Доктор биологических наук, профессор
Жумашев Жайгали Жумашевич

Кандидат биологических наук, доцент
Ахматова Айгуль Токтосуновна

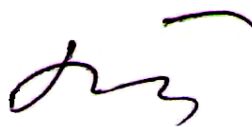
Ведущая организация: Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины при Национальном центре кардиологии и терапии при Министерстве здравоохранения Кыргызской Республики им. академика Мирсаида Миррахимова (720040, Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. Тоголок Молдо, 3).

Защита состоится «12» апреля 2012г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д. 03.10.418. Институте биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: 720071, г. Бишкек, проспект Чуй, 265.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: г. Бишкек, проспект Чуй, 265а.

Автореферат разослан «___» _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, с.н.с.



Корчубекова Т. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Вопросы, связанные с продуцированием оксида азота (NO) в организме и механизмами его регулирования, являются чрезвычайно актуальными в связи с той ролью, которую играет это соединение в ряде важнейших биохимических процессов в клетках и тканях человека и животных.

Сегодня трудно назвать функцию организма, в регуляции которой NO не принимал бы участия. NO обеспечивает способность макрофагов убивать опухолевые клетки и бактерии, служит нейромедиатором в центральной нервной системе, регулирует свертываемость крови, тонус сосудов и артериальное давление (R.F. Furchgott, 1989; S.Monkada et al, 1993, 1989; K. Nathan, 1983). В последнее десятилетие показано, что NO является регулятором не только вышеуказанных процессов, но и множества других биохимических процессов в организме.

При этом, особый интерес представляет изучение изменений продукции оксида азота (NO) в крови и тканях органов, поскольку в настоящее время уже определенно показано, что оксид азота является одним из наиболее важных регуляторных молекул в организме.

Гипоксия (или недостаточность кислорода) является одной из наиболее часто встречающихся состояний организма. Практически любые экстремальные условия и любой патологический процесс прямо или косвенно связаны с нарушением кислородной обеспеченности организма.

А гипоксия и вызванные ею метаболические нарушения являются ведущими патогенетическими факторами всех тяжелых осложнений при экстремальных состояниях самого различного генеза (М.А. Алиев 1971., М.М. Миррахимов 1974,1978., А.А. Айдаралиев 1978,1988., А. Алдашев 1984, А.А. Алдашев 1998, Ф.З. Меерсон 1984., Ж.А. Чотоев 1985., В.М. Яковлев 1994., Р.Р. Тухватшин., 1995., А.С. Шаназаров 1999., З.В. Куроптева 2009., Л.М. Байдер 2009., В.П. Реутов 2000, 2010).

Изучению метаболических изменений в организме, вызываемых недостатком кислорода, было посвящено большое количество исследований (Ф.З. Меерсон 1984., Е.Б., Манухина 1989). Было установлено, что в условиях гипоксии вместо аэробного обмена преобладает гликолиз, происходит быстрое истощение запасов глюкозы и гликогена, АТФ и креатинфосфата. В связи с этими изменениями метаболизм сдвигается в сторону катаболизма. Наблюдается активация процессов протеолиза, свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов (Е.Б. Бурлакова 1980).

Практически нет таких обменных процессов, которые бы не изменялись в связи с гипоксией. Поэтому важным является изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе развития патологий, для направленного выбора способов, предотвращающих или снижающих нарушения, вызываемые действием гипоксии, нитросоединений.

Связь темы диссертации с крупными научными программами, основными научно-исследовательскими работами проводимыми научными учреждениями. Тема диссертации входит в состав программы «Влияние оксида азота и совместное действие радиации и нитросоединений на живые организмы» кафедры ботаники, общих биологических дисциплин и методики преподавания биологии (МПБ) Ошского государственного университета, номер госрегистрации № 0005742.

Цель исследования. Выявить влияние мексидола и острой гипоксии на образование оксида азота и на парамагнитные центры тканей органов и крови лабораторных животных.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние мексидола на железосерные центры дыхательной цепи митохондрий печени и сердца.

2. Определить влияние мексидола на образование оксида азота как отдельно, так и при совместном действии с нитроглицерином.

3. Исследовать влияние гипоксии на образование оксида азота в крови крыс линии Крушинского-Молодкиной.

4. Оценить изменения парамагнитных комплексов тканей печени, сердца, мозга в условиях гипоксии как отдельно, так и при действии ингибитора NO-синтазы – нитроаргинина (L-NNA) и нитрита натрия при раздельном и одновременном введении этих соединений в организм животных.

Научная новизна полученных результатов. Впервые установлено, что мексидол уменьшает окисление железосерных центров дыхательной цепи митохондрий, что свидетельствует о поддержании энергетической функции митохондрий тканей сердца и печени животных.

Показано, что мексидол снижает окислительное действие нитроглицерина и инициирует образование оксида азота в тканях сердца и печени животных, а также повышает степень оксигенации гемоглобина.

Впервые в модельных экспериментах по исследованию гипоксии, вызванной подъемом животных на высоту 5000м, действия нитроаргинина и нитрита натрия на фоне гипоксии, показано, что гипоксия сопровождается увеличением интенсивности сигнала ЭПР Гем-NO комплексов в крови животных, а, следовательно, и увеличением продукции оксида азота.

Практическая значимость полученных результатов. Полученные в работе данные имеют фундаментальный характер и вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов действия оксида азота при гипоксии и окислительном стрессе. Новые данные о механизмах совместного действия мексидола и нитроглицерина являются приоритетными и могут быть использованы в клинике при разработке схем лечения мексидолом.

Результаты исследования о механизмах совместного действия мексидола и нитроглицерина могут быть использованы в учебном курсе по физиологии,

биохимии и молекулярной биологии для студентов высших учебных заведений.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Антиоксидантный препарат мексидол защищает железосерные центры дыхательной цепи митохондрий тканей сердца и печени животных от окислительных повреждений.

2. Действие мексидола вызывает образование оксида азота в тканях сердца и печени животных. Мексидол повышает степень оксигенации гемоглобина.

3. Гипоксия, вызванная подъемом животных на высоту 5000 м, приводит к повышенному синтезу оксида азота в организме животных.

4. Нитрит натрия, как донор оксида азота, также увеличивает содержание NO при гипоксии.

Личный вклад соискателя. Автором лично получены экспериментальные материалы, проведенные в лаборатории регуляции биоэнергетических и иммунных процессов в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля (ИБХФ РАН) г. Москве. Автор лично участвовал в их анализе, а также в подготовке и написании диссертации и выводов по ней.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертации доложены на: 5-ой национальной научно-практической конференции с международным участием “Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека”, г. Смоленск, (2007г); Молодежной научной конференции “ИБХФ РАН - ВУЗы”, г. Москва, (2007г); 8-ой международной молодежной конференции ИБХФ РАН- ВУЗы “Биохимическая физика”, г. Москва, (2008г); 7-ой молодежной научной конференции “ИБХФ РАН – ВУЗы”. “Биохимическая физика”, г. Москва, (2009г); Пятом Московском международном конгрессе «Биотехнология: Состояние и перспективы развития», г. Москва, (2009г); Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: Экология крупных городов», г.Москва, (2010г); на конкурсе молодых учёных на лучшую научно-исследовательскую работу за 2010г, проведенного в рамках Форума молодых учёных Кыргызской Республики (10 ноября 2010 год).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 8 научных статей и 3-тезиса доклада.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 121 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3-х глав собственных исследований, их обсуждения и выводов. Работа иллюстрирована 1 схемой, 19 рисунками, 6 таблицами. Библиографический указатель содержит 173 источника из них-72 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава I. В первой главе приведен обзор литературы по теме диссертации. Проанализированы, образование оксида азота в организме, его

роль в биохимических процессах в сердце, мозге при гипоксии и окислительном стрессе. Раскрыта физико-химическая характеристика оксида азота, показана природа парамагнитных центров в тканях животных.

Глава II. Материалы и методы исследования. В опыте были использованы мыши-самцы колонии SHK массой 20-22г, содержащиеся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. В ряде экспериментов использовали мышей линии C57BL/6, а также крыс линии Крушинского-Молодкиной (самцы в возрасте 5-6 мес., весом 280-320г). Объектами изучения служили образцы крови и тканей печени, селезенки, сердца, почек, мозга животных без воздействия (контроль) и различными воздействиями (экспериментальные). Процедуры в эксперименте выполняли в соответствии с положениями Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Препараты. В экспериментах были использованы мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат, синтезированный в ИБХФ РАН) и сукцинат в концентрации $2,5 \times 10^{-3} \text{M}$ в трис-буфере (pH=7,2), нитроглицерин $6 \times 10^{-6} \text{M}$ (Институт новых технологий РАМН) в трис-буфере (pH=7,2).

