

© Горбачева С. В.

УДК: 616-008.921.7:[57.042.2+616.8-091.818]-092.4

**Горбачева С. В.**

## **ОГРАНИЧЕНИЕ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА В УСЛОВИЯХ IN VITRO ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ МОДУЛЯТОРОВ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ**

**Запорожский государственный медицинский университет (г. Запорожье)**

**swg18@yandex.ua**

Работа выполнялась на кафедре фармакологии и медицинской рецептуры Запорожского государственного медицинского университета в рамках госбюджетной темы «Молекулярно-биохимические механизмы формирования митохондриальной дисфункции нейронов головного мозга в условиях острой церебральной ишемии: новые мишени для нейропротекции» (№ государственной регистрации 0113, шифр U000797).

**Вступление.** Существенная роль в механизмах гибели нейронов при ишемическом повреждении и развитии глутамат-кальциевого каскада принадлежит NO-опосредованным механизмам. Открытие NMDA-рецепторов, которое происходит на фоне токсичных концентраций глутамата, вызывает поток ионов кальция внутрь клеток. Это в свою очередь вызывает активацию кальций-зависимой изоформы NO-синтазы и усиленное образование оксида азота, который участвует в повреждении нейронов. Механизм токсичности NO включает ковалентную модификацию белков при взаимодействии с их тиоловыми группами, а также непосредственное повреждение ДНК [5].

Особое внимание в инициации клеточной гибели уделяется тиол-дисульфидной системе (ТДС), в частности, относительно расширения представлений о механизмах цитотоксичности оксида азота. Интермедиаты ТДС обладают транспортными свойствами в отношении NO, повышая его биодоступность. Кроме того, большинство тиолов (глутатион, цистеин, метионин) способны значительно ограничивать цитотоксичность NO и его дериватов. Конкурендно связываясь с NO, глутатион образует комплекс в виде S-нитрозоглутатиона, который является депо эндогенного NO. Эта реакция предупреждает связывание молекулы NO с супероксидом и предотвращает образование пероксинитрита, как наиболее токсичного соединения для клетки. Избыток NO взаимодействует с гемовым железом и парными тиоловыми группами с образованием динитрозольного комплекса железа (DNIC). Известно, что DNIC является более сильным нитрозилирующим агентом по сравнению с оксидом азота и взаимодействует с тиоловыми группами белков, гистидином, аспаратом, глутамином, метионином, цистеином, глутатионом. В результате образуются N- и S-нитрозотиолы [2].

Глутатион – один из основных внутриклеточных тиоловых соединений, который синтезируется

почти во всех клетках. Важное значение глутатиона в редокс-зависимых процессах определяется его участием в регуляции активности транскрипционных факторов, а также тем, что он является внутриклеточным антиоксидантом и играет роль «ловушки» свободных радикалов, является косубстратом в реакциях детоксикации пероксидов, катализируемых глутатионпероксидазой (ГПО), глутатионредуктазой (ГР) и глутатионтрансферазой (GST). Сохранение оптимального для клетки соотношения восстановленного глутатиона (GSH) к окисленному (GSSG) является важным условием для ее жизнеспособности [4,9].

**Целью** данного исследования является изучение возможных механизмов прерывания пато-биохимических реакций нитрозативного стресса в условиях in vitro путем введения в инкубационную нейрональную среду модуляторов тиол-дисульфидной системы.

**Объект и методы исследования.** Для исследований in vitro нейроны выделяли из коры головного мозга 4-недельных белых беспородных крыс. Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями о гуманном отношении к экспериментальным животным, согласно «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других целях». Выделение обогащенных фракций нейронов и нейроглии проводилось в два этапа. На первом этапе мозговая ткань дезинтегрировалась с целью получения клеточной суспензии, на втором – осуществлялось дифференциальное ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы и фикола. Для получения нейронов и нейроглии крыс декапитировали, быстро вынимали мозг. Кору головного мозга отделяли от белого вещества, измельчали и переносили в раствор, содержащий 7,5% поливинилпирролидона (ПВП), 1% бычий сывороточный альбумин (БСА) и 10 мМ CaCl<sub>2</sub>. Полученную суспензию фильтровали через три сита под незначительным давлением для уменьшения потерь нейрональных клеток. После последовательного пропускания через сита клеточную суспензию наслаивали на градиент, состоящий из 1 М и 1,75 М сахарозы. Центрифугирование проводили при 60 000 g в рефрижераторной центрифуге VAC-25. В результате центрифугирования получали два слоя и плотный осадок. Верхний слой представлен остатками миелиновых оболочек, второй слой состоял из глиальных и нейрональных

