

ної крові, яке від ступеня та індексу інтоксикації не залежить.

При зростанні індексу інтоксикації у хворих на туберкульоз відбувається зменшення частоти проапоптичного впливу ауто-сироватки на нейтрофли та моноцити периферичної крові та зростання частоти її антиапоптичної дії на ці клітини, що має адаптаційний характер.

ЛІТЕРАТУРА

1. Апоптоз нейтрофілоцитів та його роль в патогенезі запальних процесів в легенях туберкульозного та неспецифічного генезу / І.Ф. Льїнська, О.М. Рекалова, Л.В. Ареф'єва [та ін.] // Укр. пульмон. журнал. — 2007. — № 2. — С. 32–38.
2. Генетический контроль восприимчивости к туберкулезу и его иммунологические аспекты [Текст] / А.С. Ант, Т.В. Радаева, Б.В. Никоненко, И.В. Лядова // Медицинская иммунология. — 2003. — Т. 5, № 3–4. — С. 466.
3. Льїнська І.Ф. Апоптоз перитонеальних макрофагів у тварин з різною генетичною чутливістю до туберкульозу // І.Ф. Льїнська, О.М. Зубрійчук // Вісник проблем біології і медицини. — 2012. — 3 1. — С. 119–123.
4. Льїнська І.Ф. Інфікованість мікобактеріями туберкульозу та індукований ними апоптоз фагоцитуючих клітин при туберкульозі / І.Ф. Льїнська, О.М. Зубрійчук // Укр. Пульман. Журн. — 2009. — № 1. — С. 33–36.
5. Льїнська І.Ф. Механізми імуносупресії при туберкульозі / І.Ф. Льїнська, О.М. Зубрійчук, С.Г. Ясир // Лаб. діагностика. — 2011. — № 3. — С. 47–58.
6. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабиц. — К.: Морион, 2000. — 320 с.
7. Нореико Б.В. Ранний период туберкулезной инфекции у детей / Б.В. Нореико // Здоровье ребенка. — 2008. — № 5 (14). — С. 132–134.
8. Нореико Б.В. Первичный туберкулезный комплекс / Б.В. Нореико, Т.М. Шумляева, А.В. Кирилова // Здоровье ребенка. — 2009. — № 3 (18). — С. 83–85.
9. Пичугин А.В. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции / А.В. Пичугин, А.С. Ант // Пробл. туберкулеза и заболеваний легких. — 2005. — № 12. — С. 3–7.
10. Солодовник Ю.С. Определение лейкоцитарного индекса интоксикации у больных туберкулезом легких / Ю.С. Солодовник, В.П. Бондаренко // Врачебное дело. — 1986. — № 11. — С. 23–24.
11. Фрайт В. М. Математический метод оценки тяжести заболевания, анализа эффективности лечения и прогноза при диссеминированном и инфильтративном туберкулезе легких // Туберкулез: Респ. межвед. сб. — К., 1992. — Вып. 4. — С. 123–126.
12. Lee J. Macrophage Apoptosis in Tuberculosis / J. Lee, M. Hartman, H. Kornfeld // Yonsei Med. J. — 2009. — Vol. 50, № 1. — P. 1–11.
13. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis / St. Winkler, M. Necek, H. Winklera [et al.] // Microbes and Infection. — 2005. — Vol. 7, № 9–10. — P. 1161–1169.
14. Schurr E. Genetic control of host susceptibility to tuberculosis / E. Schurr, I. Kramnik // Handbook of Tuberculosis. Immunology and Cell Biology / Eds S.H.E. Kaufmann, W.J. Britton. W.J. Weinheim: WILEY-VCH, 2008. — P. 295–336.

ВЛИЯНИЕ ИНТОКСИКАЦИИ НА АПОПТОЗ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

И.Ф. Ильинская, О.Н. Зубрийчук

Изучение особенностей апоптоза нейтрофилов и моноцитов крови в зависимости от наличия и выраженности интоксикации было проведено у 160 больных туберкулезом (ТБ) легких и 28 здоровых волонтеров. Установлено, что при ТБ содержание апоптичных нейтрофилов в крови увеличивается прямо пропорционально лейкоцитарному индексу интоксикации, однако усиление спонтанного апоптоза фагоцитов крови у больных с интоксикацией от ее степени и лейкоцитарного индекса интоксикации не зависит. Показано, что у пациентов рост индекса интоксикации сопровождается увеличением частоты антиапоптического действия аутосыворотки, что является адаптационным механизмом в патогенезе туберкулеза.