Спектры электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) измеряли на радиоспектрометрах X-диапазона ESR 300 фирмы «Bruker-Analitishe-Messtechnik» (ФРГ), оснащенных ЭВМ со стандартными программами. Полученные результаты обрабатывали статистическим методом Стьюдента Фишера с вычислением средней арифметической величины (M), средней ошибки ($\pm m$), показателей достоверности (t и P). Величину P, меньшую 0,05, рассматривали как показатель достоверных различий (О.Ю. Реброва, 2006).

Глава III. Результаты собственных исследований и их обсуждение.
Влияние мексидола на дыхательную цепь митохондрий сердца, печени и на образование оксида азота в клетках. В опытах *in vitro* было изучено как непосредственное действие мексидола на ткани сердца и печени экспериментальных животных, так и совместное действие его с нитроглицерином (НГ) на состояние железосеросодержащих центров (ЖСЦ) митохондрий и гемсодержащими белками в составе целостных тканей животных.

Ткани сердца. На рис.1 приведены спектры ЭПР тканей сердца, инкубированных в течение 24 час при комнатной температуре в присутствии мексидола и без него (контрольные образцы, с добавлением только физиологического раствора). В спектрах ЭПР тканей сердца в норме наблюдаются, в основном, сигналы, обусловленные компонентами цепи электронного транспорта (дыхательной цепи) митохондрий – это сигнал железосерных центров 1-го комплекса Грина с g-фактором 1,94 (ЖСЦ, центры N-1b НАДН-дегидрогеназного комплекса) и синглетный сигнал ЭПР в свободнорадикальной области с g-фактором 2,003, обусловленный флаво и убисемихинонами.

Как видно из рисунка 1 и в таблице 1, в присутствии мексидола интенсивность сигнала ЖСЦ снижалась не более, чем вдвое в течение всего

времени инкубации, в то время как в контрольных образцах тканей сердца за сутки инкубации разрушались в разных опытах до 70-90 % ЖСЦ (сигнал с $g=1,94$).

На наш взгляд, в контрольных образцах тканей сердца окисление ЖСЦ при инкубации было катастрофическим в отличие от тканей печени, где имеется ряд природных систем антиоксидантной защиты ткани (см. ниже – рис.3.3).

Рис.1. Спектры ЭПР тканей сердца в норме (1) и после инкубации в течение 24 час при комнатной температуре в присутствии мексидол-(2) и физраствора контрольный образец-(3). Условия регистрации спектров: мощность СВЧ 20 мВт, амплитуда модуляции магнитного поля 5 Гс, температура 77⁰ К.

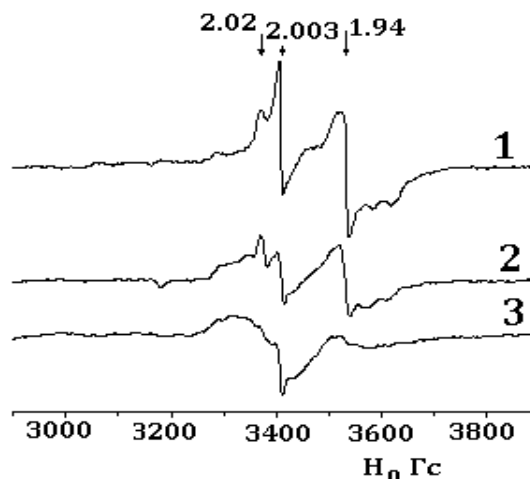


Таблица 1- Изменение интенсивности сигналов ЭПР ЖСЦ в тканях сердца при инкубации с мексидолом и физиологическим раствором.

В норме, 0 час (1)	Мексидол (2)	Физраствор, Контроль (3)
	24 час	
138	60	18
140	60	20
145	65	22
135	57	17
144	62	20
140,4 ± 4,15	60,8 ± 2,94	19,4 ± 1,9

Примечание – Здесь и в других таблицах коэффициент достоверности обозначен звездочками: Мексидол по отношению к в норме $p=0,01$ а для контроль к в норме $p=0,00024$

ЖСЦ N-1b регистрируются в восстановленном состоянии и

являются наиболее легко повреждаемыми участками дыхательной цепи при любых патологических процессах в клетке, включая и все окислительные процессы. При этом интенсивность сигнала ЖСЦ снижается, поэтому по снижению интенсивности сигнала ЖСЦ можно судить об уровне нарушений в дыхательной цепи митохондрий.

В связи с тем, что молекула мексидола в воде диссоциирует на две составляющие части–сукцинат и гидроксипиридин, в работе исследовали также их влияние на ЖСЦ дыхательной цепи митохондрий сердца. Ткани были инкубированы отдельно с сукцинатом (янтарной кислотой) и гидроксипиридином при тех же условиях, что и с мексидолом.

Под действием этих препаратов были исследованы изменения интенсивности сигналов ЖСЦ в спектрах ЭПР образцов целостных тканей сердца при инкубации при комнатной температуре (18-20⁰) С.

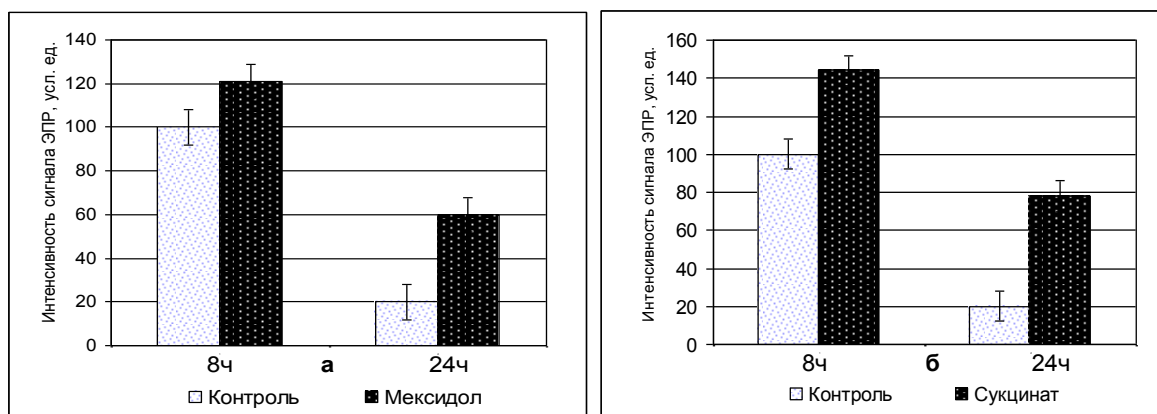


Рис. 2. Изменение интенсивности сигнала ЭПР железосерных центров дыхательной цепи митохондрий сердца после инкубации в течение 8 ч и 24ч с: а - мексидол, б- сукцинат.

Таблица 2- Изменение интенсивности сигналов ЭПР ЖСЦ в тканях сердца при инкубации с физиологическим раствором, мексидолом и сукцинатом.

Контроль	Мексидол	Сукцинат
8 час		
107	115	148
95	132	139
103	120	137
98	118	152
100,7 ± 5,3	121 ± 7**	144 ± 7**
24 час		
22	66	80
24	58	76
17	56	85
18	63	74
20 ± 3	60 ± 4,5**	78,7 ± 7**

Примечание - Для 8 час - мексидол по отношению к контролю $p=0,0187$, сукцинат по отношению к контролю $p=0,0196$. Для 24 час - мексидол по отношению к контролю $p=0,02092$, сукцинат по отношению к контролю $p=0,0194$.

Полученные данные о влиянии мексидола и сукцината на железосерные центры (ЖСЦ) дыхательной цепи митохондрий тканей сердца представлены на рис.2 и в таблице 2. Как показано на рис. 2 и в таблице 2, при инкубации как с мексидолом, так и с сукцинатом и янтарной кислотой наблюдается защитное действие этих соединений на ЖСЦ. К 8 час инкубации интенсивность сигнала ЖСЦ в образцах с мексидолом была выше, чем в контрольных (с физраствором) примерно на 20 усл. единиц, а к 24 часу почти на 40 единиц. Через 24 часа интенсивность сигнала ЭПР ЖСЦ составляла не менее 50% по сравнению с 8 часами. Для гидроксипиридина значительных изменений интенсивности сигналов ЖСЦ в тканях по отношению к контролю не наблюдали.

