

На правах рукописи

Сергеева Татьяна Федоровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ
КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ
ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА**

03.01.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении
Высшего профессионального образования «Нижегородская государственная
медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и
социальному развитию»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Ерлыкина Елена Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Корягин Александр Сергеевич

доктор биологических наук, профессор

Самарцев Виктор Николаевич

Ведущая организация:

ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия имени
академика Е. А. Вагнера Федерального агентства по здравоохранению и
социальному развитию»

Защита состоится « 16 » сентября 2010 года в 15⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном
университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород,
пр. Гагарина, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского
государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан « 10 » августа 2010 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

С.В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Расстройство мозгового кровообращения является одной из наиболее частых причин нарушения структуры и функций головного мозга (Мошкова и др., 2010; Lushchak et al., 1998; Mlynarik, 1998; Kasparova et al., 2000; Horecky et al., 2009).

На сегодняшний день ишемию мозга рассматривают как сложное сочетание нейрохимических процессов, основными из которых являются гипоксия, гипогликемия и ацидоз (Афанасьев и др., 2008).

Метаболизм мозга имеет выраженный аэробный тип развития. Базисной для мозга является энергетическая функция митохондрий с высоким потреблением кислорода и окислительным синтезом АТФ (Schurr, 2002). Причина повреждений нервных клеток при ишемии заложена в природу и свойства функциональных белков-ферментов, которые подвержены постоянным изменениям в процессе тканевой регуляции (Nochachka et al., 1996; Waynes, Dominiczak, 2005). Характер этих процессов, их устойчивость и обратимость лежат в основе устойчивости и обратимости молекулярных механизмов при изменении функционального состояния клетки и развитии патологического процесса.

Центральное место в процессах транспорта внутриклеточной энергии занимает креатинфосфокиназная система (Wallimann et al., 1992; Vernoux et al., 2006; Tuon et al., 2010). В мозге креатинфосфокиназа (КФК) представлена двумя изоферментами: цитоплазматическим (цтКФК) и митохондриальным (миКФК). Известно, что их активность существенно меняется при остром нарушении мозгового кровообращения (Якобсон и др., 1992; Колчина, 2006; Koufen et al., 1999; Di-Pietro et al., 2008). Тем не менее, в литературе практически отсутствуют сведения об особенностях функционирования изоферментов КФК при длительной ишемии головного мозга.

Митохондриальная креатинфосфокиназа существует в виде двух олигомерных форм: димера и октамера, способных к взаимным переходам (Липская, 2001; Schlattner et al., 2000; Hoffmann, Ellington, 2005). В опытах *in vitro* показано, что как соотношение димер/октамер, так и связывание миКФК с внутренней мембраной митохондрий представляет собой важный механизм регуляции энергетического метаболизма клеток (Schlegel et al., 1990; Speer et al., 2005). Однако практически полностью отсутствуют сведения об изменении соотношения олигомерных форм миКФК при различных патологических состояниях *in vivo*, в том числе при ишемии мозга.

Известно, что липиды мембраны являются важным фактором, обеспечивающим нормальное функционирование ферментов. Изменение их свойств может отразиться и на свойствах связанных с ними ферментов: от изменения кинетики ферментативных реакций до полной потери активности.

В течение последних лет рядом авторов была выдвинута концепция о существенной патогенетической роли окислительного стресса в повреждении ткани мозга при ишемии (Siesjo, 1999; Mattson, Liu, 2002). Происходящее при

этом изменение состояния мембран клеток может привести к нарушению взаимодействия КФК со структурными элементами митохондрий. В связи с этим представляет интерес исследование роли мембран в регуляции каталитических свойств КФК и внутримолекулярной перестройки митохондриального изофермента при длительном нарушении гемодинамики мозга.

Выяснение молекулярных механизмов действия ишемии на интегральные системы энергетического обмена имеет большое значение для разработки эффективных методов предупреждения и коррекции изменений, вызванных нарушением мозгового кровообращения. Поиск препаратов, снижающих степень нейродегенерации при ишемии мозга, остается актуальной задачей современной биологии и медицины.

В последние годы интерес исследователей прикован к изучению естественных адаптогенов, в том числе нейропептидов, различных белков и метаболитов. К ним относятся белок плазмы крови церулоплазмин (ЦП), который используется как лекарственный препарат, и пептид, индуцирующий дельта-сон (лекарственная форма – дельтаран).

Изучению механизмов действия ЦП и дельтарана при различных патологических состояниях посвящен ряд исследований и установлено, что препараты оказывают существенное влияние на интенсивность процессов свободнорадикального окисления (СРО) и активность некоторых ферментов (Хватова и др., 1995; Крайнова, 2005; Harris, 1992; Mikhaleva et al., 1993; Lysenko et al., 1999). Тем не менее, актуальным остается детальное изучение молекулярных механизмов их мембраностабилизирующего действия и влияние данных препаратов на активность миКФК в условиях нарушения гемодинамики головного мозга (*in vitro* и *in vivo*).

Цель исследования: Изучить особенности функционирования изоферментов креатинфосфокиназы нервной ткани крыс при длительной ишемии мозга.

Задачи исследования:

1. Исследовать распределение активности изоферментов КФК в мозге крыс, особенности молекулярной организации миКФК и кинетические характеристики изоферментов.

2. Изучить выраженность изменений каталитических свойств изоферментов КФК при острой ишемии и в динамике нарушения мозгового кровообращения у лабораторных животных.

3. Исследовать внутримолекулярную перестройку миКФК при ишемии мозга различной продолжительности у крыс.

4. Изучить интенсивность процессов СРО в головном мозге животных при ишемии для оценки каталитической активности КФК.

5. Исследовать мембраностабилизирующее действие церулоплазмينا и дельтарана, их влияние на интенсивность процессов СРО и активность миКФК

в нервной ткани в условиях острого нарушения мозгового кровообращения у крыс (*in vitro* и *in vivo*).

Научная новизна исследования

Выявлены изменения каталитических и кинетических свойств цитоплазматической и митохондриальной КФК головного мозга крыс в динамике нарушения мозгового кровообращения.

Впервые установлено, что при длительной ишемии мозга происходит внутримолекулярная перестройка миКФК и соотношение олигомерных форм фермента изменяется в зависимости от продолжительности и тяжести ишемии.

Доказано, что мембраносвязывающие свойства митохондриального изофермента КФК и соотношение димер/октамер существенно зависят от взаимодействия фермента с митохондриальной мембраной.

Продемонстрированы различия в реакции цитоплазматической и митохондриальной КФК мозга на острую ишемию, вызванную двусторонним лигированием общих сонных артерий, которые определяются физиологическим состоянием животных.

Определено, что в динамике нарушения мозгового кровообращения независимо от физиологического состояния животных наибольшие изменения затрагивают митохондриальный изофермент КФК.

Впервые установлено, что церулоплазмин и дельтаран в зависимости от концентрации обладают про- и антиоксидантным действием (*in vitro*). При малых концентрациях оба препарата оказывают мембраностабилизирующий эффект, ингибируют процессы СРО и увеличивают активность миКФК (*in vitro* и *in vivo*).

Научно-практическая значимость работы

Полученные данные об изменениях каталитических свойств изоферментов КФК мозга, соотношения олигомерных форм митохондриального изофермента, интенсивности процессов СРО в нервной ткани расширили современное представление о молекулярных механизмах регуляции энергетического обмена при длительном нарушении мозгового кровообращения. Это вносит вклад в фундаментальные представления о роли мембран в регуляции активности ферментов.

