

**ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ФРАКЦИИ ДО 5кДа ИЗ
КОРДОВОЙ КРОВИ НА ПРОЦЕССЫ СОПРЯЖЕННОГО ДЫХАНИЯ В
МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС****Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)**

Работа выполнена в ИПК и К НАН Украины в рамках НИР «Використання низьких температур для виділення біологічно активних низькомолекулярних компонентів (менше 5 кДа) з кордової крові тварин з метою отримання ранозагоюючих препаратів» (ДР№: 0105U003917).

Вступлення. Кордовая кровь содержит биологически активные вещества, продуцируемые плацентой и фетальными тканями [4, 5, 6]. Эти соединения, различные по своей природе и источнику происхождения, определяют рост и дифференцировку тканей плода, регулируют его метаболизм. На основе сыворотки и клеточных элементов кордовой крови создан ряд препаратов, относящихся к группе биогенных стимуляторов. [2, 5, 8, 9]. На сегодняшний день изучение биологического действия низкомолекулярных веществ, содержащихся в кордовой крови представляет широкий научный и практический интерес.

Известно, что в основе механизма биологической активности актовегина (Никомед, Австрия), являющегося низкомолекулярной фракцией из криогемолита крови молочных телят – источника, онтогенетически близкого к кордовой крови, – лежит стимуляция клеточного потребления кислорода и глюкозы [1].

Целью данной работы было изучить влияние низкомолекулярной фракции (до 5кДа), выделенной из цельной кордовой крови крупного рогатого скота (ФКК) на скорость потребления кислорода и эффективность окислительного фосфорилирования, происходящие при сопряженном дыхании митохондрий в гепатоцитах млекопитающих.

Объект и методы исследования. Низкомолекулярная фракция из кордовой крови крупного рогатого скота (ФКК) была получена путём последовательных процессов криогемолита, тангенциальной мембранной ультрафильтрации [3] с использованием оборудования фирмы «Sartorius»® (Германия) и лиофилирования. Перед использованием в экспериментах, лиофилированную фракцию разводили физиологическим раствором до концентрации сухого вещества аналогичной препарату сравнения актовегину (40мг/мл). Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах с соблюдением требований «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» [11]. Животные были разделены на 3 группы. Животным первой группы в течение трех суток ежедневно вводили внутримышечно раствор актовегина в дозе 20 мг сухого вещества на 1 кг веса животного [1]. Крысам второй

группы ежедневно вводили раствор ФКК в аналогичной дозировке. Крысам контрольной группы вводили 0,9 % раствор NaCl в эквивалентных объемах. Для получения гомогената, печень крыс гомогенизировали ручным гомогенизатором с тefлоновым пестиком с пятикратным разведением в среде содержащей 5 мМ ЭДТА и 300 мМ сахарозы pH 7.4 при 0оС. Измерение скорости поглощения O₂ осуществляли с помощью закрытого платинового электрода Кларка в термостатируемой ячейке по методу [12]. Скорость дыхания выражали в нМ O₂/мг белка/мин. Расчет скоростей потребления кислорода выполнялся по Чансу [10]. В качестве препарата сравнения использовался актовегин. Статистическая обработка экспериментальных данных производилась с использованием статистического программного пакета «STATGRAPHIC plus for Windows», версии 2.1. по t-критерию Стьюдента, Манна-Уитни.

Результаты исследований и их обсуждение.

В работе определяли скорость потребления кислорода при работе первого и второго пунктов сопряжения окислительного фосфорилирования на мембранах митохондрий, добавляя в ячейку полярографа соответствующие субстраты. При окислении малата и глутамата, скорость потребления кислорода гомогенатом в состоянии V₃ (фосфорилирование АДФ) в группах животных, которым вводили как ФКК, так и актовегин, достоверно превышала таковую в контрольной группе (p<0,05). Скорости разобщенного дыхания в состоянии V_{3p} [10] в обеих группах достоверно не отличались (p>0,05) от контроля (**табл. 1**). Скорость дыхания в состоянии V₄ [10], характеризующая пассивную протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий, в группах, которым вводился ФКК или актовегин, снижалась вдвое по сравнению с контролем. Вследствие описанных изменений скоростей дыхания в состояниях V₃ и V₄, величина дыхательного контроля (ДК) почти в три раза превосходила значения контрольной группы (p<0,05). Также достоверно превышали соответствующие значения в контрольной группе значения показатели скорости фосфорилирующего дыхания в описанных экспериментальных группах.