Как известно, антиоксидантные препараты применяются в клинике на фоне базисной кардиальной терапии, включающей нитросоединения и, прежде всего, препараты нитроглицерина. Физиологическое действие нитросоединений обусловлено их способностью выделять оксид азота при биотрансформации в клетке (З.В. Куроптева, В.Е. Шубин (1983), О.Л. Белая, И.Г. Фомина, Л.М.Байдер, З.В. Куроптева (2006).

Поэтому нами также было исследовано влияние совместного действия мексидола и нитроглицерина на процесс образования оксида азота, который методом ЭПР можно контролировать по появлению нитрозильных комплексов Гем-NO.

Ткани печени. В спектрах ЭПР исследовали образцы тканей печени (рис.3), после инкубации с нитроглицерином и мексидолом (1), нитроглицерином отдельно (2). Внизу (3) показан спектр ЭПР, полученный при вычитании спектра 2 из спектра 1. Разностный спектр полностью обусловлен нитрозильными комплексами Гем-NO. Изменение интенсивности этих сигналов приведены в таблице 3.

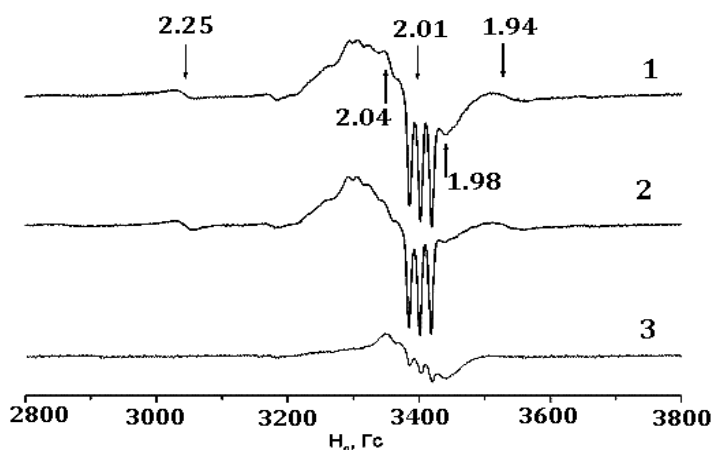
Таблица 3 - Изменение интенсивности сигналов ЭПР нитрозильных комплексов Гем-NO в тканях печени при инкубации с нитроглицерином (НГ) и нитроглицерином + мексидолом (НГ+М).

Нитроглицерин + Мексидол (1)	Нитроглицерин (2)	Разностный спектр (НГ+М) – (НГ) (3)
450	370	80
470	380	90
480	380	100
460	375	85
$465 \pm 12,9^{**}$	$376,25 \pm 4,78^{**}$	$88,75 \pm 4,26^{**}$

Примечание- При сравнении групп Печень-НГ+М и Печень- НГ (столбики 1 и 2) уровень достоверности (P) $p = 0,021$. (** $p < 0,05$). При сравнении групп Разностный спектр (столбик3) и Печень-НГ+М (столбик 1) уровень (P) достоверности $p=0,021$.

В образцах тканей печени после инкубации с НГ помимо обычно наблюдаемых в печени интактных животных сигналов ЖСЦ с g-фактором 1,94 (центры N-1b НАДН-дегидрогеназного комплекса дыхательной цепи митохондрий) и цитохрома P-450 с $g_1=2,42$ и $g_2=2,25$, регистрировался интенсивный сигнал с характерным триплетным расщеплением при $g=2,01$.

Рис. 3. Спектры ЭПР образцов тканей печени, отобранные через 24 ч после начала инкубации с нитроглицерином и мексидолом (1), нитроглицерином отдельно (2). Внизу (3) показан спектр ЭПР, полученный при вычитании спектра 2 из спектра 1. Условия регистрации спектров: мощность СВЧ 20 мВт, амплитуда модуляции магнитного поля 5 Гс, температура 77 К.



Это хорошо известный сигнал, который обусловлен нитрозильными комплексами гемового железа с оксидом азота Гем-NO (З.В. Куроптева, О.Н. Пастушенко (1985), З.В. Куроптева, Т.Т. Жумабаева (1986).

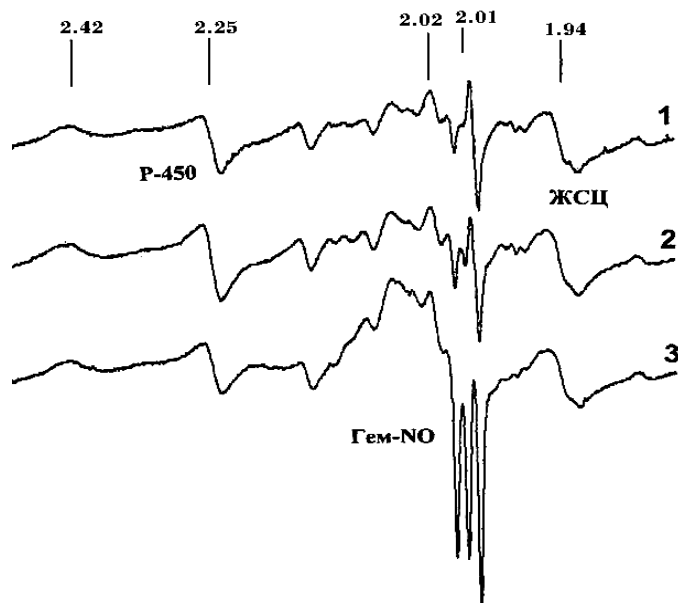
В спектрах ЭПР печени этот сигнал обусловлен нитрозильными комплексами двух гем-содержащих белков: Гем-NO и цитохром P-450-NO.

Появление комплексов Гем-NO является свидетельством, зарегистрированного впервые в работе З.В. Куроптевой и О.Н.Пастушенко, и в настоящее время уже хорошо известного эффекта образования большого количества NO при восстановительной биотрансформации НГ в организме и регистрируемого также в гомогенатах тканей. Ранее было показано, что молекулы гемоглобина, находящиеся в различных конформационных состояниях, при взаимодействии с NO приводят к появлению различающихся по форме спектров ЭПР.

Результирующая форма спектров ЭПР нитрозильных комплексов Гем-NO будет определяться соотношением оксигенированных – R и неоксигенированных - T конформеров гемоглобина. Появление в спектрах ЭПР, после введения комплекса мексидола и нитроглицерина, компонентов при g-факторах 2,04 и 1,98 на рис.3.(1) свидетельствует об увеличении доли комплексов, обусловленных оксигенированной формой гемоглобина. Эти данные указывают на то, что присутствие мексидола способствует повышению степени оксигенации гемоглобина.

На рис.4. приведены спектры ЭПР образцов тканей печени мышей, отобранных через 30 мин после начала инкубации с физиологическим раствором - (1), мексидолом в концентрации $2,5 \times 10^{-3} \text{M}$ - (2) , и нитроглицерином в концентрации $6 \times 10^{-6} \text{M}$ - (3).

Рис.4. Спектры ЭПР образцов тканей печени мышей, отобранных через 30 мин после начала инкубации с физиологическим раствором - (1), мексидолом в концентрации $2,5 \times 10^{-3} \text{M}$ - (2), и нитроглицерином в концентрации $6 \times 10^{-6} \text{M}$ - (3). Условия регистрации спектров: мощность СВЧ 20 мВт, амплитуда модуляции магнитного поля 5 Гс, температура 77⁰К.



Как видно из рисунка 4 в образцах тканей печени уже через 30 мин после инкубации с НГ, помимо обычно наблюдаемых в печени интактных животных сигналов ЖСЦ с g-фактором 1.94 (центр N-1b NADH-дегидрогеназного комплекса) и цитохрома P-450 с $g=2.42$ и $g=2.25$, регистрировался интенсивный сигнал нитрозильных комплексов Гем-NO (рис.4.3.) с характерным триплетным расщеплением при $g = 2.01$, появление которого свидетельствует об образовании большого количества NO при биотрансформации НГ в гомогенате печени.

Нами было изучено также влияние совместного действия мексидола и НГ на ЖСЦ в тканях печени. Данные приведены на рис. 5.(а – ЖСЦ) и в таблице 4. Интенсивность сигнала ЭПР ЖСЦ в процессе инкубации тканей печени в течение 26 ч при комнатной температуре с мексидолом и НГ, также как и в тканях сердца, снижалась.