Исследование влияния ЦП и дельтарана на интенсивность СРО в условиях острого нарушения мозгового кровообращения выявило прооксидантный и антиоксидантный эффект препаратов в зависимости от их концентрации. При малых концентрациях препаратов были установлены молекулярные механизмы их мембраностабилизирующего действия, способность влиять на активность миКФК, что приобретает прямое практическое значение.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Острая ишемия головного мозга (30 минут) сопровождается изменениями в каталитических свойствах изоферментов КФК, интенсивности СРО и внутримолекулярной перестройкой олигомерных форм миКФК. Степень выявленных отклонений зависит от тяжести ишемического воздействия.

2. Длительное нарушение мозгового кровообращения (18 часов, 3, 7, 14 и 30 суток) характеризуется изменениями в общей активности цитоплазматической и митохондриальной КФК. Соотношение димер/октамер для миКФК и резистентность мембранных структур мозга зависят от продолжительности и тяжести ишемии.

3. Церулоплазмин и дельтаран обладают дозозависимым эффектом действия. При высоких концентрациях оба препарата проявляют прооксидантное действие при инкубации с ними митохондриальных мембран (*in vitro*). При низких концентрациях ЦП и дельтаран оказывают мембраностабилизирующее влияние, ингибируют процессы СРО и увеличивают активность миКФК (*in vitro* и *in vivo*), но механизм их действия разный.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были доложены на Всероссийской конференции с международным участием «Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности ассиметрии и пластичности мозга» (Москва, 2007), the 17th European Society for Neurochemistry Meeting – 3rd Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders (Spain, 2007), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), XIII Нижегородской сессии молодых ученых: Естественнонаучные дисциплины (Н. Новгород, 2008), 6-ой Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 2008), Научной конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (СПб, 2008), 5-ой Российской конференции «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2008), VIII European Symposium of The Protein Society (Zurich, 2009), Российской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск, 2009), Нижегородском биохимическом обществе (Н. Новгород, 2009), IX юбилейной научной сессии молодых ученых и студентов, посвященной 90-летию Нижегородской государственной медицинской академии «Современное решение актуальных научных проблем в медицине» (Н. Новгород, 2010), the 4th ISN Special Neurochemistry Conference «Membrane Domains in CNS physiology and pathology» (Erice, 2010).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 2 работы в ведущих отечественных журналах, рекомендованных ВАК, и 19 статей и тезисов докладов региональных, всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 152 страницах, включая список литературы, и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, результатов исследования, обсуждения, выводов, приложения и библиографического указателя. Список цитируемой литературы включает 365 источников. Диссертация иллюстрирована 20 таблицами и 22 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 217 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 грамм. Содержание животных и проведение экспериментов проводилось в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Исследование интактных животных проводилось одновременно с опытными на протяжении всей экспериментальной работы.

Ишемия головного мозга создавалась путем билатерального двойного лигирования общих сонных артерий. Операция проводилась под наркозом: нембутал внутривенно в дозе 30 мг/кг веса животного. Продолжительность операции составила 7-10 минут. Ткань мозга исследовали через 0,5 часа (30 минут), 18 часов, 3, 7, 14 и 30 суток после оперативного нарушения мозгового кровообращения.

При изучении изменений в метаболизме мозга при ишемии выделили две группы животных с различиями в физиологическом состоянии: в удовлетворительном и тяжелом состоянии. Оценка степени тяжести изменений физиологического состояния животных проводилась по поведению крыс, частоте и ритму дыхания, выживаемости. Животные в тяжелом состоянии были пассивны, лежали на боку, дыхание часто сопровождалось судорогами. Общее состояние животных в другой группе на протяжении ишемии различной продолжительности было удовлетворительным.

Выделение цитоплазматической и митохондриальной фракции головного мозга проводилось методом дифференциального центрифугирования (Дже и др., 2003; Fonyo, Somogy, 1960). Супернатант после центрифугирования содержал цитоплазматическую фракцию мозга, осадок – митохондриальную фракцию мозга (далее в тексте «общая митохондриальная фракция»). Наружную мембрану митохондрий разрушали гипотонической обработкой. Субфракционирование для изучения внутримитохондриального распределения фермента и его каталитических свойств проводилось путем ультрацентрифугирования. Осадок, полученный после разделения и содержащий мембраны митохондрий, исследовали для характеристики свойств мембраносвязанной формы креатинфосфокиназы.

Активность КФК определяли спектрофотометрическим методом (Koufen et al., 1999) в системе, сопряженной с лактатдегидрогеназой и пируваткиназой. Активность КФК выражали в мкмоль превращенного креатина за 1 минуту (Е) на 1 мг белка (Е/мг белка).

Кинетические свойства миКФК мозга исследовали методом стационарной кинетики, в основе которого лежит определение зависимости начальных скоростей реакций (V_0) от нарастающих концентраций субстрата (креатина). Расчет параметров сложных кинетических кривых: максимальной скорости реакции (V_{max}) и константы Михаэлиса (K_m) проводился на основании первичных экспериментальных данных с помощью компьютерного математического анализа.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bredford, Spector, 1978).

Диссоциацию октамеров миКФК на димеры осуществляли путем преинкубации общей митохондриальной фракции и осадка митохондриальных мембран с насыщающими концентрациями субстратов (5 мМ $MgCl_2$, 4 мМ АДФ, 50 мМ KNO_3 , 20 мМ креатин, рН 7,2), образующих аналог комплекса переходного состояния, имитирующего переходное состояние креатинфосфокиназной реакции, при 4 °С в течение 2 часов (Липская, 2001). Расчет % димеров производили по доле активности димерной фракции миКФК от общей креатинфосфокиназной активности.

Определение интенсивности СРО проводили методом индуцированной H_2O_2 и Fe^{2+} хемилюминесценции (Кузьмина, 1983). Были изучены следующие показатели: I_{max} – максимальная интенсивность – показывает потенциальную способность биологического объекта к СРО; S – светосумма – отражает содержание радикалов RO_2^{\cdot} , соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления; показатель $tg2$, характеризующий антиоксидантный потенциал исследуемой пробы.

Для исследования влияния церулоплазмينا и дельтарана на интенсивность СРО и активность миКФК в ткани мозга препараты вводили внутривенно за 20 минут до взятия животного в опыт.

Кроме того, перекисная резистентность мембран головного мозга у интактных животных и после 30 минутной ишемии *in vitro* оценивалась до и после их инкубации с изотоническими растворами исследуемых препаратов в фосфатном буфере (рН 7,3±0,5) в течение 18 часов при температуре +8±1 °С. Концентрация препаратов была подобрана с учетом количества лекарственного вещества на объем циркулирующей крови в организме животных в соответствии с предлагаемыми дозами в инструкции к препарату.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ BIOSSTAT согласно рекомендациям по проведению биомедицинской статистики (Гланц, 1999). Независимые выборки сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, непараметрических критериев Крускала-Уоллиса и Ньюмена-Кейлса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено равномерное распределение активности между цитоплазматическим и митохондриальным изоферментами КФК в мозге интактных животных. Активность мембраносвязанной миКФК составляет практически 100% от активности фермента в общей митохондриальной фракции.

Изучение олигомерного состава миКФК выявило, что в митохондриях нервной ткани интактных животных миКФК присутствует в виде смеси двух форм: димера и октамера (65% и 35% соответственно).

При исследовании каталитических свойств КФК методами стационарной кинетики при нарастающих концентрациях креатина установлен классический гиперболический тип кривой развития реакции (рис. 1).