EFFECT OF INTOXICATION ON THE APOPTOSIS OF PHAGOCYtic CELLS IN TUBERCULOSIS

I.F. Ilyinskaya, O. N. Zubriyчук

The features of blood neutrophils and monocytes apoptosis, depending on the presence and severity of intoxication were studied in 160 patients with pulmonary tuberculosis and 28 healthy volunteers. It was detected that the content of TB apoptic neutrophils in the blood increases in direct proportion to leukocyte intoxication index, but increasing of spontaneous apoptosis of blood phagocytes in patients with intoxication doesn't dependent of its degree and leukocyte intoxication index. It was shown that in TB patients the growth of intoxication indexes accompanied by increase of the frequency of antiapoptic influence of autologic serum on neutrophils and monocytes and that is an adaptive mechanism in TB pathogenesis.

УДК 577.16.02:612.015.6:616-092.19

Е.П. Пасічна¹, Г.В. Донченко¹,
А.П. Бурлака², Н.В. Делеменчук¹

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ВІТАМІНАМИ

¹ Інститут біохімії імені О.В. Палладіна
НАН України, м. Київ

² Інститут експериментальної патології, онкології
та радіобіології імені Р.Є. Кавецького, м. Київ

Розсіяний склероз (РС) — хронічне запальвальне захворювання центральної нервової системи (ЦНС), що характеризується локально та дифузно розташованими осередками демієлінізації та нейродегенерації [15]. Молекулярні механізми виникнення й розвитку цієї хвороби і

досі залишаються нез'ясованими, хоча останнім часом в цьому напрямку зроблено крок уперед завдяки дослідженням *in vitro* на моделі РС, так званому експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ), що є найбільш адекватною моделлю аутоімунних захворювань ЦНС людини.

Ураженню нервової тканини за умов РС можуть сприяти різні патологічні механізми, але на сьогодні вважається, що одним із головних факторів є ушкодження мітохондрій аксонів, нейронів та гліальних клітин, в результаті чого розвивається мітохондріальна дисфункція та знижується енергетичний потенціал клітин ЦНС [20, 29]. Тому останніми роками мітохондріальній гіпотезі розвитку неврологічного дефіциту та нейродегенерації приділяється все більше уваги в світі.

У механізмах розвитку мітохондріальної дисфункції клітин ЦНС за умов РС провідну роль грають активовані Th1-клітини, що проникають до ЦНС крізь гемато-енцефалічний бар'єр, продукуючи значну кількість прозапальних цитокінів. Цитокін-опосередкована активація макрофагів і мікроглії призводить до значного зростання рівня супероксидних аніон-радикалів і радикалів оксиду нітрогену, що відіграють важливу роль у патогенезі РС і їх навіть називають медіаторами демієлінізації та аксональної дегенерації [23]. Підвищенню рівня цих надзвичайно активних сполук сприяє також розвиток глутаматної ексайтотоксичності [28].

Окрім того, що активні форми кисню й нітрогену є причиною ушкодження мітохондріального апарату клітин ЦНС, ушкоджені мітохондрії самі стають джерелом їх гіперпродукції [21], що також вносить свій вклад у розвиток оксидативного стресу. Таким чином, створюються умови для інтенсивного вільнорадикального ушкодження макромолекул, таких як поліненасичені жирні кислоти мембранних ліпідів, протеїни та ДНК/РНК [14, 17], що призводить до деструктивних процесів клітинних і субклітинних мембранних структур.

В активній фазі РС найбільшого пошкодження зазнають комплекси I, III і IV ланцюгу транспорту електронів (ЛТЕ) мітохондрій і це є причиною розвитку багатьох симптомів і характерних патологічних проявів цього захворювання, включаючи демієлінізацію і апоптоз олігодендроцитів [27], деструкцію аксонів малого діаметра [19], нейродегенеративні процеси [8], пригнічення

диференціювання клітин-попередників олігодендроцитів, зниження процесів ремієлінізації [30] та дисфункцію астроцитів [24].