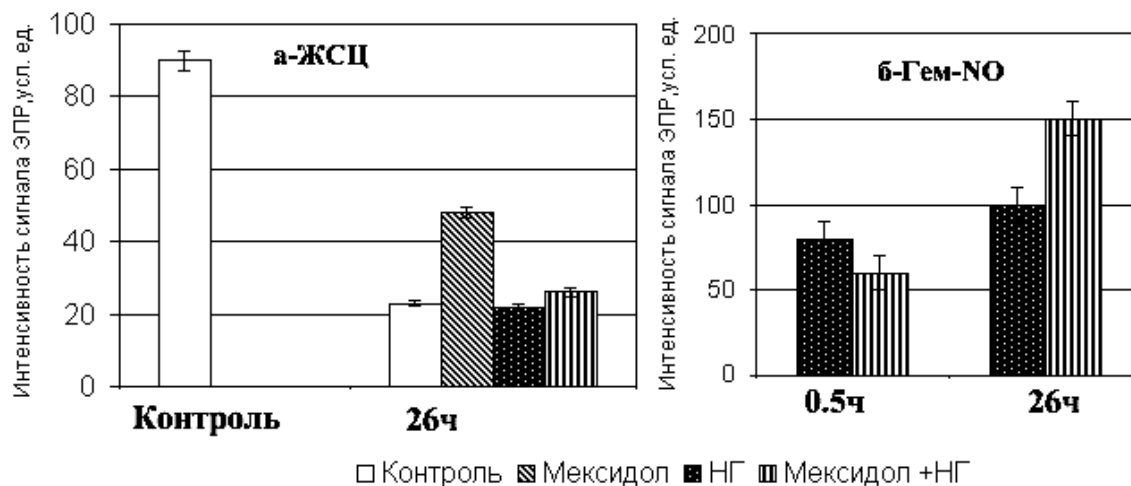


Рис.5. Интенсивность сигналов ЭПР в процессе инкубации тканей печени с мексидолом ($2,5 \times 10^{-3} \text{M}$), НГ ($6 \times 10^{-6} \text{M}$) и их совместном действии. а – ЖСЦ; б- Гем-NO;

Таблица 4 - Изменение интенсивности сигналов ЖСЦ в спектрах ЭПР печени при действии мексидола, нитроглицерина и их совместном действии

Контроль, начало опыта	Контроль	Мексидол	Нитроглицерин	Мекс.+ НГ
0,5час	26 час			
83	28	42	24	25
87	25	46	18	21
84	26	39	22	23
79	21	45	23	24
$83.25 \pm 3,3$	$25 \pm 2,9$	$43 \pm 3,2^{**}$	$21,8 \pm 2,6$	$23,3 \pm 1,7^{**}$

Примечание - Мексидол по отношению к контролю $p = 0,021$, ($**p < 0,05$). Мексидол по отношению к Мексидол+НГ $p = 0,020$;

Наибольшее снижение, связанное с окислением ЖСЦ (примерно в 3.4 раза), происходило в присутствии НГ.

Использование комбинации мексидола и НГ также способствовало окислению ЖСЦ, хотя и в меньшей степени - активность ЖСЦ снижалась примерно в 2.9 раза. Активность ЖСЦ через 26 ч инкубации с мексидолом снизилась всего в 1.2 раза, в контрольном образце - в 3 раза. Использование одного мексидола защищало ЖСЦ от окисления, и интенсивность сигнала ЖСЦ через 26 ч инкубации тканей печени с мексидолом была выше по сравнению с контролем в 1.5 раза.

Полученные данные свидетельствуют о способности мексидола, как и в случае с тканями сердца, защищать ЖСЦ дыхательной цепи митохондрий печени от окисления, в том числе индуцированного НГ, поддерживая функционирование цепи электронного транспорта митохондрий и, следовательно, энергообеспечение клеток.

Таблица 5 - Изменение интенсивности сигналов Гем-NO в спектрах ЭПР печени при действии нитроглицерина и их совместном действии (Мексидол +НГ)

Нитроглицерин	Мексидол + Нитроглицерин
0,5 час	
82	67
79	63
86	72
80	70
$81,8 \pm 3,1$	$68 \pm 3,9^{**}$
26час	
104	160
95	154
97	151
100	156
$99 \pm 3,9$	$155 \pm 3,8^{**}$

Примечание - Для 26 часов Мексидол+НГ по отношению к НГ $p=0,0208$.

На рис.5.(б-Гем-NO) и в таблице 5 показано увеличение интенсивности сигнала комплексов Гем-NO в образцах печени с НГ отдельно и (мексидол+НГ) во времени (в 1.5 раза через 26ч инкубации в присутствии НГ, в 2.8 раза в присутствии мексидола и НГ). В исходных образцах – в начале опыта – сигнала нитрозильных комплексов не наблюдается.

То есть количество образующегося NO в тканях печени было выше при использовании мексидола. Анализ спектров ЭПР образцов, инкубированных с мексидолом, и контрольных образцов показал, что в образцах тканей печени после инкубации с мексидолом образуется NO.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований показали, что мексидол проявляет многоплановое положительное действие, как при отдельном использовании, так и при совместном действии с нитроглицерином: он увеличивает выход NO, что способствует релаксации сосудов. К тому же, при клиническом использовании мексидол может снижать отрицательное действие нитроглицерина на митохондрии, защищая ЖСЦ от окисления, и повышать степень оксигенации гемоглобина.

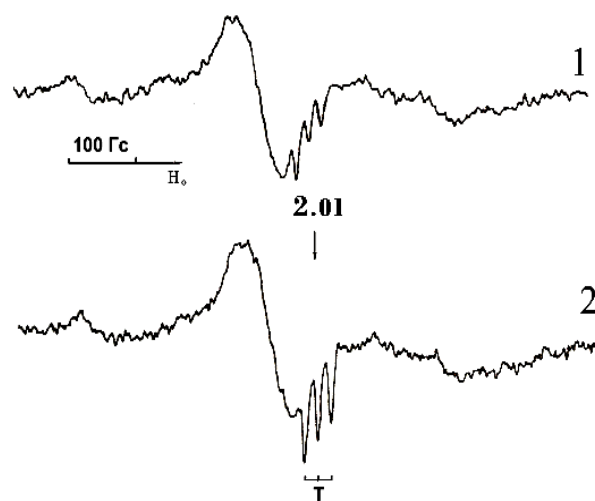
Действие острой гипоксии, нитрита натрия и нитроаргинина на образование оксида азота и на парамагнитные центры в тканях органов животных.

Кровь. На рис.6. приведены спектры ЭПР крови крыс линии Крушинского-Молодкиной в контроле (без каких-либо воздействий) – спектр (1) и после воздействия гипоксии- спектр (2). Наблюдаемый сигнал обусловлен суперпозицией двух сигналов ЭПР: сигнала ЭПР плазменного белка церулоплазмينا с g-фактором 2,05 и сигнала нитрозильных комплексов Гем-NO–широкий сигнал с триплетным расщеплением при $g = 2,01$, характерным для T-конформеров гемоглобина.

Из-за перекрывания этих двух сигналов, сравнимых по интенсивности, спектр ЭПР имеет несколько необычный вид. Анализ этих экспериментальных

данных показал, что “подъем” на высоту 5000 м крыс линии Крушинского-Молодкиной приводит к достоверному повышению содержания Гем-NO комплексов не только в крови, но и в селезенке (рис.6). Были также исследованы органы: мозг, сердце, печень, легкое. Однако сигнал ЭПР парамагнитных Гем-NO комплексов в этих органах мы наблюдали только в экспериментах с введением NaNO_2 . Это связано, по-видимому, с тем, что количество крови в образцах тканей этих органов в начальных опытах было недостаточным для ЭПР-регистрации. Таким образом, экспериментальные результаты показали, что наилучшие условия для генерации и / или сохранения комплексов NO с гемовым железом имеют место именно в крови и в селезенке крыс линии Крушинского-Молодкиной.

Рис. 6. Спектры ЭПР Гем-NO комплексов, образующихся в крови крысы линии КМ в контроле(1) и при гипоксии (2) в барокамере ($h = 5000$ м; $t=1$ ч). Вертикальная стрелка - величина g -фактора сигнала ЭПР Гем-NO комплексов, равная 2.01. Горизонтальная стрелка – направление и масштаб развертки магнитного поля (H_0). Т - триплетная сверхтонкая структура (СТС).



Лишь в некоторых случаях комплексы Гем-NO могут возникать в крови или в отдельных органах. Одним из таких исключений из общего правила могут быть крысы линии Крушинского-Молодкиной. Сам факт образования Гем-NO комплексов в крови контрольных животных линии Крушинского-Молодкиной указывает на то, что у крыс этой линии идет повышенный синтез NO по сравнению, например, с крысами линии *Wistar* или беспородными животными.