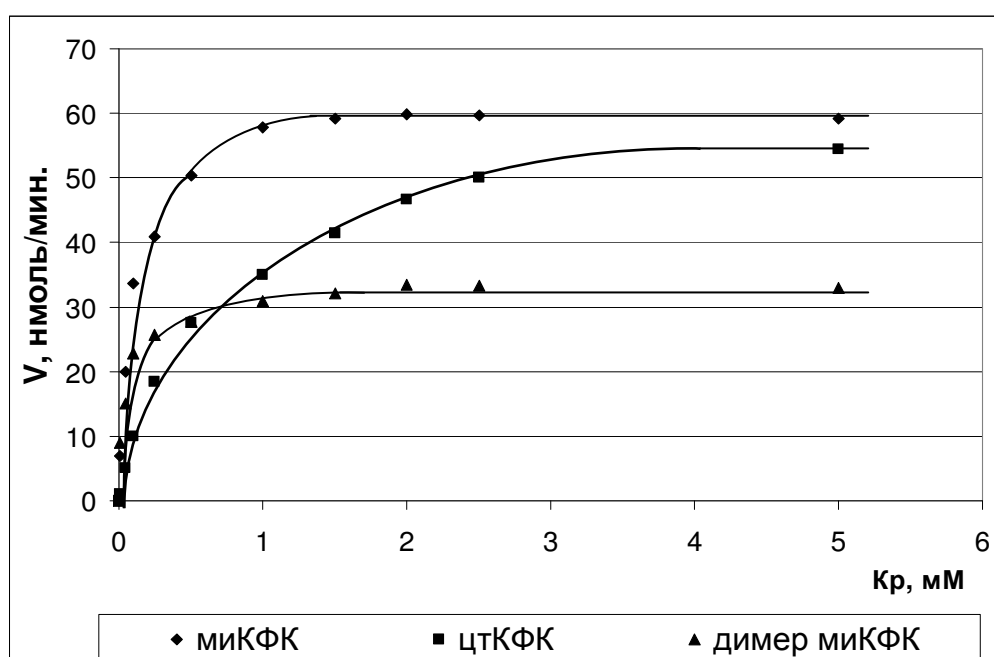


Рис. 1. Зависимость V_0 от концентрации креатина для изоферментов креатинфосфокиназы мозга интактных животных

Кинетическое поведение изоферментов КФК и димера миКФК описывается уравнением Михаэлиса-Ментен. Рассчитанные константы Михаэлиса для изоферментов КФК имеют существенные различия. ЦтКФК характеризуется более высоким значением K_m по креатину (0,61 мМ) в сравнении с миКФК (0,08 мМ), что указывает на большее сродство митохондриального изофермента к субстрату. Константа Михаэлиса для димера миКФК в 2 раза ниже, чем суммарная K_m для димера и октамера митохондриального изофермента. Это может быть физиологически значимо при низких локальных концентрациях субстратов креатинфосфокиназной реакции.

Особенностью экспериментов с острым нарушением мозгового кровообращения явилось наличие двух категорий животных с различиями в

общем физиологическом состоянии. Животные, выжившие через 30 минут после оперативного нарушения гемодинамики головного мозга, были подразделены на две группы: животные в удовлетворительном и тяжелом состоянии.

Выявлены различия в метаболизме мозга при острой ишемии у крыс разных экспериментальных групп. В таблице 1 представлены изменения в распределении активности цитоплазматической и митохондриальной КФК в мозге крыс при остром нарушении мозгового кровообращения.

Таблица 1

Распределение активности изоферментов креатинфосфокиназы в условиях острой ишемии головного мозга (Е/мг белка)

Условия эксперимента	Цитоплазма	Общая митохондриальная фракция	Митохондриальные мембраны
Интактные животные	0,549±0,022 n=35	0,553±0,009 n=35	0,542±0,017 n=35
Ишемия, 30 минут, тяжелая	0,765±0,047* n=11	0,408±0,025* n=11	0,300±0,022* n=11
Ишемия, 30 минут, умеренная	0,581±0,011 n=15	0,494±0,007* n=15	0,480±0,013* n=15

Примечание: *- статистически значимые различия в сравнении с интактными животными (p<0,05)

Установлено достоверное снижение активности миКФК в сравнении с интактными животными примерно на 27% в общей митохондриальной фракции и на 45% в осадке митохондриальных мембран при тяжелой 30 минутной ишемии. При этом активность мембраносвязанного фермента составила 73% от общей активности КФК в митохондриях, что может указывать на диссоциацию миКФК с мембраны в межмембранное пространство.

Активность миКФК в общей митохондриальной фракции и в осадке митохондриальных мембран мозга животных в удовлетворительном состоянии уменьшается лишь на 11% по сравнению с исходным уровнем.

В то же время активность цтКФК увеличивается на 39% в группе животных в тяжелом состоянии и не изменяется в группе животных в удовлетворительном состоянии.

Таким образом, эффект тяжелой острой ишемии проявляется в снижении активности фермента в митохондриях и росте активности в цитоплазме.

Изучение олигомерных форм миКФК при экспериментальном нарушении мозгового кровообращения выявило, что острая ишемия головного мозга приводит к молекулярной перестройке фермента и изменению соотношения димер/октамер для миКФК (табл. 2).

Отмечается рост доли димера миКФК при тяжелой 30 минутной ишемии по сравнению с интактными животными в обеих изученных фракциях. В осадке

митохондриальных мембран рост доли димера составил примерно 20%. В группе животных с острой ишемией в удовлетворительном состоянии соотношение димер/октамер практически не изменяется и соответствует исходному уровню.

Таблица 2

Распределение олигомерных форм митохондриальной креатинфосфокиназы при острой ишемии головного мозга (% димеров)

Условия эксперимента	Общая митохондриальная фракция	Митохондриальные мембраны
Интактные животные	65,27±1,92 n = 35	65,83 ±2,51 n = 35
Ишемия, 30 минут, тяжелая	76,12±0,87* n = 11	78,98±0,55* n = 11
Ишемия, 30 минут, умеренная	68,87±1,83 n=15	67,08±0,79 n=15

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$)

Исследование кинетических свойств цтКФК при тяжелой 30 минутной ишемии выявило сохранение гиперболического типа развития ферментативной реакции, при этом для мтКФК отмечено отклонение от гиперболической кривой и появление двух кажущихся K_m по креатину (0,027 мМ и 0,13 мМ). Изучение кинетики креатинфосфокиназной реакции димерной формы митохондриального изофермента также выявило отклонение от гиперболического типа при тяжелом 30 минутном нарушении гемодинамики мозга.

Главным вопросом проблемы участия структурных элементов клетки в регуляции активности ферментов является зависимость свойств фермента от его ассоциации с мембраной при изменении функционального состояния организма.

Для оценки состояния мембран было проведено исследование интенсивности процессов СРО, а также изучен антиоксидантный потенциал ткани мозга в условиях острой 30 минутной ишемии (табл. 3).

В группе животных в тяжелом состоянии отмечается повышение параметров хемилюминесценции – I_{max} и S , свидетельствующих об усилении процессов СРО в ткани мозга: светосумма медленной вспышки S в 1,5 раза, а I_{max} в 1,3 раза превышают значения данных показателей у интактных животных в общей митохондриальной фракции головного мозга. Также отмечается тенденция к росту антиоксидантной активности ткани мозга по сравнению с исходным уровнем. По-видимому, несмотря на снижение доступа кислорода к мозгу, тенденция к активации СРО в мембранах митохондрий сохраняется.

В группе животных в удовлетворительном состоянии показатели S и I_{max} практически не изменяются, но отмечается уменьшение коэффициента $tg2$ по

сравнению с интактными животными, что свидетельствует о нарушении баланса в системе антиоксиданты – прооксиданты нервной ткани.