Олігодендроцити, що формують мієлінову оболонку навколо аксонів, на відміну від інших типів гліальних клітин, є найбільш чутливими до оксидативного ушкодження, оскільки не мають відповідних захисних механізмів для підтримки рівня аденозинтрифосфату (АТФ), в результаті чого відбувається їх загибель шляхом апоптозу [20]. Значна втрата клітин цього типу вважається однією з важливих причин демієлінізації за умов РС.

Загибель клітин за умов РС може відбуватися за рядом механізмів, серед яких порушення іонного гомеостазу, приток кальцію у внутрішньоклітинний простір, мітохондріально-опосередкована ініціація клітинної загибелі та зниження аксонального транспорту. Але за будь-якої причини мітохондрії займають в цьому процесі центральне місце [18].

В останні роки механізми виникнення дисфункції мітохондрій та пов'язане з цими процесами наростання швидкості генерування супероксидних радикалів і радикалів оксиду азоту в клітинах ЦНС широко досліджуються через визнання їх ролі в етіології й патогенезі нейродегенеративних та демієлінізаційних захворювань, тому корекцію дихальної активності мітохондрій слід розглядати як перспективний підхід до медикаментозної терапії, а компоненти дихального ланцюга — як мішені для специфічного впливу.

У попередженні розвитку мітохондріально опосередкованих патологічних змін перспективними можуть бути сполуки, що беруть активну участь в енергетичних процесах та у функціонуванні мітохондріального апарату, а саме вітаміни В₁, В₂, В₆ і РР [11], у регуляції рівня внутрішньоклітинного кальцію — вітамін D₃, та в антиоксидантних (В₁, В₂, Е, D₃, α-ліпоєва та α-ліноленова кислоти) та антинітрозативних (В₁, В₆, РР, D₃) захисних механізмах клітини. Тому вивчення впливу вітаміну D₃ та його аналогів, а також вітамінів В₁, В₂, В₆, Е, нікотинаміду, α-ліпоєвої та α-ліноленової кислот на розвиток метаболічних розладів центральної нервової системи хворих на РС та за умов ЕАЕ є актуальним для розробки адекватних засобів попередження і лікування цього захворювання.

Метою роботи було дослідити вплив вітаміну D₃ та його комплексу з вітамінами В₁, В₂, В₆,

РР, Е, α -ліпоєвою, α -ліноленою кислотами та мінеральними речовинами (Mg, Zn, Se) на функціональний стан електрон-транспортних систем мітохондрій клітин головного мозку й печінки шурів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) та генерацію за цих умов нітрозильних комплексів заліза в мітохондріях цих клітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В досліджах використовували шурів-самців масою 200–250 г лінії Wistar, яких розподіляли на близькі за вагою 4 групи. 1 група — контрольні (інтактні) тварини. Тварин інших груп імунізували в подушечки задніх лап за допомогою суміші, що складалася із очищеного гомологічного мієліну і повного ад'юванта Фрейнда ("Sigma"). Контрольна група шурів отримувала фізіологічний розчин в такому ж об'ємі. Всі тварини знаходились на збалансованому раціоні віварію і одержували воду *ad libitum*.

Одна з груп імунізованих тварин з 8-ї доби експерименту отримувала перорально кожного дня протягом 13 діб вітамін D₃ у дозі 5 мкг на кг ваги, інша група отримувала суміш біологічно активних речовин, що містила: тіаміну бромід, рибофлавін, піридоксин, нікотинамід, α -токоферол, вітамін D₃, α -ліпоєву та α -ліноленову кислоти, а також MgCl₂, ZnCl₂, SeO₂.

Після інокуляції енцефалітогенної суміші стан тварин щоденно оцінювався на наявність характерних клінічних симптомів, таких як втрата ваги, млявість, знижений тонус хвоста й задніх кінцівок та їх частковий парез, мимовільне сечовипускання, судороги кінцівок тощо. Дослідження проводили у період розвинутих клінічних ознак на 21 добу після декапітації з урахуванням вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

Для дослідження молекулярних аспектів функціонування мітохондріального і мікросомального ЛТЕ клітин мозку та печінки тварин в роботі використана електронна парамагнітно-резонансна (ЕПР) спектрометрія. Тканину печінки попередньо перфузували охолодженим розчином 0,9% NaCl. Тканини мозку й печінки стабілізували в умовах низької температури в скрапленому азоті, після чого визначали вміст довгоживучих вільних радикалів і металопротейдів у клітинах тканин на комп'ютеризованому ЕПР-спектрометрі PE-1307 [1] Для якісної та кількісної оцінки