клеток. Осадок представлен телами нейронов со степенью чистоты 90%. В дальнейшем проводили дополнительную очистку второго слоя путем повторной фильтрации и ультрацентрифугирования. Выделенные нейрональные клетки отмывали от сахарозы и альбумина охлажденным физиологическим раствором [6].

Для моделирования нитрозативного стресса в инкубационную среду в токсической концентрации (250 мкмоль) вносили динитрозольный комплекс железа (DNIC) [8]. После внесения иницирующего агента образцы инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C. С целью изучения влияния модуляторов тиол-дисульфидной системы на ограничение реакций нитрозативного стресса исследуемые препараты вносили в инкубационную среду за 10 минут до добавления DNIC.

Выраженность нитрозативного стресса в нейрональной суспензии оценивали по накоплению нитротирозина, который определяли иммуноферментным методом с использованием стандартного тест-набора «Nitrotyrosine ELISA Kit» («HyCult biotechnology», Нидерланды) в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией.

Состояние системы глутатиона оценивали по содержанию его окисленной и восстановленной формы, а также по активности ключевых ферментов его метаболизма – глутатионредуктазы (ГР), глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) и глутатионпероксидазы (ГПО). Содержание окисленного и восстановленного глутатиона определяли флуориметрически [8]. Активность ГР, Г-S-T и ГПО определяли спектрофотометрически [1]. Выраженность оксидативного стресса оценивали по накоплению альдегидных (АФГ) и кетонных (КФГ) производных белковых молекул в реакции с динитрофенилгидразином [8].

Результаты исследования обработаны с использованием статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0», а также «Microsoft Excel 2010». Статистическую обработку проводили с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия с уровнем значимости менее 0,05 (95%) [7].

**Результаты исследования и их об- суждение.** Проведенные исследования показали, что внесение DNIC в концентрации 250 мкг/мл приводило к повышению маркера нитрозативного стресса – нитротирозина в 3,05 раза (**табл. 1**). Кроме того, наблюдалось смещение тиол-дисульфидного равновесия в сторону окисленных тиолов, о чем свидетельствует снижение уровня глутатиона восстановленного (в 5,1 раз) и увеличение в 3,05 раза его окисленной формы, на фоне снижения активности ключевых ферментов тиол-дисульфидной системы – Г-S-T – в 3,9 раза, ГР – в 2,7 и ГПО –

в 3,46 раз по отношению к интактным пробам на 60 минут инкубации (**табл. 2**).

Развитие нитрозативного стресса вызывает снижение уровня восстановленного глутатиона за счет взаимодействия последнего с цитотоксическими дериватами NO. В подобную реакцию вступают тиоловые группы белков и пептидов, в результате чего образуются N-нитроамины, о чем может свидетельствовать повышение содержания нитротирозина. Некоторыми исследованиями установлено, что транспорт NO происходит с образованием N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, который затем нитрозилирует тиолы, еще более истощая запасы глутатиона и смещая тиол-дисульфидное равновесие [2,3]. Кроме того, неконтролируемый рост активных метаболитов NO приводит к окислению белков и инактивации ферментов, что еще более истощает антиоксидантную систему нейрона. Подтверждением этому служит выявленный рост маркеров окислительной модификации белков. Так, уровень ранних маркеров повреждения белковых молекул – альдегидных производных увеличился в 1,9 раз, а содержание более поздних кетопроизводных возросло в 2,4 раза на 60 минут инкубации после внесения DNIC (**табл. 1**).

Введение в инкубационную среду модуляторов тиол-дисульфидной системы – тиотриазолина, тиоцетама, ангиолина и α-липоевой кислоты вызывало положительный эффект в отношении изучаемых показателей. Выявленное влияние используемых препаратов было разным по выраженности, но носило однонаправленный характер. Наиболее активным в ходе исследования был ангиолин. Внесение этого модулятора способствовало сохранности тиол-дисульфидного равновесия. Из **таблицы 2** следует, что внесение ангиолина способствовало повышению восстановленного глутатиона в 3,7 раз и снижение окисленной формы в 2,4 раза. Положительный эф-

Таблица 1.