Таблица 3

Параметры индуцированной хемилюминесценции в общей митохондриальной фракции мозга животных при острой 30 минутной ишемии

Условия опыта	Светосумма медленной вспышки S (имп.•30сек.)	Интенсивность макс. вспышки I _{max} , мВ	Коэффициент tg2
Интактные животные	523,70±14,86 n=35	56,38±1,82 n=35	15,94±0,63 n=35
Ишемия, 30 минут, тяжелая	773,00±13,69* n=11	74,38±2,27* n=11	16,88±0,25 n=11
Ишемия, 30 минут, умеренная	540,20±11,77 n=15	54,00±1,87 n=15	13,32±0,11* n=15

Примечание: * - статистически значимые различия в сравнении с интактными животными (p<0,05)

Увеличение интенсивности СРО при тяжелой острой ишемии, вероятно, обуславливает частичную диссоциацию октамеров миКФК на димеры и снижение общей активности митохондриального изофермента. При диссоциации октамеров на димеры часть аминокислот, расположенных внутри молекулы, становится доступна повреждению свободными радикалами, что приводит к ингибированию активности миКФК (Koufen et al., 1999; Di-Pietro et al., 2008).

При физиологических концентрациях нуклеотидных субстратов степень диссоциации октамера миКФК зависит от pH, соотношения концентраций креатинфосфата (КФ) и креатина (Кр), присутствия неорганического фосфата, концентрации лактата, ионов Mg, концентрации белка и температуры. Предполагается, что указанные факторы могут регулировать обратимый переход октамера в димер *in vivo* (Липская, 2001; Wallimann et al., 1992; Gross et al., 1994; Hoffmann, Ellington, 2005).

В условиях острого нарушения мозгового кровообращения в нервной ткани мозга снижена концентрация АТФ, КФ, происходит активация анаэробного гликолиза, накопление лактата, снижение pH, увеличение концентрации Mg и неорганического фосфата (Balestrino et al., 2002; Plaschke et al., 2005; Zhou et al., 2008).

Соотношение димер/октамер очень чувствительно к небольшим колебаниям в концентрации КФ/Кр, уровню лактата и pH. Можно предположить, что увеличение концентрации Кр и лактата при острой ишемии головного мозга может приводить к росту доли димера миКФК.

Таким образом, 30 минутная ишемия головного мозга в группе животных в удовлетворительном состоянии существенно не влияет на каталитические свойства изоферментов КФК. Тяжелое острое нарушение гемодинамики мозга

приводит к увеличению активности цитоплазматического изофермента, модификации мембран нервной клетки, в том числе мембраносвязанной КФК, что проявляется в уменьшении ее активности и росте доли димера миКФК.

Выявлены изменения в общей активности изоферментов КФК в динамике нарушения мозгового кровообращения у крыс.

Для животных в тяжелом состоянии было отмечено уменьшение активности миКФК в общей митохондриальной фракции и в осадке митохондриальных мембран относительно интактных животных на всех сроках ишемического воздействия (рис. 2). При этом активность мембраносвязанного фермента составила 83-84% от общей активности КФК в митохондриях при 18 часовой, 3 и 7 дневной ишемии и 73% при 30 дневном нарушении гемодинамики мозга. Активность цтКФК была повышенной относительно интактных животных на всех сроках ишемического воздействия.

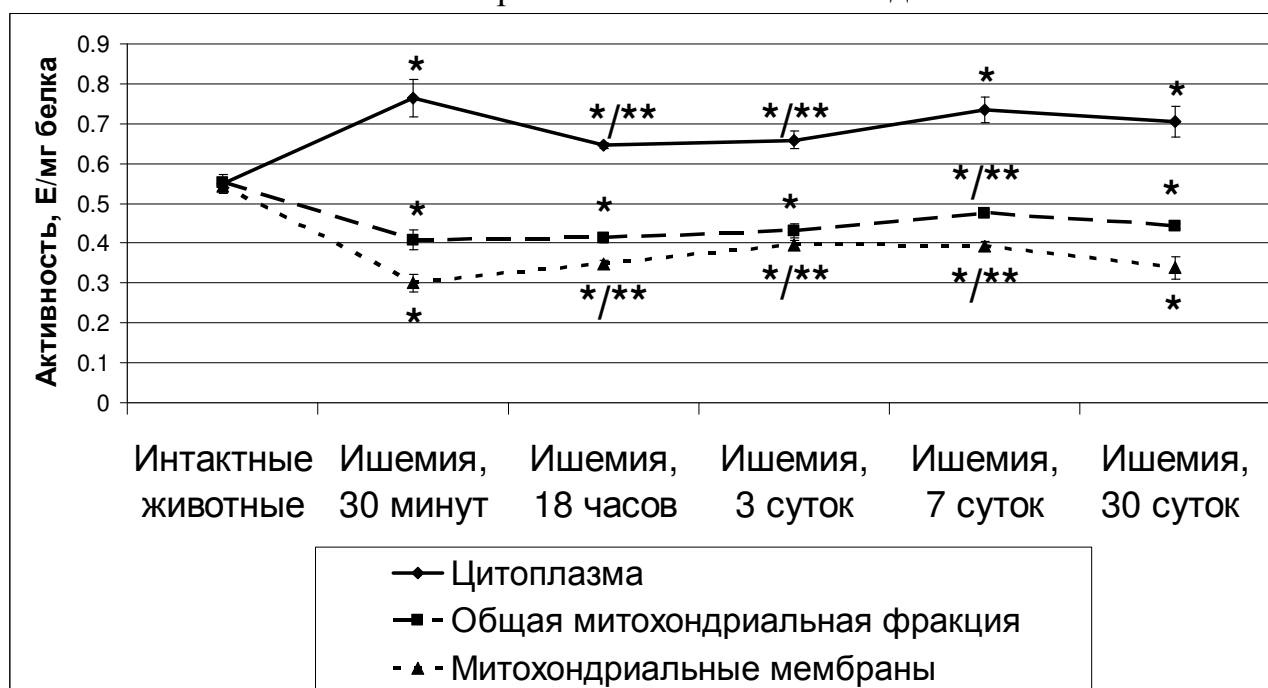


Рис. 2. Распределение активности изоферментов креатинфосфокиназы ткани мозга в динамике после нарушения мозгового кровообращения (группа животных в тяжелом состоянии)

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$)

** - статистически значимые различия по сравнению с тяжелой 30 минутной ишемией ($p < 0,05$)

Животные в удовлетворительном состоянии также характеризовались различиями в активности изоферментов КФК в разные сроки ишемии.

При увеличении продолжительности ишемии мозга до 18 часов, 3, 7 и 14 суток происходят изменения в распределении активности КФК. Установлен рост активности миКФК в сравнении с 30 минутной ишемией: в общей митохондриальной фракции и в осадке митохондриальных мембран активность

восстанавливается до уровня интактных животных. При этом активность цтКФК повышается относительно исходного уровня.

Дальнейшее увеличение продолжительности ишемии мозга до 30 суток приводит к незначительному снижению активности митохондриального изофермента, активность миКФК в осадке митохондриальных мембран уменьшается на 16% относительно интактных животных и составляет 92% от общей активности миКФК в митохондриях. Активность цтКФК остается повышенной относительно интактных животных.

Изучение кинетики цтКФК при умеренной 3 дневной ишемии мозга показало, что фермент характеризуется гиперболической формой кривой зависимости скорости от концентрации субстрата, отмечается уменьшение K_m в сравнении с интактными животными, сродство фермента к субстрату соответствует величине при 30 минутной ишемии. Исследование кинетики миКФК выявило, что зависимость V_0 от концентрации креатина описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, при этом увеличивается сродство фермента к субстрату.

При изучении олигомерных форм миКФК установлено, что увеличение продолжительности ишемии приводит к изменению соотношения димер/октамер миКФК (табл. 4).