ЕПР-спектрів визначали положення сигналу ЕПР (g-фактор) та вимірювали його амплітуду, яку відносили до амплітуди стандарту. Як стандарт використовували рубін, розташований у робочому полі резонатора. Стан мітохондріального електрон-транспортного ланцюга та компонентів ланцюга переносу електронів мікросомального окислення в клітинах оцінювали за положенням і амплітудою таких парамагнітних центрів с g-факторами: 1,94 — залізо-сірчаних білків N-2 (ЗСП N-2), 2,003 — радикалів убісемінону (РУ), 2,03 — негемових нітрозильних комплексів заліза (НКЗ) та 2,25 — цитохрому P-450.

Статистичну обробку результатів проводили за методом дисперсійного аналізу нерівночислених комплексів для малих вибірок. Відносний вміст досліджених параметрів виражали у вигляді середньої величини \pm стандартна похибка середньої, достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням t-критерія Стьюдента ($p < 0,05$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілення та різницю між генеральними дисперсіями [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що в спектрах ЕПР здорових тканин тварин, основний внесок роблять залізо-сірчани протеїни (ЗСП) N-1b, N-2, N-3, N-4, N-5, S-1, Fe-S Rieske, радикали убісемінону та форми цитохрому P-450.

У результаті аналізу даних ЕПР-спектрометрії з вмісту ЗСП у тканинах тварин в умовах розвитку ЕАЕ було зафіксовано суттєве зниження амплітуди сигналу ЕПР із g-фактором 1,94, що належить до ЗСП N-2 НАДН-убіхінон-оксидоредуктазного комплексу мітохондрій. Як видно з рис. 1А, рівень відповідного сигналу в тканині мозку за умов ЕАЕ знижується до надзвичайно низьких значень. В печінці (рис. 1Б) також спостерігається зниження вмісту цих протеїнів, але менш виражене, ніж в тканині мозку.

Отримані результати можуть свідчити про ушкодження ЛТЕ мітохондрій, у функціонуванні якого ці негемові форми ЗСП грають важливу роль.

Відомо, що ЗСП N-2 беруть участь у спряженні біологічного окислення з фосфорилуванням і є індикатором стану енергетичної системи мітохондрій, дозволяючи судити про активність процесів клітинного дихання, а також про енергозабезпечення протеїнсинтезуючих систем ендоплазматичного ретикулула [9]. Ці

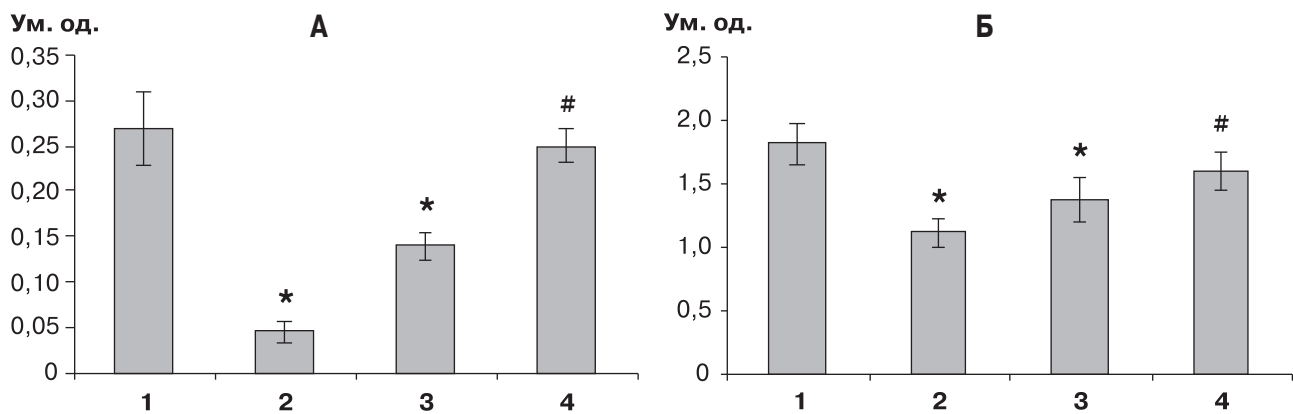


Рис. 1. Вміст залізо-сірчаних протеїнів N-2 у мозку (А) та печінці (Б) щурів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту при введенні біологічно активних сполук, $M \pm m$, $n=5-10$, $p < 0,05$.