Введения крысам ФКК или актовегина также оказывало влияние на скорость сукцинат-зависимого дыхания в состоянии V₃, однако эти изменения были статистически достоверными по отношению к контролю лишь при введении ФКК (**табл. 2**). Величина ДК в данной группе также была выше, чем в контроле (p<0,05). Окисление сукцината в стационарном состоянии V₄ во всех экспериментальных группах происходило с

Таблиця 1

Влияние ФКК на показатели окислительного фосфорилирования в гомогенате печени крыс при окислении малата и глутамата ($M \pm m$)

Группы	Скорость потребления кислорода, нмоль O_2 /мг белка/мин			ДК	АДФ/О
	V_3	V_{30}	V_4		
Контроль	6,0 ± 0,2	6,19 ± 0,7	0,92 ± 0,1	8,5 ± 1,3	2,92 ± 0,4
Актовегин	*9,4 ± 0,9	8,01 ± 0,9	*0,45 ± 0,1	*24,0 ± 2,6	2,8 ± 1,2
ФКК	*8,7 ± 1,1	6,87 ± 0,4	*0,39 ± 0,03	*22,2 ± 1,8	2,89 ± 0,3

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Таблиця 2

Влияние ФКК на показатели окислительного фосфорилирования в гомогенате печени крыс при окислении сукцината ($M \pm m$)

Группы	Скорость потребления кислорода, нмоль O_2 /мг белка/мин			ДК	АДФ/О
	V_3	V_{30}	V_4		
Контроль	10,2 ± 0,93	12,6 ± 1,2	2,24 ± 0,16	4,9 ± 0,2	3,1 ± 0,4
Актовегин	11,7 ± 0,96	12,0 ± 1,2	2,1 ± 0,24	6,02 ± 0,62	3,6 ± 0,5
ФКК	*13,0 ± 1,1	11,1 ± 1,7	1,86 ± 0,28	*7,33 ± 1,3	3,9 ± 0,9

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

одинаково низкой скоростью. Внесение разобщителя окислительного фосфорилирования – динитрофенола, не вызывало повышение скорости поглощения O_2 .

Соотношение АДФ/О при использовании в качестве субстратов окисления малата и глутамата, не менялось по сравнению с контролем ($p > 0,05$) (табл. 1), что указывает на отсутствие изменения эффективности окислительного фосфорилирования.

При окислении сукцината (табл. 2) достоверно повышалась скорость потребления кислорода в состоянии V_3 в группе экспериментальных животных, которым вводили ФКК. В гомогенатах печени животных этой группы, показатели дыхательного контроля также достоверно превышали контрольные значения ($p < 0,05$). Однако введение ФКК не приводило к увеличению эффективности фосфорилирования. Величина АДФ/О несколько увеличивалась по сравнению с контролем, но это увеличение не было статистически достоверным ($p > 0,05$) (табл. 2). Введение актовегина не приводило к достоверным изменениям указанных показателей (табл. 2) сукцинат-зависимого окислительного фосфорилирования.

Таким образом, ФКК, как и актовегин, стимулирует поглощение кислорода митохондриями гомогената, увеличивая при этом сопряженность дыхания, о чем говорит достоверное повышение дыхательного контроля. При этом повышение скорости поглощения O_2 происходит в состоянии V_3 при использовании субстратов как первого (малат-глутамат), так и второго (сукцинат) пунктов сопряжения. Эффективность фосфорилирования при этом не увеличивается, так как соотношение АДФ/О остается на уровне контрольных значений. Этот факт указывает на то, что введение как актовегина, так и ФКК не приводит к изменению структурного и функционального состояния митохондрий. Полученные данные свидетельствуют и о том, что исследуемые субстанции не проявляют эффект разобщения, т.к после введения субстанций увеличивается

дыхательный контроль. Ранее было показано [7], что ФКК аналогично актовегину ускоряет утилизацию глюкозы, попадающей в кровяное русло при глюкозной нагрузке. Таким образом, можно предположить, что активация указанных показателей дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий фракцией кордовой крови (до 5 кДа) происходит вследствие активации некоторых путей метаболизма, в частности гликолиза, приводящих к увеличению выработки клеточной энергии.

Выводы

1. Низкомолекулярная фракция (до 5кДа) из кордовой крови крупного рогатого скота после трехдневного введения терапевтической дозы (эквивалент актовегина), стимулирует поглощение кислорода митохондриями гомогената печени крыс, увеличивая при этом сопряженность дыхания и скорость фосфорилирующего дыхания при использовании субстратов как первого (малата и глутамата), так и второго (сукцината), пунктов сопряжения.

2. Низкомолекулярная фракция (до 5кДа) из кордовой крови крупного рогатого скота не увеличивает эффективности фосфорилирования в митохондриях гомогената печени, так как соотношение АДФ/О остается на уровне контрольных значений. Можно предположить, что, обнаруженный стимулирующий эффект ФКК, происходит в следствии активации некоторых путей метаболизма, в частности гликолиза, приводящих к увеличению выработки клеточной энергии.

Перспективы дальнейших исследований.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии стимулирующего влияния фракции до 5 кДа из кордовой крови крупного рогатого скота на сопряженное дыхание митохондрий гепатоцитов. Изучение механизмов подобной биологической активности определяет перспективу дальнейших исследований в данной области.