Для животных в тяжелом состоянии было выявлено нарастание доли димера митохондриального изофермента КФК в осадке митохондриальных мембран от 76,7% при 18 часовой ишемии до 90,7% при 30 дневной ишемии; в общей митохондриальной фракции доля димера составила 80,4% и 84,4% при 7 и 30 дневном нарушении мозгового кровообращения соответственно. Однако при 18 часовой и 3 дневной ишемии доля димера уменьшалась в общей митохондриальной фракции относительно интактных животных на 20% и 35% соответственно; то есть, несмотря на увеличение числа октамеров, последние не могут связываться с мембраной митохондрий, что может быть обусловлено нарушением ее структуры в результате окислительного стресса.

Животные в удовлетворительном состоянии также характеризовались различиями в распределении олигомерных форм миКФК в разные сроки нарушения мозгового кровообращения. Увеличение сроков ишемии до 18 часов приводит к росту доли октамера в обеих изученных фракциях до 47% и к 3 суткам она составляет примерно 55% как в общей митохондриальной фракции, так и на митохондриальной мембране.

Подобная тенденция сохраняется и к 7 суткам в общей митохондриальной фракции и в осадке митохондриальных мембран. При увеличении экспозиции до 14 суток доля октамера соответствует исходному уровню в обеих митохондриальных фракциях.

Полученные результаты позволяют предположить, что ишемия мозга, которая сопровождается расщеплением части КФ, должна приводить к значительному увеличению доли димера КФК. Однако одновременно происходит увеличение концентрации неорганического фосфата, которое может частично компенсировать диссоциирующее действие креатина.

Дополнительный компенсирующий эффект, вероятно, возникает, когда происходит снижение рН внутриклеточной среды, сопровождающее ишемию.

Таблица 4

Распределение олигомерных форм митохондриальной креатинфосфокиназы при ишемии головного мозга (% димеров)

Условия эксперимента	Общая митохондриальная фракция	Митохондриальные мембраны
Интактные животные	65,27±1,91 n = 35	65,83 ±2,51 n = 35
Ишемия, 30 минут, тяжелая	76,12±0,87* n = 11	78,98±0,55* n = 11
Ишемия, 18 часов, тяжелая	52,30±0,77*/** n = 6	76,74±0,75*/** n = 6
Ишемия, 18 часов, умеренная	53,04±3,36*/** n = 11	52,87±1,14*/** n = 11
Ишемия, 3 суток, тяжелая	42,85±2,19*/** n = 4	87,68±3,22*/** n = 4
Ишемия, 3 суток, умеренная	45,16±2,01*/** n = 10	45,63±2,35*/** n = 10
Ишемия, 7 суток, тяжелая	80,41±3,33* n = 5	90,71±2,72*/** n = 5
Ишемия, 7 суток, умеренная	47,82±2,95*/** n = 7	51,28±2,84*/** n = 7
Ишемия, 14 суток, умеренная	67,82±0,84** n = 5	67,91±3,80** n = 5
Ишемия, 30 суток, тяжелая	84,38±1,99*/** n = 5	90,70±2,11*/** n = 5
Ишемия, 30 суток, умеренная	73,76±0,34* n = 4	72,91±2,32*/** n = 4

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с интактными животными (p<0,05)

** - статистически значимые различия по сравнению с тяжелой 30 минутной ишемией (p<0,05)

По данным литературы, именно октамер миКФК способствует образованию и укреплению контактных сайтов, тем самым повышая эффективность энергообразования в митохондриях мозга, укрепляя структуру мембран, препятствуя открытию поры и активации апоптоза клеток, формируя резистентность мембран к повреждающему действию активных форм кислорода и ишемии (Gross, Wallimann, 1995; Meyer et al., 2006; Lenz, et al., 2007). Когда миКФК расположена в контактных сайтах, то не чувствительна к

внешнему уровню КФ/Кр и может синтезировать КФ из креатина и АТФ (Brdiczka et al., 1994; Wallimann et al., 1992).

Однако при увеличении продолжительности ишемии до 30 суток доля димера вновь увеличивается примерно до 74% и 73% и превышает уровень интактных животных в общей митохондриальной фракции и в осадке митохондриальных мембран соответственно.

Одним из ключевых механизмов повреждения клеток при ишемии, снижения резистентности мембранных структур и изменения активности митохондриальных ферментов является активация образования активных форм кислорода (Flerov et al., 2004; Gibson et al., 2005; Renez-Pinzon et al., 2005). В связи с этим было проведено исследование интенсивности процессов СРО и антиоксидантной активности нервной ткани в динамике после нарушения мозгового кровообращения.

Отмечается повышение параметра хемилюминесценции S в митохондриальной фракции на разных сроках ишемии мозга, что свидетельствует об активации свободнорадикальных процессов в головном мозге (рис. 3).

При тяжелой 18 часовой ишемии мозга интенсивность СРО увеличилась примерно в 2 раза относительно интактных животных и в 1,4 раза относительно 30 минутной ишемии. У животных в удовлетворительном состоянии отмечен рост параметра S в 1,8 и 1,3 раза соответственно.

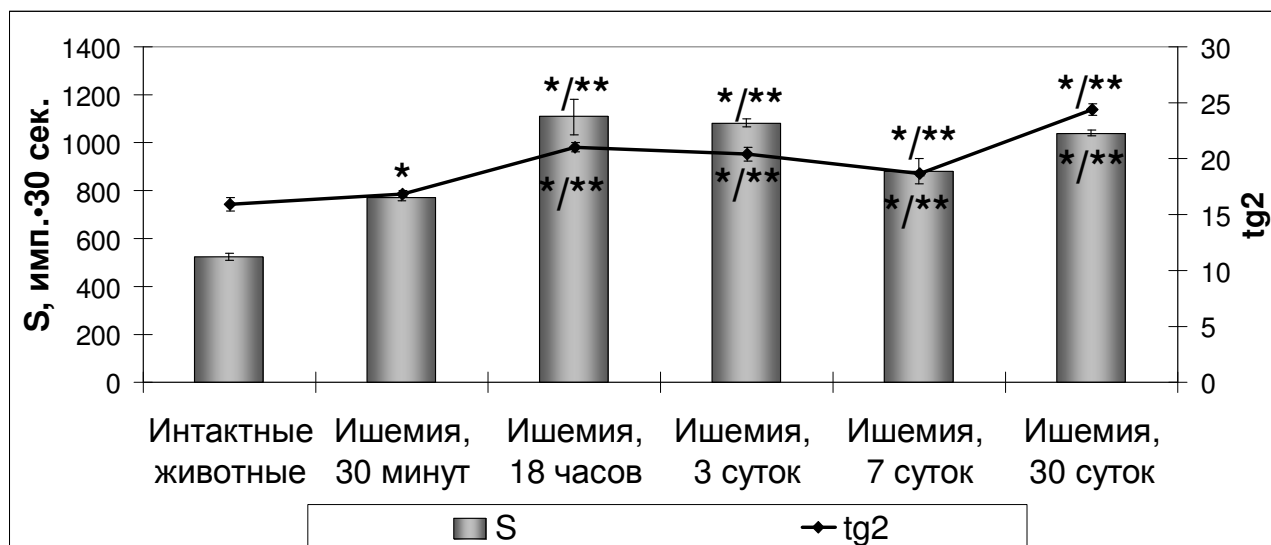
При увеличении продолжительности ишемического воздействия до 3 суток происходит некоторая стабилизация показателей. У животных в тяжелом состоянии параметр S не претерпевает существенных изменений по сравнению с тяжелой 18 часовой экспозицией. При умеренном 3 дневном нарушении мозгового кровообращения отмечается некоторое снижение интенсивности СРО, хотя показатель S остается повышенным на 69% относительно интактных крыс.