Тут і на рис. 2–3 на осі абсцис: 1 — інтактні тварини; 2 — ЕАЕ, 21-а доба розвитку; 3 — ЕАЕ+D3, 4 — ЕАЕ+вітамінно-мінеральна суміш.

* — достовірні зміни відносно інтактних, # — достовірні зміни відносно хворих тварин без лікування.

протеїни є критично важливим компонентом процесу трансформації енергії в І пункті спряження окислення та фосфорилування у дихальному ланцюзі, при пошкодженні якого повністю втрачається здатність мітохондрій синтезувати АТФ, а кисень відновлюється до супероксидних аніон-радикалів.

Відомо, що в умовах гіпоксії відбувається підвищення рівня відновлених флавінів, що призводить до блокади цитохром-С-залежного рецептора на зовнішній поверхні мембрани мітохондрії. При цьому знижується активність NADH-дегідрогенази та підвищується — NADH-CoQH2-редуктази. Це призводить до окислення NADH-убіхіноноксидоредуктазного комплексу (CoQH2-NAD⁺) і утворення АФО, особливо супероксида, у так званих паразитарних реакціях на цій початковій ділянці дихального ланцюга мітохондрій (CoQH2-NAD⁺).

Гіпоксичний стан розвивається, як відомо, в умовах гострої ішемії, але, вочевидь, стан, подібний до гіпоксії, має місце і при РС. Непрямим доказом цього є підвищення на початкових стадіях РС (III типу) експресії транскрипційного фактору, що індукується в умовах гіпоксії HIF-1 α , призводячи до адаптивних змін метаболізму [20]. Тому вважається, що цей механізм розвитку гіперпродукції супероксиду існує, як за умов РС, так і за інших нейродегенеративних станів.

Зафіксовані зміни з вмісту ЗСП N-2 можна розцінювати, як свідчення про окислення ЗСП N-комплексу, що призводить до роз'єднання клітинного дихання із синтезом АТФ в організмі щурів за умов розвитку ЕАЕ. Окислення ЗСП

N-комплексу може відбуватися при частковому блокуванні початкової ділянки дихального ланцюга перед Fe-S-білком N-1b та/або зменшенні швидкості метаболічних процесів, таких як реакції циклу Кребса і окислення жирних кислот, а також при суперкомпенсації енергозатрат при ліполізі [4]. При цьому існують експериментальні докази, що зниження активності І комплексу може бути внаслідок S-нітרוзування ЗСП. Також показано, що відновлений глутатіон здатен попереджувати утворення таких комплексів, проявляючи захисну дію на мітохондріальну функцію [10].

Не виключається також, що зниження вмісту ЗСП N-2 може бути результатом пошкодження ядерної та мітохондріальної ДНК, що кодують ці протеїни, в умовах розвитку оксидативного стресу, або постранкрипційного зниження експресії відповідних РНК при деградації їх пероксинітридом. Так, було показано, наприклад, що за умов РС знижується експресія деяких мітохондріальних протеїнів, насамперед цитохром-С-оксидази І і ІV, що є важливими компонентами ІV комплексу ЛТЕ мітохондрій [20].

При застосуванні як вітаміну D₃, так і вітамінно-мінеральної композиції відбувалося істотне достовірне підвищення вмісту ЗСП N-2 (рис. 2А, Б). Особливо ефективною при цьому виявилася композиція біологічно-активних речовин, застосування якої повністю попереджувало зниження рівня цих компонентів ЛТЕ мітохондрій, як в мозку, так і в печінці. Дані дозволяють констатувати здатність досліджуваних речовин попереджувати ушкодження цих компонентів