**Показатели оксидативного и нитрозативного стресса в нейрональной суспензии через 60 минут после внесения DNIC (250мкг/мл)**

Показатель	АФГ, у.е./г белка	КФГ, у.е./г белка	Нитротирозин, нмоль/г белка
Интактная суспензия	6,59 ± 2,09	3,02 ± 0,45	12,15 ± 2,18
Суспензия с добавлением DNIC	12,51 ± 1,31*	7,27 ± 1,01*	37,16 ± 4,99*
Суспензия с добавлением DNIC + тиоцетам	10,07 ± 1,17#	4,95 ± 0,68#	25,22 ± 1,88#
Суспензия с добавлением DNIC + ангиолин	8,58 ± 1,21#	4,36 ± 0,59#	18,74 ± 2,03#
Суспензия с добавлением DNIC + тиотриазолин	10,57 ± 0,72#	4,84 ± 0,57#	25,85 ± 1,22#
Суспензия с добавлением DNIC + липоевая кислота	11,63 ± 1,03	5,74 ± 0,75#	30,03 ± 2,05

**Примечание:** \* – p < 0,05 по отношению к интактной суспензии; # – p < 0,05 по отношению к суспензии с добавлением DNIC

Таблиця 2.

Состояние тиол-дисульфидной системы в нейрональной суспензии через 60 минут после внесения DNIC (250мкг/мл)

Показатель	Глутатион восстановл., мкмоль/л	Глутатион окисленный, мкмоль/л	ГПО, ммоль/(мин.* г белка)	Г-S-T, ммоль/(мин.* г белка)	ГР, ммоль/(мин.* г белка)
Интактная суспензия	2,98 ± 0,34	0,148 ± 0,024	19,07 ± 1,93	26,20 ± 3,07	12,03 ± 2,05
Суспензия с добавлением DNIC	0,58 ± 0,2*	0,452 ± 0,096*	5,5 ± 0,7*	6,73 ± 1,48*	4,42 ± 1,52*
Суспензия с добавлением DNIC + тиоцетам	1,83 ± 0,23*	0,284 ± 0,039#	10,58 ± 1,12#	16,68 ± 2,41#	7,31 ± 0,64#
Суспензия с добавлением DNIC + ангиолин	2,14 ± 0,14#	0,186 ± 0,035#	12,6 ± 1,46#	20,16 ± 1,62#	9,25 ± 1,2#
Суспензия с добавлением DNIC + тиотриазолин	1,5 ± 0,15#	0,265 ± 0,032#	9,44 ± 1,47#	15,85 ± 1,48#	7,05 ± 0,93#
Суспензия с добавлением DNIC + липоевая кислота	1,06 ± 0,12#	0,339 ± 0,057#	7,59 ± 1,08	11,9 ± 1,43#	6,12 ± 0,81#

Примечание: \* – p < 0,05 по отношению к интактной суспензии; # – p < 0,05 по отношению к суспензии с добавлением DNIC

фект выявлен и в отношении ферментов системы глутатиона, на что указывает повышение активности изучаемых ферментов: ГПО – в 2,3 раза, Г-S-T – в 3 раза, ГР – в 2,1 раза (табл. 2). Следствием такого действия явились более низкие уровни нитротирозина и маркеров окислительной модификации белков (табл. 1).

Применение других модуляторов также ограничивало реакции нитрозативного стресса за счет стабилизировавшего влияния на тиол-дисульфидное равновесие.

**Выводы**

Из выше изложенного следует, что применение модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях нитрозативного стресса способствует сохранности оптимального соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона. Это приводит к активной мобилизации тиол-дисульфидной системы и нейтрализации продуктов свободно-радикального окисления. Кроме того, увеличение функциональности ТДС в условиях нитрозативного стресса в условиях in vitro способствует повышению биодоступности оксида азота, а также уменьшает цитотоксичность его активных дериватов, что проявлялось в виде снижения уровня нитротирозина. Вероятно, что в условиях нитрозативного и оксидативного стресса, благодаря указанным механизмам, изученные средства увеличивают устойчивость нервной ткани к явлениям ишемии.