При 7 дневном нарушении мозгового кровообращения наблюдается тенденция к уменьшению интенсивности СРО: рост показателя светосуммы составил 68% в группе животных в тяжелом состоянии и 43% в группе «устойчивых» животных относительно нормы. При удлинении периода ишемии до 14 суток происходит существенное снижение активности свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствует нормализация показателей: I_{max} и S всего на 18% превышают значения данных параметров у интактных животных.

Однако при увеличении продолжительности ишемического воздействия до 30 суток вновь отмечается рост интенсивности СРО – увеличение светосуммы примерно в 2 раза относительно интактных крыс при тяжелой ишемии и в 1,8 раз в группе животных в удовлетворительном состоянии.

Острые воздействия, в том числе ишемия, приводят не только к повреждению мембранных структур клеток и активации СРО, но и являются стимулом для индукции защитных систем организма, в том числе и антиоксидантной системы (Сазонтова, Архипенко, 2007; Clantz et al., 2005).

А



Б

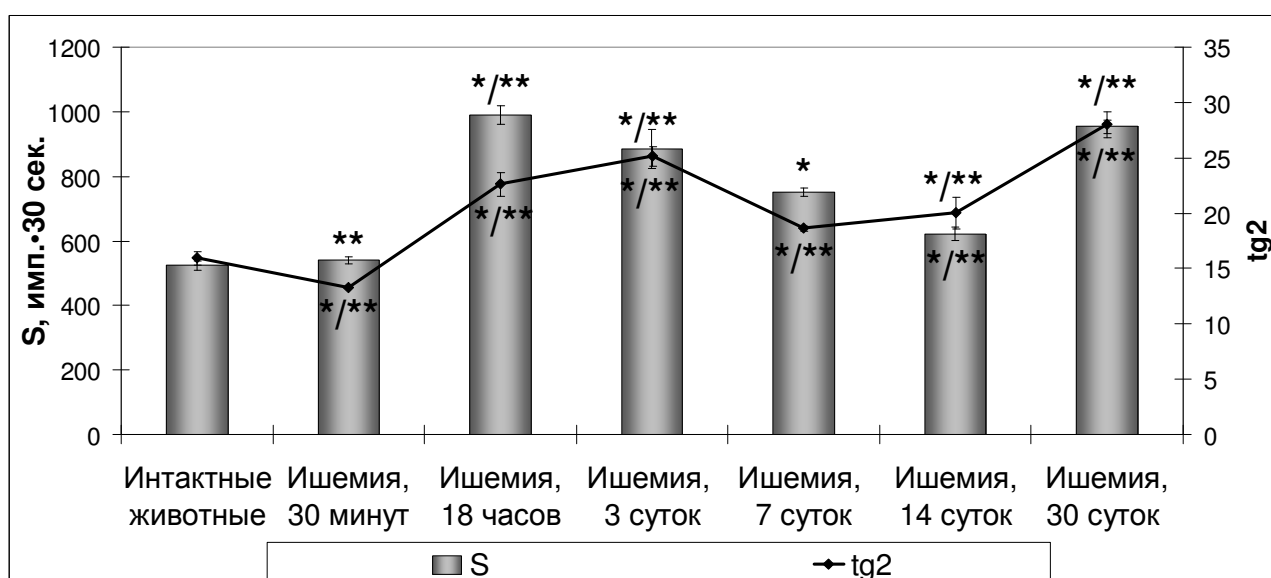


Рис. 3. Параметры индуцированной хемилюминесценции в общей митохондриальной фракции мозга при тяжелой (А) и умеренной (Б) ишемии
Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$)

** - статистически значимые различия по сравнению с тяжелой 30 минутной ишемией ($p < 0,05$)

Установлены изменения в коэффициенте $tg2$, который характеризует антиоксидантный потенциал клетки. При увеличении продолжительности ишемического воздействия отмечается повышение антиоксидантной активности ткани мозга, о чем свидетельствует увеличение величины этого

коэффициента, наиболее выраженное в группе животных в удовлетворительном состоянии (рост показателя $tg2$ соответствует увеличению светосуммы S).

Таким образом, с увеличением продолжительности периода нарушения мозгового кровообращения повышается интенсивность СРО и активность антиоксидантной системы, при этом у животных в удовлетворительном состоянии соотношение про- и антиоксиданты восстанавливается, это может быть связано с активацией синтеза защитных белков, в результате возрастает резистентность мембранных структур к повреждающему фактору ишемии, что обуславливает повышение активности микФК.

Изучение молекулярных механизмов мембраностабилизирующего действия церулоплазмينا и дельтарана у интактных животных и в условиях экспериментального нарушения гемодинамики мозга выявило, что оба препарата оказывают влияние на интенсивность процессов СРО и обладают дозозависимым эффектом действия.

При высоких концентрациях ЦП и дельтаран оказывали прооксидантное действие при инкубации с ними митохондриальной фракции, снижение концентраций препаратов приводило к менее выраженному эффекту. При концентрации 0,0001 мг/мл ЦП и 0,00015 мг/мл дельтаран оказывали мембраностабилизирующее действие, снижая интенсивность СРО относительно острой ишемии (*in vitro*).

При инкубации митохондриальной фракции мозга с ЦП и дельтараном отмечено уменьшение параметра S в сравнении с 30 минутной ишемией и увеличение коэффициента $tg2$, характеризующего антиоксидантный потенциал ткани (рис. 4).

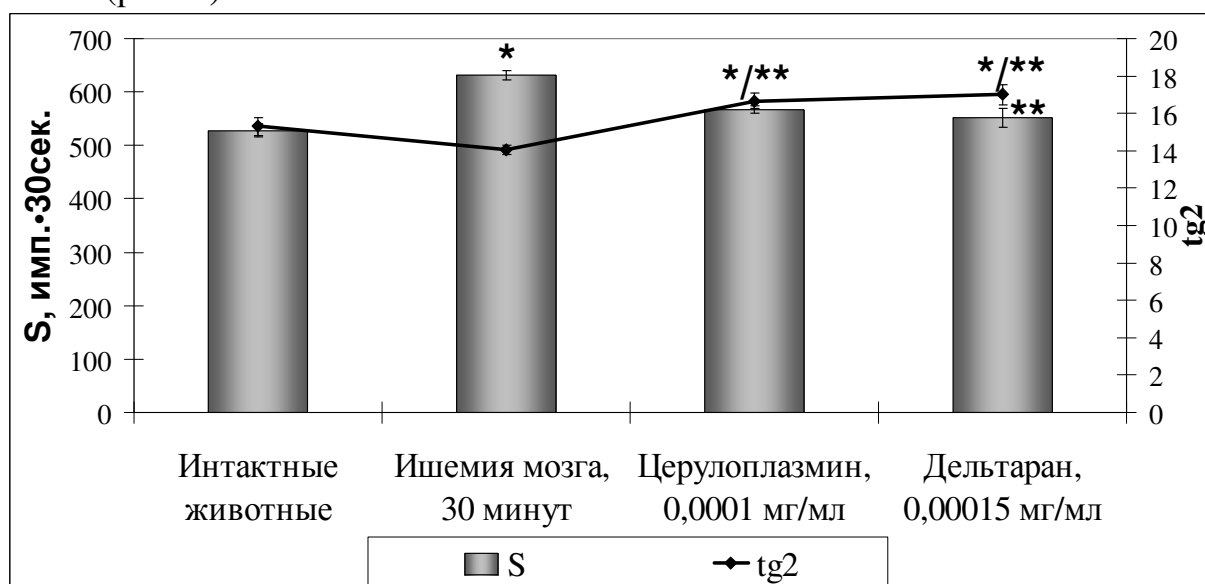


Рис. 4. Влияние церулоплазмينا и дельтарана на интенсивность свободнорадикальных процессов в общей митохондриальной фракции мозга при ишемии (*in vitro*)

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$)

** - статистически значимые различия по сравнению с 30 минутной ишемией ($p < 0,05$)

Это может быть связано с проявлением супероксиддисмутазной и ферроксидазной активности самим ЦП и активацией других антиоксидантных ферментов (Крайнова, 2005; Harris, 1992). Основным эффектом дельтарана, вероятно, обусловлен наличием в его составе пептида, индуцирующего дельтасон, который обладает ингибирующим действием на процессы СРО и способен активировать антиоксидантные ферменты (Ерлыкина, 2006; Mikhaleva et al., 1993; Lysenko et al., 1999).