В последующих сериях наших опытов мы попытались выяснить источник появления NO в крови крыс этой линии и оценить, как гипоксия влияет на этот процесс. На рис.7 и в таблице 6 представлены данные, отражающие изменения содержания Гем-NO комплексов в 7 экспериментальных вариантах. Показано, что в присутствии ингибитора NO-синтазы – L-NNA, введенного в дозе 2,5 мг/100 г массы тела, интенсивность сигнала ЭПР Гем-NO комплексов снижалась в среднем в 2,5 раза ($15,2 \pm 3,7$ отн. ед. в контроле и $6,0 \pm 2,4$ отн. ед. в опыте) (рис.7. а (1, 2)).

Этот факт может свидетельствовать о том, что значимым источником NO у опытных животных является повышенный уровень NO-синтазы, а ингибитор ее–L-NNA снижает выход NO благодаря своей способности частично блокировать образование оксида азота из L-аргинина на уровне фермента NO-синтазы. Однако гипоксия, вызванная подъемом крыс линии Крушинского-Молодкиной на высоту 5000 м, привела к обратному эффекту.

Интенсивность сигнала ЭПР Гем-NO в крови крыс при гипоксии на фоне действия ингибитора NO-синтазы L-NNA (4) оказывалась выше в 1,5 раза по сравнению с общим контролем (1) (рис.7. а. (1,4)), в 1,2 раза больше чем под действием острой гипоксии (2) и в 4,2 раза превысила ту концентрацию, когда крысам вводили только L-NNA (3), (рис.7. а (3,4)).

Эти данные, возможно свидетельствуют о появлении дополнительного источника NO организме крыс линии Крушинского-Молодкиной, который эффективно работает в условиях гипоксии, т.е. при недостатке кислорода в тканях. Такими дополнительными источниками могут быть, по нашему мнению, молекулы L-NNA, которые содержат в своем составе нитрогруппу (-NO₂). Другим эндогенным источником NO, как известно, являются нитриты. Нитриты в условиях дефицита кислорода способны, как было ранее показано в работе В.П. Реутов, Я.И. Ажипа и др.(1983), восстанавливаться до NO гемоглобином крови, находящимся в дезокси-форме.

Эти данные могут свидетельствовать о появлении дополнительного источника NO организме крыс линии Крушинского-Молодкиной, который эффективно работает в условиях гипоксии, т.е. при недостатке кислорода в тканях.

В связи с этим мы сочли целесообразным более детально исследовать влияние гипоксии на фоне отдельного (б) и одновременного действия NaNO₂ и L-NNA(7). Гипоксия, вызванная подъемом на высоту 5000 м крыс линии Крушинского-Молодкиной, (рис. 7. б (5,6)) в присутствии NaNO₂ (0,5 мг/100 г массы тела), приводила к повышению интенсивности сигнала ЭПР Гем-NO комплексов в 2,2 раза ($194 \pm 22,4$ – в присутствии только одного NaNO₂ (5) и 407 ± 43 – гипоксия на фоне действия NaNO₂ (6))

Полученные экспериментальные данные позволяют высказать предположение, что при использованной концентрации NaNO₂ вполне можно пренебречь образованием NO в результате работы NO-синтаз, поскольку интенсивность Гем-NO комплексов в этом случае была на порядок больше по сравнению с контролем ($194 \pm 22,4$ в присутствии NaNO₂ (5) и $15,2 \pm 3,7$ отн. ед. – в контроле (1)). Основным механизмом образования NO из ионов NO₂⁻, могло быть одноэлектронное восстановление нитритов в NO дезоксигемоглобином (В.П.Реутов, Я.И. Ажипа, Л.П. Каюшин (1983), К. Cosby, К.S. Partovi, J.H. Crawford et al. (2003).

Интересно было выяснить, как может измениться выход Гем-NO комплексов при сочетанном воздействии NaNO₂ и L-NNA.

Проведенные эксперименты показали, что в присутствии L-NNA (2,5 мг/100 г массы тела) и NaNO₂ (0,5 мг/100 г массы тела) гипоксия, вызванная подъемом на высоту 5000 м крыс линии Крушинского-Молодкиной, приводит к резкому (рис.7. б. (7)) повышению интенсивности сигнала ЭПР Гем-NO комплексов – в 6,7 раза по сравнению с интенсивности сигнала ЭПР Гем-NO комплексов с NaNO₂ (рис. 7. б (5)).

Исходя из этого, мы предлагаем следующий механизм для объяснения данного экспериментального факта. В эксперименте 7 (рис.7.) в крови

присутствуют одновременно нитрит и нитроаргинин – два источника NO, метаболизирующих по восстановительному пути, и пути эти пересекаются.

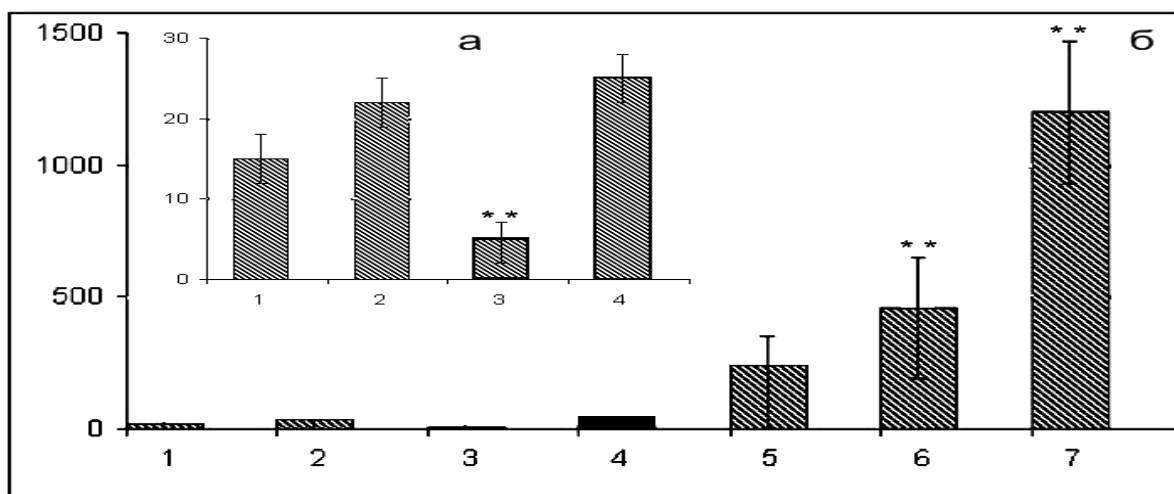


Рис. 7. Изменение содержания Гем-NO комплексов в крови при семи экспериментальных вариантах: без введения NaNO₂ (1-4) и на фоне введения 0,5 мл /100 г массы тела NaNO₂ (5-7): 1 – контроль; 2 – после “подъема животных” на высоту 5000 м (гипоксия); 3 – на фоне введения ингибитора NO-синтазы L-NNA (2,5 мг/100 г масса тела); 4- на фоне введения ингибитора NO-синтазы L-NNA (2,5 мг/100 г масса тела) «подъем» на высоту 5000 м; 5 – на фоне введения NaNO₂ (0,5 мл /100г массы тела); 6 – на фоне введения NaNO₂ (0,5мл /100г массы тела); «подъем» на высоту 5000 м; 7 – на фоне введения ингибитора NO-синтазы L-NNA (2,5мг/100 г масса тела) и введения NaNO₂ (0,5 мл /100 г массы тела) «подъем» на высоту 5000м. Врезка - более детальное представление вариантов (1-4) без введения NaNO₂. Звездочками обозначено: ***p*<0,05.

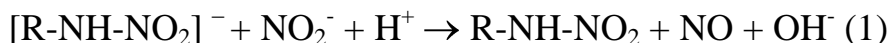
Таблица 6- Изменение интенсивности сигналов ЭПР нитрозильных комплексов Гем-NO в спектрах ЭПР крови в норме и при указанных в таблице воздействиях

Контроль (1)	Высота 5000м (2)	Ингибитор (3)	Ингиб.+ высота 5000м (4)	Нитрит натрия (5)	Нитрит+ высота 5000м (6)	Нитрит+ ингибитор+ высота (7)
13	18	5	21	176	364	986
20	17	4	17	228	380	1460
18	21	3	19	200	426	996
14	27	7	24	164	490	1134
11	26	9	25	204	375	1390
			31	192	396	1080
			30		418	1340
15,2±3,7	21,8 ± 4.5	5,6±2.4**	23,8±5,3	194±22,4	407±43**	1198±195,5**

Примечание - 1) «ингибитор» по отношению к «контролю» *P*=0,009, (** *p* < 0,05);
2) «ингибитор+высота+нитрит» по отношению к «нитрит+высота» *P*=0,017.