Таким образом, полученные нами результаты раскрывают значение глутатионовой системы нейрона как важной мишени нейропротективной терапии при состояниях, которые сопровождаются гиперпродукцией оксида азота и нарушением его биодоступности, а также являются экспериментальным обоснованием для клинического применения модуляторов тиол-дисульфидной системы.

Перспективами дальнейших исследований является изучение эффективности тиол-содержащих препаратов на других моделях гипоксического повреждения мозга и других тканей организма в опытах in vitro и in vivo, с целью раскрытия их регулирующего влияния на процессы метаболизма и поддержание жизнеспособности.

Перспективами дальнейших исследований является изучение эффективности тиол-содержащих препаратов на других моделях гипоксического повреждения мозга и других тканей организма в опытах in vitro и in vivo, с целью раскрытия их регулирующего влияния на процессы метаболизма и поддержание жизнеспособности.

**Литература**

1. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа / В. С. Асатиани. – М.: «Наука», 1969. – 739 с.
2. Беленичев И. Ф. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Е. А. Нагорна [и др.]. – Киев: Логос, 2015. – 512 с.
3. Василенко К. П. Окислительный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и MAP-киназ ERK 1,2 / К. П. Василенко, Е. Б. Бутова, В. Г. Антонов // Цитология – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 500 – 507.
4. Калинина Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // Успехи биол. наук. – 2014 – Т. 54. – С. 299 – 348.
5. Луцкий М. А. Окислительный стресс в патогенезе инсульта / М. А. Луцкий, Р. В. Тонких, А. П. Анибал // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2007. – Т. 107, С. 37 – 42.
6. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М. И. Прохорова. – Л.: Изд-во Ленинградского университета. – 1982. – 272 с.
7. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М., Медиасфера, 2002, 312 с.
8. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И.С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – К.: ГФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.
9. Mari M. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease / M. Mari, A. Morales, A. Colell, C. Garcia-Ruiz // Biochimica et Biophysica Acta – 2013. – Vol.1830. – P. 3317 – 3328.

УДК: 616-008.921.7:[57.042.2+616.8-091.818]-092.4

### ОБМЕЖЕННЯ НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕССУ В УМОВАХ IN VITRO ШЛЯХОМ ВИКОРИСТАННЯ МОДУЛЯТОРІВ ТІОЛ-ДИСУЛЬФІДНОЇ СИСТЕМИ

Горбачова С. В.

**Резюме.** Використання модуляторів тиол-дисульфідної системи в умовах нітрозативного стресу сприяє збереженню тиол-дисульфідної рівноваги. Використані препарати підвищують біодоступність оксиду азоту та зменшують цитотоксичність його активних дериватів. Найбільш активним серед досліджуваних засобів виявився ангиолін, використання якого сприяло збільшенню відновленого глутатіона в 3,7 разів на фоні зниження окисленої форми у 2,4 рази. Позитивний ефект спостерігався у відношенні активності ферментів – глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази та глутатіонредуктази. Наслідком такої дії було зменшення рівню нітротирозину на 49,6% і маркерів окисної модифікації білків в середньому на 35%.

**Ключові слова:** нітрозативний стресс, суспензія нейронів, тиол-дисульфідна система, глутатіон, модулятори

УДК: 616-008.921.7:[57.042.2+616.8-091.818]-092.4

### ОГРАНИЧЕНИЕ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА В УСЛОВИЯХ IN VITRO ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ МОДУЛЯТОРОВ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ

Горбачева С. В.

**Резюме.** Использование модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях нитрозативного стресса способствует сохранности тиол-дисульфидного равновесия. Используемые препараты повышают биодоступность оксида азота и снижают цитотоксичность его активных дериватов. Наиболее активным среди изучаемых препаратов был ангиолин. Его применение способствовало увеличению восстановленного глутатиона в 3,7 раза и снижению его окисленной формы в 2,4 раза. Положительный эффект отмечался в отношении активности ферментов – глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы. Следствием такого влияния было снижение уровня нитротирозина на 49,6% и маркеров окислительной модификации белков в среднем на 35%.