Тем не менее, при инкубации митохондриальных мембран с ЦП выявлен рост интенсивности свободнорадикального окисления (увеличение параметра светосуммы S) (рис. 5).

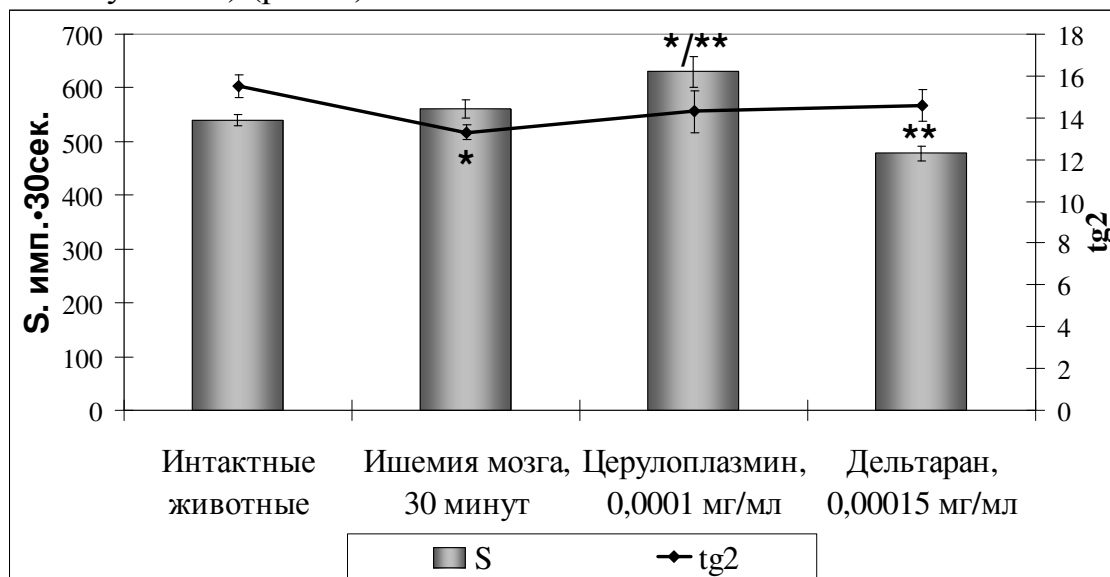


Рис. 5. Влияние церулоплазмينا и дельтарана на интенсивность свободнорадикальных процессов в осадке митохондриальных мембран мозга при ишемии (in vitro)

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$)

** - статистически значимые различия по сравнению с 30 минутной ишемией ($p < 0,05$)

Вероятно, это обусловлено тем, что церулоплазмин катализирует реакцию дисмутации супероксидных радикалов с образованием пероксида водорода, который должен быть далее метаболизирован каталазой и глутатионпероксидазой – ферментами, не связанными непосредственно с митохондриальными мембранами, но присутствующими в нервных клетках и митохондриях.

Дельтаран в отличие от ЦП уменьшал интенсивность процессов свободнорадикального окисления на митохондриальных мембранах при остром нарушении гемодинамики мозга, что может указывать на непосредственное стабилизирующее влияние дельтарана на мембраны митохондрий.

Отмечено увеличение активности миКФК до уровня интактных животных при инкубации мембран митохондрий с дельтараном, в то же время церулоплазмин не влиял на активность мембраносвязанного фермента (рис. 6).

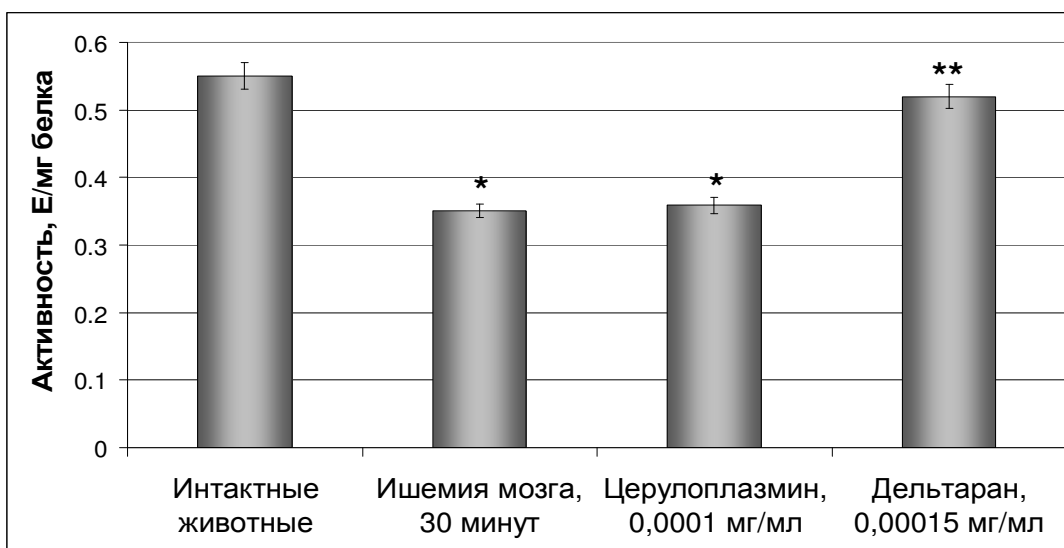


Рис. 6. Влияние церулоплазмينا и дельтаран на активность миКФК при острой ишемии головного мозга (in vitro)

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$)

** - статистически значимые различия по сравнению с 30 минутной ишемией ($p < 0,05$)

Преишемическое внутрибрюшинное введение ЦП (167 мкг/кг) и дельтарана (120 мкг/кг) снижало интенсивность СРО во всех изученных фракциях мозга и увеличивало активность миКФК.

Таким образом, и ЦП, и дельтаран при острой ишемии головного мозга оказывают мембраностабилизирующее действие, ингибируют процессы СРО и увеличивают активность миКФК, но механизм их действия разный.

ВЫВОДЫ

1. Изоферменты КФК мозга отличаются рядом каталитических и кинетических свойств. Для митохондриальной и цитоплазматической креатинфосфокиназы установлен классический гиперболический тип кинетики. Цитоплазматический изофермент характеризуется более высоким значением K_m по креатину в сравнении с миКФК. Митохондриальный изофермент в нервной ткани представлен в виде двух олигомерных форм: димера и октамера. Константа Михаэлиса для димера миКФК в 2 раза ниже, чем суммарная K_m для октамера и димера.
2. При острой ишемии головного мозга (30 минут) каталитические свойства изоферментов КФК зависят от тяжести состояния животных. У крыс в тяжелом состоянии активность миКФК снижается, при этом увеличивается активность цтКФК; происходит внутримолекулярная перестройка митохондриального изофермента (увеличивается доля димера), кинетика реакции приобретает аномальное развитие. У животных в удовлетворительном состоянии активность изоферментов КФК и соотношение олигомерных форм миКФК существенно не изменяются.