Наиболее вероятным центром такого пересечения, по нашему мнению, может быть анион-радикал нитроаргинина. Анион-радикал нитроаргинина

передает электрон нитрит-иону или азотистой кислоте и возвращается в исходное электронейтральное состояние, а нитрит-анион или азотистая кислота, приняв электрон, далее распадается с выделением NO (реакция 1).

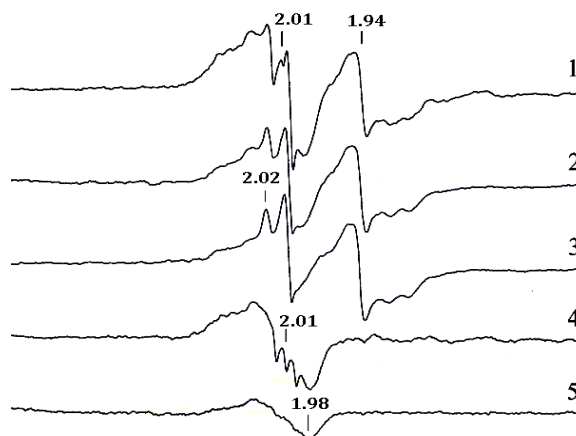


Таким образом, в проведенных исследованиях было показано, что у крыс линии Крушинского-Молодкиной в контроле идет повышенный синтез NO, и эта особенность, вероятней всего, обусловлена более высокой активностью NO-синтаз у данной линии животных. Вместе с тем гипоксия, вызванная подъемом животных на высоту 5000м, сопровождалась дальнейшим увеличением интенсивности сигнала ЭПР Гем-NO в крови животных. В настоящее время, с нашей точки зрения, нельзя однозначно ответить на вопрос, какова природа всех источников увеличения выхода NO в условиях гипоксии.

На основе полученных в настоящей работе экспериментальных данных можно высказать предположение, что в условиях гипоксии активируется как NO-синтазная, так нитро- и нитритредуктазная компоненты, участвующие в образовании NO и Гем-NO комплексов.

Ткани сердца. На рис. 8. показаны спектры ЭПР образцов тканей сердца животных: 1 – «подъем на высоту» с введением нитрита натрия в дозе 0,5 мг/100 г массы тела; 2 – после «подъема на высоту»; 3 – контрольный образец; 4 - спектр ЭПР, полученный при вычитании спектра 3 из спектра 1; 5 - спектр ЭПР, полученный при вычитании спектра 3 из спектра 2.

Рис. 8. Спектры ЭПР образцов ткани сердца животных: 1–«подъем на высоту» с введением нитрита натрия в дозе 0,5 мг/100 г массы тела; 2 – после «подъема на высоту»; 3 – контрольный образец; 4 - спектр ЭПР, полученный при вычитании спектра 3 из спектра 1; 5 - спектр ЭПР, полученный при вычитании спектра 3 из спектра 2. Условия регистрации спектров: мощность СВЧ 20 мВт, амплитуда модуляции магнитного поля 5 Гс, температура измерения 77 К.



После «подъема на высоту» форма спектра меняется незначительно, но при вычитании спектров 2 и 3 в разностном спектре наблюдается широкий сигнал незначительной интенсивности с g-фактором 2,02, обусловленный нитрозильными комплексами Гем-NO (5).

Образующийся при гипоксии оксид азота взаимодействует с гемоглобином, что приводит к образованию нитрозильных комплексов Гем-NO. Причем, форма сигнала ЭПР комплексов указывает на связывание NO с R-конформерами гемоглобина (оксигенированными гемоглобинами).

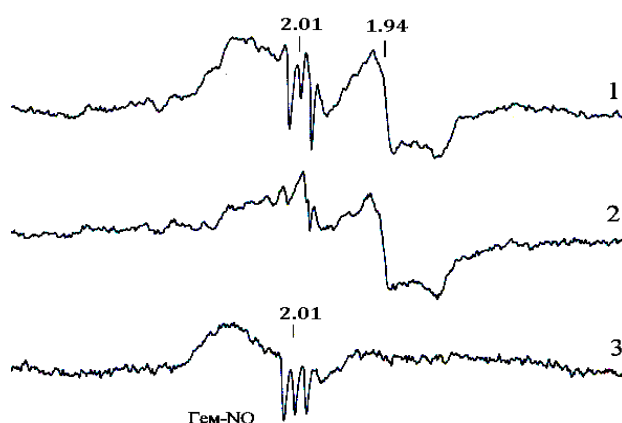
Показанная на сигнал (5) компонента сигнала с g -фактором 1,98 обусловлена этим видом комплексов Гем-NO. При вычитании спектра ЭПР образцов тканей сердца контрольных животных из спектра ЭПР образцов тканей сердца животных после «подъема на высоту» с введенным предварительно нитритом натрия регистрируется сигнал ЭПР, показанный на рис. 8.(4). Это сигнал ЭПР нитрозильных комплексов Гем-NO, компоненты сигнала комплексов, в которых NO связывается Т-конформерами гемоглобина (дезоксигемоглобина). Регистрация этого сигнала указывает на недостаток кислорода в крови в этих условиях. Увеличение продукции NO в присутствии ингибитора NO-синтаз оказалось несколько неожиданным. Но такой же эффект наблюдался ранее в крови этих же животных в условиях гипоксии, в то время как в обычных условиях нитроаргинин снижал выход NO в крови (рис.7.(3)).

Было сделано предположение, что в условиях гипоксии нитроаргинин сам может становиться источником оксида азота, как это было показано для восстановительной биотрансформации нитросоединений в организме в работе Н.Н.Н.W. Schmidt, Н. Hofmann, Р. Ogilvie (1995).

Мозг. Двойственная роль NO в ишемической патологии мозга и эпилептических судорожных состояниях определяется целым рядом факторов, среди которых выделяют активность конститутивных и индуцибельных NO-синтаз, концентрацию NO и продуктов его превращения, интенсивность кислородного голодания, стадию развития ишемического поражения нейронов мозга и ряд других факторов. В тканях мозга, в отличие от тканей сердца, после введения нитрита натрия сигнал нитрозильных комплексов Гем-NO практически не регистрировался.

На рис.9. в спектрах ЭПР образцов мозга после гипербарической гипоксии на фоне введенных заранее нитрита натрия и нитроаргинина (1) сигнал ЭПР комплексов Гем-NO значительно увеличивался. В чистом виде он был выделен при вычитании спектра 2 из спектра 1.

Рис. 9. Спектры ЭПР образцов тканей мозга животных: 1 - «подъем на высоту» после введения нитрита натрия и нитроаргинина (2,5 мг/100 г массы тела); 2 - после введения нитрита натрия; 3 - спектр ЭПР, полученный при вычитании спектра 2 из спектра 1.



Из этого следует, что при использовании комплекса всех изучаемых воздействий вместе мозг испытывает больший недостаток в кислороде, чем сердце. Известно, что железосерные центры, обуславливающие наблюдаемый сигнал ЭПР с g -фактором 1,94, находятся в восстановленном состоянии. В

условиях увеличения окисленности (или при увеличении факторов окисления) интенсивность этого сигнала снижается.

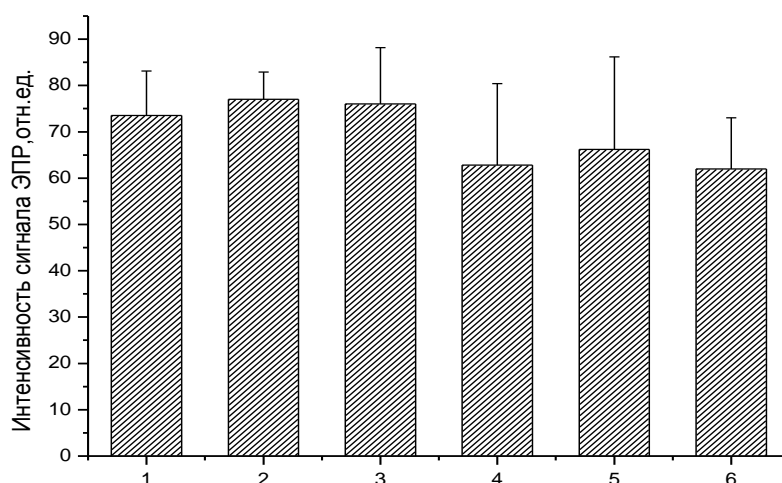
Ткани печени. На рис. 10. показано изменение интенсивности сигнала ЭПР цитохрома Р-450 при всех изучаемых воздействиях. Можно видеть, что значительных изменений до введения нитрита натрия не наблюдается, а при гипоксии на фоне введения нитрита происходит снижение интенсивности этого сигнала.