Список литературы

1. Актовегин. Новые аспекты клинического применения / С.А. Румянцева [под ред. С.А. Румянцевой]. – М., 2002. – 280 с.
2. Бездітко П. А. Гемокорд у лікуванні офтальмологічних хворих / П. А. Бездітко, А. О. Цуцаєва, А. Ю. Савельєва, О. В. Кудкоцева // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1. – С. 125–126.
3. Брок Т. Мембранная фильтрация: Пер. с англ./Т. Брок–М.:Мир, 1997.–464с.
4. Гольцев А. Н. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 2. Иммунологическая характеристика / А. Н. Гольцев, Т. А. Калиниченко // Проблемы криобиологии. – 1998. – № 1. – С. 3–24.
5. Грищенко В. И. Перспективы и возможности использования плацентарной крови / В. И. Грищенко, О. С. Прокопюк // Медицинские вести. – 1997. – №4. – С. 26–27.
6. Гулевський О.К. Властивості і перспективи використання кордової крові в клінічній практиці / О. К Гулевський, В. І. Грищенко, Н. М. Моїсєєва, А. Ю. Нікольченко // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2005. – Т.5, №1. – С. 5–14.
7. Гулевский А.К., Никольченко А.Ю., Щенявский И.И. Сахароснижающий эффект фракции до 5 кДа из пуповинной крови крупного рогатого скота // Сборник «Ветеринарна медицина» Межвідомчий тематичний науковий збірник. – вип. 89, Харків. – ООО НТМТ, 2008. с. 144-147
8. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування гемопоетичних клітин кордової крові людини / Цуцаєва А. О., Грищенко В. І., Кудкоцева О. В., та ін. // Методичні рекомендації. – Харків, 2000. – 15 с.
9. Мошко Ю. А. Применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови в лечении женщин с хроническими сальпингоофоритами / Ю. А. Мошко // Проблемы криобиологии. – 2001. – №1. – С. 70-75.
10. Chance B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation I. Kinetics of oxygen utilization / B. Chance, G.R. Williams // J. Biol. Chem. – 1955. – V.217, P.383-394.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of Europe. – Strasbourg, 1986. – 53 p.
12. Somov A.Y. Mitochondrial function after liver preservation in high or low ionic-strength solutions: a comparison between UW-based and sucrose-based solution / A.Y. Somov, O.A. Semenchenko, C.J. Green, A.Y. Petrenko, B.J. Fuller // Cryo Letters. – 2009. – V.30, №1. P.1-12.

УДК 577.121.7:615.361.018.5.013.8

ВПЛИВ ПОПЕРЕДНЬОГО ВВЕДЕННЯ ФРАКЦІЇ ДО 5КДА З КОРДОВОЇ КРОВІ НА ДИХАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ГОМОГЕНАТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Гулевський О.К., Нікольченко А.Ю., Сомов О.Ю., Щенявський І.І., Петренко О.Ю.

Резюме. Показано, що низькомолекулярна фракція (до 5 кДа) з кордової крові великої рогатої худоби при введенні *in-vivo* збільшує швидкість споживання кисню мітохондріями гепатоцитів, збільшуючи при цьому сполученість дихання і швидкість окислювального фосфорилування, при використанні субстратів першого (малат і глутамат) і другого (сукцинат) пунктів сполучення.

Ключові слова: низькомолекулярна фракція кордової крові, актовегін, зв'язане дихання мітохондрій.

УДК 577.121.7:615.361.018.5.013.8

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ФРАКЦИИ ДО 5КДА ИЗ КОРДОВОЙ КРОВИ НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГОМОГЕНАТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС

Гулевский А.К., Никольченко А.Ю., Сомов А.Ю., Щенявский И.И., Петренко А.Ю.

Резюме. Показано, что низькомолекулярная фракция (до 5 кДа) из кордовой крови крупного рогатого скота при введении *in-vivo* увеличивает скорость потребления кислорода митохондриями гепатоцитов, увеличивая при этом сопряженность дыхания и скорость окислительного фосфорилирования, при использовании субстратов первого (малат и глутамат) и второго (сукцинат) пунктов сопряжения.

Ключевые слова: низькомолекулярная фракция кордовой крови, актовегін, сопряженное дыхание митохондрий.

UDC 577.121.7:615.361.018.5.013.8

Influence Of The Fraction Below 5 kDa From Cattle Cord Blood On Respiratory Activity Of Rat Liver Homogenates

Gulevsky A.K., Nikolchenko A.Yu., Somov A.Yu., Shenyavsky I.I., Petrenko A.Yu.

Summary. It was shown that the low molecular fraction (below 5 kDa) from cattle cord blood increased an oxygen consumption in hepatocyte mitochondria. Besides the fraction increases coupling of mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation when substrates of complex I (malate+glutamate) and complex II-III (succinate) to be used.

Key words: cord blood low molecular weight fraction, actovegin, cord blood, coupled mitochondrial respiration.

Стаття надійшла 13.02.2012 р.