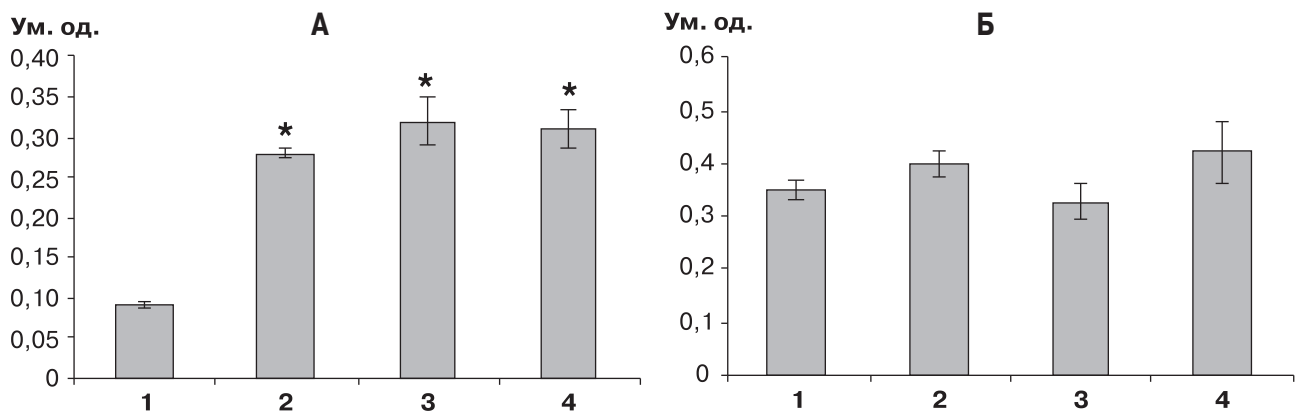


Рис. 2. Вміст нітрозильних комплексів заліза у мозку (А) та печінці (Б) щурів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту при введенні біологічно активних сполук, $M \pm m$, $n=5-10$, $p < 0,05$

електрон-транспортного ланцюга. Імовірно, така захисна дія компонентів композиції на мітохондрії мозку обумовлюється здатністю її компонентів до стабілізації мембранних структур (вітамін Е, α -ліноленова кислота), інгібувати синтез NO (вітаміни В₁, В₆, РР, D₃) та генерацію радикальних сполук, а також активувати антиоксидантний захист, зокрема глутатионової системи (вітаміни В₁, В₂, Е, D₃, α -ліпоєва кислота). Раніше нами було показано, що вітамін D₃ і застосована композиція біологічно активних речовин ефективно запобігають інтенсифікації ПОЛ та зниженню рівня відновленого глутатіона [6]. Глутатіон, як вважається, є фізіологічним регулятором рівня NO, оскільки має здатність ефективно нейтралізувати всі його токсичні форми [13].

У розвитку мітохондріальних порушень та апоптозу клітин разом із супероксидом ключова роль належить монооксиду нітрогену (NO) та його більш агресивній формі — пероксинітриду. Мітохондрії нейронів і клітин глії є важливим джерелом NO. Показана наявність конститутивної форми NO-синтази (NOS), що локалізується у внутрішній мембрані, та продукування NO у мітохондріях нейронів гіпокампа. Мітохондріальна NOS при субоптимальних концентраціях L-аргініну здатна продукувати також супероксид. Вона значно активується у відповідь на розвиток глутаматної ексайтотоксичності та поглинання мітохондріями кальцію. Певна роль в активації мітохондріальної NOS належить також IL-1 β і TNF- α , що продукуються при запаленні. Утворений пероксинітрид сприяє відкриттю гігантської пори мітохондрій. Пероксинітрид здатен нітрузувати не тільки залізо-сірчані протеїнові комплекси в мітохондріях, а й цитохром С, що призводить до зміни його функцій, зокрема,

він стає неспроможним підтримувати перенос електронів у дихальному ланцюгу та відновлюватися аскорбатом. При зв'язуванні NO із ЗСП утворюються нітрозильні комплекси заліза (НКЗ), що характеризуються сигналом ЕПР з g-фактором 2,03 [22]. Посилення їх генерації у тканинах є маркером інтенсифікації вільнорадикальних процесів в організмі та ушкодження мембранних і субмембранних структур

Показано, що у тварин за умов ЕАЕ кількість НКЗ у мозку збільшується у 3 рази у порівнянні з інтактними (рис. 2А). При цьому в тканині печінки достовірних змін не спостерігалось (рис. 2Б).

Якщо зважити на те, що рівень неушкоджених ЗСП у мозку суттєво зменшується, можна припустити, що відбувається блокування цих комплексів оксидом нітрогену (пероксинітридом) і це відображається на перерозподілі компонентів спектру ЕПР. Утворенням НКЗ, таким чином, можна пояснити, хоча б частково, різке зниження вмісту нормальних компонентів ЛТЕ мітохондрій за умов ЕАЕ.