Это значит, что при гипоксии незначительно снижается активность системы гидроксилирования и детоксикации с участием цитохрома Р-450.

Рис.10. Печень.

Изменение интенсивности сигнала ЭПР цитохрома Р450.

1. Контроль;
2. С добавлением L-NNA;
3. L-NNA+ высота 5000м;
4. NaNO_2 ;
5. NaNO_2 + высота 5000м;
6. NaNO_2 + высота +L-NNA

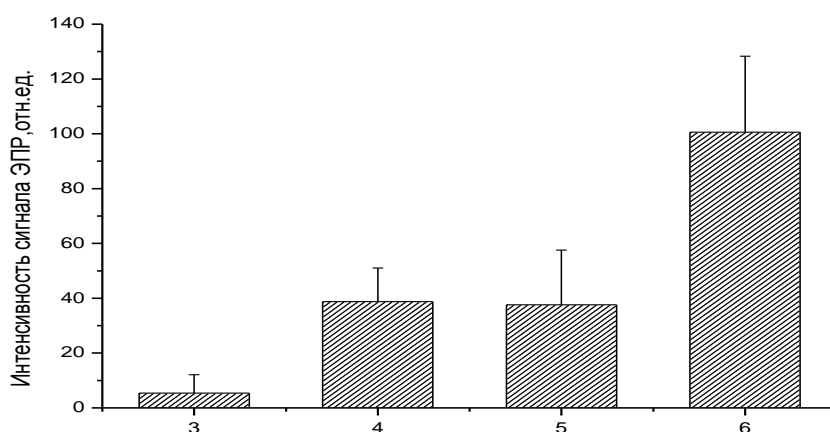


На рис. 11. показана интенсивность сигнала нитрозильных комплексов Гем-NO в образцах печени животных при гипоксии с введенными нитритом натрия и нитроаргинином. Также как и в крови, в печени наблюдается значительное увеличение количества нитрозильных комплексов при совместном действии всех изучаемых факторов.

Рис. 11. Печень.

Изменение интенсивности сигнала ЭПР Гем-NO.

3. L-NNA+ высота 5000м;
4. NaNO_2 ;
5. NaNO_2 +высота 5000м;
6. NaNO_2 +высота +L-NNA



Таким образом, полученные данные показали, что гипоксия приводит к дополнительному образованию оксида азота в организме. Нитрит натрия, как донор оксида азота, также увеличивает содержание NO при гипоксии.

Ингибитор NO-синтаз – нитроаргинин, в условиях гипоксии не ингибирует образование оксида азота, так как в присутствии его и нитрита натрия оксида азота образуется больше, чем при гипоксии с введенным нитритом натрия.

В условиях гипоксии он сам, как обычное нитросоединение, восстанавливается и становится дополнительным источником NO в организме.

ВЫВОДЫ

1. Мексидол поддерживает активное функциональное состояние железосерных центров (ЖСЦ) цепи электронного транспорта митохондрий, способствуя улучшению энергообеспечения клеток и защите тканей сердца и печени от окислительных повреждений.
2. Мексидол как отдельно, так и при совместном действии с нитроглицерином вызывает *увеличение* образования оксида азота в тканях сердца и печени животных. Мексидол снижает окислительное действие нитроглицерина на железосерные центры дыхательной цепи митохондрий. Мексидол повышает степень оксигенации гемоглобина.
3. Гипоксия приводит к дополнительному образованию оксида азота в *крови* крыс линии Крушинского-Молодкиной.
4. Как при гипоксии, так и при совместном действии с нитроаргином и нитритом натрия в тканях сердца интенсивность сигналов ЭПР железосерных центров повышается; в тканях мозга наблюдается стабильное снижение интенсивности этих сигналов, что свидетельствует о благоприятном воздействии гипоксии на железосерные центры в сердце и угнетающем действии в мозге. Показано, что в условиях гипоксии L - нитроаргинин, как обычное нитросоединение, восстанавливается и становится дополнительным источником NO в организме.
5. Впервые установлено, что мексидол инициирует образование оксида азота, повышает степень оксигенации гемоглобина. Впервые в модельных экспериментах по исследованию действия острой гипоксии и действию нитроаргина, нитрита натрия на фоне гипоксии показано, что гипоксия сопровождается увеличением продукции оксида азота.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Антиоксидантный препарат мексидол поддерживает продукцию оксида азота в тканях животных [Текст] / Ж.Т. Молдалиев, Л.М. Байдер, О.Л. Белая, З.В. Куроптева и др. // Материалы 7 молод. Науч. Конф. “ИБХФ РАН – ВУЗы”. “Биохимическая физика”. (Москва, 9-11 ноябр. 2009г.). – М., 2009.- С. 175-178.
2. Действие Мексидола на биоэнергетические процессы и оксигенацию гемоглобина в тканях сердца и мозга животных [Текст] / Ж.Т. Молдалиев, О.Л. Белая, Л.М. Байдер, З.В. Куроптева и др. // Материалы Пятого Моск.

Международ. Конгр. «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, 16-20 марта 2009 г.). – М., 2009.- С. 178-179.

3. Изучение методом ЭПР влияния гипоксии на образование оксида азота и парамагнитные центры в тканях сердца животных в присутствии нитрита натрия и нитроаргинина [Текст] / Ж.Т. Молдалиев, Л.М. Байдер, З.В. Куроптева, Т.Т. Жумабаева, А.Л. Крушинский, В.П. Реутов. // Вестн. ОшГУ. Сер. Естеств. наук. - 2010. - № 6.-С.179-184.

4. Повышение продукции оксида азота в тканях животных под действие мексидола [Текст]/ Ж.Т. Молдалиев, О.Л. Белая, Т.Т. Жумабаева, З.В. Куроптева // Изв. НАН Кырг. Респ. - 2010.- № 1 – С. 123-127.

5. Молдалиев, Ж.Т. Изучение молекулярных механизмов действия мексидола на образование оксида азота в клетках и степени оксигенации гемоглобина [Текст] / Ж.Т. Молдалиев, Т.Т. Жумабаева // Вестн. Ош ГУ. Сер. Естеств. наук. - 2010. - № 3.-С.35-38.

6. Молдалиев, Ж.Т. Изучение методом ЭПР влияния гипоксии на образование оксида азота и парамагнитные центры в тканях мозга животных в присутствии нитрита натрия и нитроаргинина [Текст] / Ж.Т. Молдалиев // Изв. Ош ТУ. Сер. Естеств. наук. - 2010. - № 1. - С.79-82.

7. Молдалиев, Ж.Т. Исследование методом ЭПР влияния гипоксии на образование оксида азота и парамагнитные центры в тканях печени животных в присутствии нитрита натрия и нитроаргинина [Текст] / Ж.Т. Молдалиев // Вестн. ОшГУ. Сер. Естеств. наук.- 2010г. - № 4.-С.114-117.

8. Молдалиев, Ж.Т. Действие гипоксии (высокогорья), нитрита натрия и нитроаргинина на образование оксида азота и на парамагнитные центры в тканях животных [Текст] / Ж.Т. Молдалиев// «Наука и новые технологии». Раздел биохимия.- 2010г - № 6. С.58-61.

9. Молдалиев Ж.Т. О возможности регулирования продукции оксида азота в лейкоцитах и макрофагах [Текст] / Л.Г.Наглер, Л.М.Байдер, З.В.Куроптева // Материалы молод. науч. конф. “ИБХФ РАН - ВУЗы”. Москва, ноябрь 2007 г.- М.,2007.-С. 210.

10. Коррекция нарушений антиоксидантного статуса крови мексидолом и кудесаном при ишемической болезни сердца с дислипидемией [Текст] / О.Л.Белая, К.Ю.Бондар, Л.М. Байдер, З.В. Куроптева, Ж.Т. Молдалиев, Н.Е. Артамошина // Московская междунар. Науч. Прак. конф. «Биотехнология: Экология крупных городов».16-17 марта 2010 г.-М.,2010.- С. 469-470.