**Ключевые слова:** нитрозативный стресс, нейрональная суспензия, тиол-дисульфидная система, глутатион, модуляторы

UDC: 616-008.921.7:[57.042.2+616.8-091.818]-092.4

### NITROSATIVE STRESS RESTRICTION IN VITRO CONDITIONS USING MODULATORS OF THIOL-DISULFIDE SYSTEM

Gorbacheva S. V.

**Abstract.** Particular emphasis in cell death initiation is placed on thiol-disulfide system and its significance in cytotoxicity mechanisms of nitric oxide. TDS intermediates have transport properties in relation to NO and increase its bioavailability. Besides, most of the thiols are able to restrict significantly NO and its derivatives cytotoxicity. Glutathione forms s-nitrosoglutathione complex having a competitive fixation with NO, which is the depot of endogenous NO. This reaction anticipates a fixation of NO molecule with superoxide and prevents a formation of peroxyntirite, which is the most toxic compound for a cell. NO excess interacts with heme iron and binate thiol groups with a formation of dinitrosole iron combination (DNIC). It is known that DNIC is the most strong nitrosylating agent in comparison with nitric oxide and it interacts with thiol groups of proteins.

The purpose of the given investigation is to study possible mechanisms of interruption of nitrosative stress pathobiochemical reactions in conditions in vitro by means of thiol-disulfide system modulators introduction into an incubating neuronal medium.

The neurons were released from the cerebral cortex of 4 weeks old white rats for the investigations in vitro. For a modeling of nitrosative stress into an incubating medium in a toxic concentration (250 mcmmole) it was included the dinitrosole iron combination (DNIC). The performed investigations showed that DNIC introduction in concentration 250 mcg/mL caused the increase of nitrosative stress marker – nitrotyrosine in 3,05 times. Besides, it was observed thiol-disulfide balance shift into the side of oxidized thiols that is proved by the decrease of the reduced glutathione level (in 5,1 times) and the increase of its oxidized form in 3 times in case of the reduction of key enzymes activity of glutathione system – glutathione-S-transferase – in 3 times, glutathione reductase – in 2,7 times and glutathione peroxidase – in 3,46 times. Introduction thiol-disulfide system modulators such as thiotriazoline, tiocetam, angioline and  $\alpha$ -lipoic acid into an incubating medium caused a positive effect relative to studying characteristics. Revealed effect of the used drugs was various by its intensity and was unidirectional. Angioline was the most active during the investigation. Introduction of the given modulator promoted a maintenance of thiol-disulfide balance. Introduction of angioline promoted the increase of the reduced glutathione in 3,7 times and the decrease of the oxidized form in 2,4 times. Positive effect was also revealed according to the glutathione system enzymes. The increase of activity of the enzymes such as glutathione peroxidase (in 2,3 times), glutathione-S-transferase (in 3 times) and glutathione reductase (in 1 time) pointed to a positive effect that was also revealed according to the glutathione system enzymes. A consequence of the given action were more low levels of nitrotyrosine and markers of oxidative protein modification.

Application of thiol-disulfide system modulators in conditions of nitrosative stress promotes maintenance of optimal proportion of reduced and oxidized glutathione forms. That leads to active mobilization of thiol-disulfide

system and neutralization of products of free-radical oxidation. Besides, the increase of thiol-disulfide system functionality in conditions of nitrosative stress in vitro conditions promotes the increase of bioavailability of nitric oxide and also decreases cytotoxicity of its active derivatives that is shown in the decrease of nitrotyrosine level. Probably, in conditions of nitrosative and oxidative stresses due to the mentioned above mechanisms all studied resources increase cerebral tissue stability to ischemic phenomena.

The obtained results reveal a significance of glutathione system of a neuron as an important target of neuroprotective therapy in conditions accompanied by nitric oxide hyperproduction and disturbance of its bioavailability. Also these results are considered to be an experimental substantiation for clinical application of thiol-disulfide system modulators.

**Keywords:** nitrosative stress, neuronal suspension, thiol-disulfide system, glutathione, modulators.

*Рецензент – проф. Костенко В. О.*

*Стаття надійшла 22.10.2015 року*