3. Установлены закономерности реакции мембранных структур и изоферментов КФК в динамике ишемии мозга в зависимости от физиологического состояния животных:
 - а) тяжелое состояние сопровождается активацией свободнорадикальных процессов, уменьшением прочности связи митохондриального изофермента с мембраной, ростом доли димера мембраносвязанной миКФК и увеличением активности цтКФК на всех сроках ишемического воздействия;
 - б) для животных в удовлетворительном состоянии выявлены увеличение активности изоферментов КФК, восстановление равновесия в системе прооксиданты – антиоксиданты, рост доли октамера митохондриального изофермента в течение первых 14 суток нарушения мозгового кровообращения. Увеличение продолжительности ишемического воздействия до 30 суток приводит к уменьшению активности и росту доли димера митохондриального изофермента.
4. Установлен разнонаправленный характер в изменении активности миКФК и цтКФК при длительной ишемии мозга: рост и стабилизация активности цтКФК и наблюдаемые внутримолекулярная перестройка и изменение каталитических свойств митохондриального изофермента.
5. Отмечена двойственная природа действия дельтарана и церулоплазмينا *in vitro*. Высокие концентрации препаратов оказывают прооксидантное действие при инкубации с ними митохондриальных мембран *in vitro*. При низких концентрациях ЦП и дельтаран оказывают мембраностабилизирующее действие, ингибируют процессы СРО и увеличивают активность миКФК (*in vitro* и *in vivo*).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Ерлыкина, Е.И. Ферментативная характеристика креатинкиназной системы при нарушении гемодинамики мозга / Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 1. – С. 18-21.
2. Мошкова, А.Н. Подходы к прогнозированию адаптивного состояния энергетической системы мозга в условиях гипоксии / А.Н. Мошкова, Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева**, Е.М. Хватова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 3. – С. 282-285.

II. Статьи, тезисы докладов региональных, всероссийских и международных конференций:

1. Ерлыкина, Е.И. Распределение креатинкиназной активности при нарушении гемодинамики мозга / Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева**, Н.В Седунова // Материалы XI Международной конференции «Здоровье семьи – XXI век. Онкология XXI век» (Пермь, 2007 г.). – Пермь, 2007. – С. 107-108.

2. Седунова, Н.В. Изменение каталитических свойств цитоплазматической креатинкиназы при ишемии мозга / Н.В. Седунова, **Т.Ф. Сергеева** // Материалы XII Нижегородской сессии молодых ученых. Естественнонаучные дисциплины (Н. Новгород, 2007 г.). – Н. Новгород, 2007. – С. 26-27.

3. Ерлыкина, Е.И. Участие креатинкиназной системы в регуляции метаболизма при остром нарушении гемодинамики мозга / Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева**, Н.В.Седунова // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга» (Москва, 2007 г.). – Москва, 2007. – С. 241-244.

4. Yerlykina, E.I. Catalytic properties of membrane-associated enzymes in brain acute ischemia / E.I. Yerlykina, N.V. Sedunova, **T.F. Sergeeva** // Journal of Neurochemistry, Abstracts of the 17th European Society for Neurochemistry Meeting – 3rd Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders. – 2007. – Vol. 101, s1. – P. 40.

5. Ерлыкина, Е.И. Ферменты энергетического обмена мозга при изменении функционального состояния организма / Е.И. Ерлыкина, Е.М. Хватова, **Т.Ф. Сергеева** // Нижегородский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 153-154.

6. Ерлыкина, Е.И. Закономерности изменения каталитических свойств фосфокиназ при церебральной ишемии / Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева** // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008 г.). – Новосибирск, 2008. – С. 328.

7. Сергеева, Т.Ф. Анализ действия некоторых фармакологических препаратов на свободнорадикальные процессы при ишемии мозга / **Т.Ф. Сергеева** // Материалы XIII Нижегородской сессии молодых ученых. Естественнонаучные дисциплины (Н. Новгород, 2008 г.). – Н. Новгород, 2008. – С. 29.

8. Ерлыкина, Е.И. Возможности фармакологической энергопротекции препаратом дельтаран при ишемии мозга / Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева**, Е.И. Кузьмина // Материалы Международного симпозиума «Адаптационная физиология и качество жизни: проблемы традиционной и инновационной медицины» (Москва, 2008 г.). – Москва, 2008. – С. 116-118.

9. Кузьмина, Е.И. Исследование мембраностабилизирующих и мембранодестабилизирующих свойств лекарственных препаратов на хемилюминесцентной модели перекисной резистентности эритроцитов *in vitro* / Е.И. Кузьмина, Н.И. Кубышева, Л.Б. Постникова, **Т.Ф. Сергеева** // Труды XVI Международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, 2008 г.). – Ялта-Гурзуф, 2008. – С. 371-372.

10. Ерлыкина, Е.И. Ферментно-структурные корреляции окислительного метаболизма как основа развития адаптивной реакции мозга к гипоксии / Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева** // Тезисы докладов научной конференции с

международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (СПб, 2008 г.). – СПб, 2008. – С. 53-54.

11. Ерлыкина, Е.И. Оценка некоторых показателей энергетического обмена мозга при ишемии и краткосрочном гипобарическом прекондиционировании / Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева**, Т.И. Шлапакова // Патогенез. – 2008. – Т. 6, № 3. – С. 60

12. Сергеева, Т.Ф. Влияние церулоплазмина и дельтарана на активность свободнорадикальных процессов в ткани мозга в норме и при ишемии / **Т.Ф. Сергеева** // Астраханский медицинский журнал (приложение). – 2008. – Т 3, № 3. – С. 35-38.

13. Яшин, К.С. Каталитическая характеристика митохондриальной креатинкиназы в условиях ишемии мозга и при введении пептида дельта-сна / К.С. Яшин, Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева** // Сборник материалов II Всероссийской (76-ой Итоговой) студенческой научной конференции «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» (Самара, 2008 г.). – Самара, 2008. – С. 286.

14. Yerlykina, E.I. The peculiarities of catalytic properties of membrane-associated creatine kinase of the brain in norm and in chronic cerebral ischemia / E.I. Yerlykina, **T.F. Sergeeva** // Book of abstracts «VIII European Symposium of The Protein Society» (Zurich, 2009). – Zurich, 2009. – P. 75.

15. Kuzmina, E.I. The evaluation of antioxidant action of medications on modeling systems in vitro / E.I. Kuzmina, **T.F. Sergeeva**, N.I. Kubysheva, O.V. Kostina // Revista de Ozonoterapia. – 2009. – Vol. 3. Suppl., № 1. – P. 67-68.

16. Сергеева, Т.Ф. Структурно-функциональные особенности креатинкиназы при адаптации к церебральной ишемии / **Т.Ф. Сергеева** // Материалы XIV Нижегородской сессии молодых ученых. Естественнонаучные дисциплины (Н. Новгород, 2009 г.). – Н. Новгород, 2009. – С. 146-147.

17. Ерлыкина, Е.И. Молекулярные основы развития адаптационного процесса при хронической ишемии мозга / Е.И. Ерлыкина, **Т.Ф. Сергеева** // Материалы Российской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск, 2009 г.). – Челябинск, 2009. – С. 36-38.

18. Сергеева, Т.Ф. Исследование мембраностабилизирующих свойств церулоплазмина и дельтарана в условиях острого нарушения мозгового кровообращения / **Т.Ф. Сергеева** // Современное решение актуальных научных проблем в медицине. IX юбилейная научная сессия молодых ученых и студентов, посвященная 90-летию Нижегородской государственной медицинской академии: тезисы докладов (Н. Новгород, 2010 г.) – Н. Новгород, 2010. – С. 116-118.

19. Yerlykina, E.I. Analysis of functional coupling of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in regulation of energy metabolism in cerebral ischemia / E.I. Yerlykina, **T.F. Sergeeva** // Journal of Neurochemistry, Abstracts of the 4th ISN Special conference «Membrane domains in CNS physiology and pathology». – 2010. – Vol. 113, s1. – P. 32.