11. Экспериментальное и клиническое изучение действия мексидола на биоэнергетические процессы в тканях сердца животных и сократительную функцию миокарда больных ишемической болезнью сердца [Текст] / Ж.Т. Молдалиев, О.Л. Белая, Л.М. Байдер, З.В. Куроптева и др. // Материалы 8 междунар. молод. конф. ИБХФ РАН, - Вузы “Биохимическая физика” (Москва, 11-13 ноябр. 2008 г.). – М.,2008.- С. 307-311.

РЕЗЮМЕ

диссертации Молдалиева Жоомарта Тумаковича на тему «Образование оксида азота и изменения металлоферментных комплексов в тканях животных при гипоксии и под действием мексидола» представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Ключевые слова: гипоксия, оксид азота, NO-синтазные, нитроредуктазные, нитритредуктазные системы, Гем-NO комплексы, ЭПР, мексидол, нитроглицерин, in vivo, in vitro.

Объекты исследования: Объектами исследования служили образцы крови и тканей печени, селезенки, сердца, почек, мозга лабораторных животных.

Цель исследования: Выявить влияние мексидола и острой гипоксии на образование оксида азота и на парамагнитные центры тканей органов и крови лабораторных животных.

Методы исследования: Спектры ЭПР измеряли на радиоспектрометрах X-диапазона ESR 300 фирмы «Bruker-Analitishe-Messtechnik» (ФРГ), оснащенных ЭВМ со стандартными программами.

Полученные результаты и их новизна: Впервые установлено, что мексидол уменьшает окисление железосерных центров дыхательной цепи митохондрий, что свидетельствует о поддержании энергетической функции митохондрий тканей сердца и печени животных.

Показано, что мексидол снижает окислительное действие нитроглицерина и инициирует образование оксида азота в тканях сердца и печени животных, а также повышает степень оксигенации гемоглобина.

Впервые в модельных экспериментах по исследованию гипоксии, вызванной подъемом животных на высоту 5000м, и действия нитроаргинина и нитрита натрия на фоне гипоксии, показано, что гипоксия сопровождается увеличением интенсивности сигнала ЭПР Гем-NO комплексов в крови животных, а, следовательно, и увеличением продукции оксида азота.

Практическая значимость: Полученные в работе данные имеют фундаментальный характер и вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов действия оксида азота при гипоксии и окислительном стрессе. Новые данные о механизмах совместного действия мексидола и нитроглицерина являются приоритетными и могут быть использованы в клинике при разработке схем лечения мексидолом.

Степень внедрения и экономическая эффективность: Основные положения диссертационной работы могут включаться в содержание занятий по физиологии, биохимии, биофизики, биоэнергетике, молекулярной биологии, фармакологии.

Область применения: физиология, биохимия, биофизика, молекулярная биология, фармакология, медицина.



Молдалиев Жоомарт Тумаковичтин “Жаныбарлардын ткандарында азот кычкылынын пайда болуусуна жана металлоферменттик комплекстердин өзгөрүүсүнө гипоксиянын жана мексидолдун тийгизген таасири” деген темада 03.01.04 – биохимия адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты илимий даражасына изденүү үчүн жазылган диссертациянын кыскача

КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: гипоксия, азот кычкылы, NO-синтаздар, нитроредуктаздар, нитритредуктаздар системалары, Гем-NO комплекстери, ЭПР, мексидол, нитроглицерин, in vivo, in vitro.

Изилдөө объектилери: Жаныбарлардын ткандары: кан, боор, көк боор, жүрөк, бөйрөк, мээлердин жасалган үлгүлөр изилдөө объектилеринин кызматын аткарат.

Изилдөөнүн максаты: Мексидолдун жана курч гипоксиянын таасиринде лабораториялык жаныбарлардын ткандарында, органдарында жана канынында парамагниттик борборлорунда азот кычкылынын пайда болуусун изилдөө.

Изилдөө ыкмасы: Стандарттык ЭВМ программасы менен жабдылган ESR 300, «Bruker-Analitishe-Messtechnik» (ФРГ) фирмасынын радиоспектрометри колдонулду.

Алынган жыйынтыктар жана жанылыктар: Мексидол митохондриянын дем алуу чынжырындагы темир-күкүрт борборлорунун кычкылданышын төмөндөтөөрү натыйжада ал жаныбарлардын жүрөк жана боор ткандарынын энергетикалык функциясына көмөк көрсөткөндүгү аныкталган;

Мексидол нитроглицериндин кычкылдандыргыч таасирин төмөндөтүү менен жүрөктүн жана боордун ткандарында азот кычкылынын пайда болуусун көрсөткөндүгү жана андан соң гемоглобиндин кычкылтектенүү даражасын жогорулаткандыгы байкалып толукталып көрсөтүлгөн;

Биринчи жолу кычкылтеги төмөндөтүлгөн шартта моделдик экспериментте салыштырмалуу 5000 м бийиктикте, нитроаргининдин жана натрийдин нитратынын азот кычкылынын өзгөрүүсүнө тийгизген таасирин изилдөөдө: - гипоксия Гем-NO нитрозилдик комплексинин ЭПР сигналынын интенсивдүүлүгүнүн жогорулашына, демек жаныбарлардын органдарында жана ткандарында азот кычкылынын пайда болуусунун да салыштырмалуу өскөндүгү изилденди.

Пайдалануу боюнча сунуштар: Алынган маалыматтар фундаменталдык мүнөздө болуп, гипоксияда жана кычкылдантуучу стрессте азот кычкылынын таасир этүү механизминин молекулярдык негизин түшүнүүгө чоң жардам берет. Мексидолдун жана нитроглицериндин биргелешкен таасир этүү механизминин жаны маалыматтары приоритеттүү деп эсептелинип, аларды атайын клиникаларда мексидол менен даарылоо схемасын иштеп чыгууда пайдаланууга болот.

Колдонуу тармагы: Диссертациялык жумуштун негизги манызын кийинки сабактарга физиология, биохимия, биофизика, биоэнергетика, молекулалык биология, фармакология курстарында колдонсо болот.

Колдонуу чөйрөсү: физиология, биохимия, биофизика, биоэнергетика, молекулалык биология, фармакология, медицина.

RESUME

Of thesis of Moldaliev Zhoomart Tumakovich on the theme: “Formation of Nitric Oxide and changes of metallofermentic complexes in the tissues of animals under the hypoxia and under the influence of mexidole” submitted in fulfillment of the requirements for the scientific degree of the candidate of biological sciences on a specialty 03.01.04- biochemistry.

Key words: hypoxia, Nitric Oxide, NOS, nitroreductase, nitroreductase systems, Heme-NO complexes, ESR, mexidole, nitroglycerin, in vivo, in vitro.

Objects of research: the objects of the research were samples of blood and animals' liver, spleen, heart, kidneys, brain tissues.

Aim of research: reveal the influence of mexidole and acute hypoxia on the Nitric Oxide formation and on paramagnetic centers of organs tissues and blood of laboratory animals.

Methods of research: The spectra of ESR were measured on radio spectrometers of X-range ESR 300 of "Bruker-Analitishe-Messtechnik" firm (Germany) equipped by computer with the standard programs.

The results achieved and their novelty: it was established for the first time, that mexidole reduces oxidation of metal sulphur centers of a respiratory circuit mitochondrion that testifies the maintenance of power function of mitochondrion of animals' heart and liver tissues.

It was shown that mexidole reduces oxidizing action of nitroglycerine and initiates formation of Nitric Oxide in heart and liver tissues of animals, and also raises a degree of hemoglobin oxygenation.

For the first time in the model experiments on investigation of the hypoxia provoked by the animals' rise to the height of 5000 m., and the influence of nitroarginine and nitrite of sodium it was shown, that hypoxia is accompanied by increasing of signal strength of ESR Heme-NO complexes in blood of animals, and, hence, by increasing of Nitric Oxide production.

Practical value: The data received in the research have the fundamental character and bring in the essential contribution to understanding of molecular mechanisms of Nitric Oxide action under the hypoxia and oxidizing stress. The new data on mechanisms of joint action of mexidole and nitroglycerine is of priority and can be used in clinic in working out the scheme of treatment regimen by mexidole.

Degree of adoption and economic efficiency: the main points of the thesis work may be included to the contents of studies of physiology, biochemistry, biophysics, bioenergetics, molecular biology, pharmacology.

Application field: physiology, biochemistry, biophysics, molecular biology, pharmacology, medicine.