При цьому як вітамін D₃, так і вітамінно-мінеральна домішка не впливала на величину сигналу ЕПР зазначеного показника. Оскільки відомо, що компоненти суміші біологічно-активних речовин здатні регулювати рівень NO в організмі, можливо, вказані зміни в мембранах клітин розвиваються на дуже ранній стадії захворювання і зазначені біологічно активні речовини, застосовані на 8 день захворювання не можуть вплинути на утворення НКЗ. Однак те, що вони все ж таки здатні нормалізувати рівень ЗСП N2, свідчить про те, що зниження їх вмісту відбувається не тільки в результаті нітрузування цих протеїнів, а також і їх окислення, зокрема супер-

оксидом. Тому механізми цього впливу очевидно пов'язані не з попередженням утворення НКЗ в організмі тварин, а, можливо, зі зниженням процесів окислення компонентів ЛТЕ, утворення супероксиду та ліпопероксидів, що можуть окиснювати ці компоненти ЛТЕ, стабілізацією мембранних і субмембранних структур або з регуляцією на рівні експресії генів, що кодують ці протеїни. Оскільки вітамін D₃ проявляє свою дію на рівні геному, то даний механізм не можна заперечувати. Відомо також, що в регуляції багатьох генів бере участь також і вітамін Е.

Отримані дані наводять на думку, що для більш ефективної нейропротекції, композицію біологічно активних речовин слід застосовувати якомога раніше.

Ще одним дуже інформативним показником, що виявляється на спектрах ЕПР і характеризує стан електрон-транспортного ланцюга, є рівень довгоживучих радикалів убісеміхінону (РУ), котрі разом з іонами металів змінної валентності входять до комплексів з оригінальною системою молекулярної електроніки [16]. РУ є напіввідновленою формою коензима Q (CoQ) з неспареним електроном, що утворюється в окисно-відновних перетвореннях CoQ, і в нормі є звичайним компонентом ЛТЕ мітохондрій.

CoQ, як відомо, відіграє центральну роль у біоенергетичних процесах в клітині, в першу чергу, як переносник протонів і електронів у ЛТЕ на внутрішній мембрані мітохондрій [2], а також як важливий жиророзчинний антиоксидант, що бере участь у знешкодженні АФК і у регенерації інших антиоксидантів, в першу чергу, вітаміну Е і С. Тому він справедливо вважається важливим модулятором редокс-стану клітини за

фізіологічних і патологічних станів. За певних умов CoQ може виступати також у якості про-оксиданту. Показана також роль CoQ в регуляції функціонального стану мітохондріальної пори змінної проникності, що залучена до механізмів апоптозу [2, 26].

Отримані в експерименті дані свідчать, що у мозку на 21-у добу розвитку ЕАЕ відбувається суттєве (у 3 рази) зниження рівня парамагнітних центрів з g-фактором 2,003, що належать до РУ (рис. 3А). Це вказує на те, що в клітинах ЦНС щурів у стадії розвинутих неврологічних симптомів відбувається порушення функціонування CoQ у дихальному ланцюзі мітохондрій, в результаті чого втрачається здатність до передачі електронів у I та III комплексах ЛТЕ.

В тканині печінки при цьому змін не спостерігалось (рис. 3Б).

Існує багато свідчень відносно ролі CoQ у механізмах розвитку серцево-судинних, онкологічних захворювань, цукрового діабету, а також у старінні організму. Останніми роками все більше з'являється робіт, де демонструється розвиток недостатності CoQ за умов нейродегенеративних патологій, таких як хвороба Альцгеймера, Паркінсона та РС, та його нейропротекторна роль. [12]. Відомі дані відносно зниження рівня CoQ у плазмі крові за умов РС. Зміни його рівня за цих хвороб пов'язують із загальними порушеннями метаболізму ізопреноїдів, в результаті чого інгібується синтез ізопреноїдного ланцюга CoQ. [25]. Нами раніше було показано зниження рівня та інтенсивності синтезу холестеролу за умов ЕАЕ [7]. Оскільки синтез холестеролу та CoQ метаболічно пов'язані через утворення мевалонової кислоти, ці дані можуть бути до-

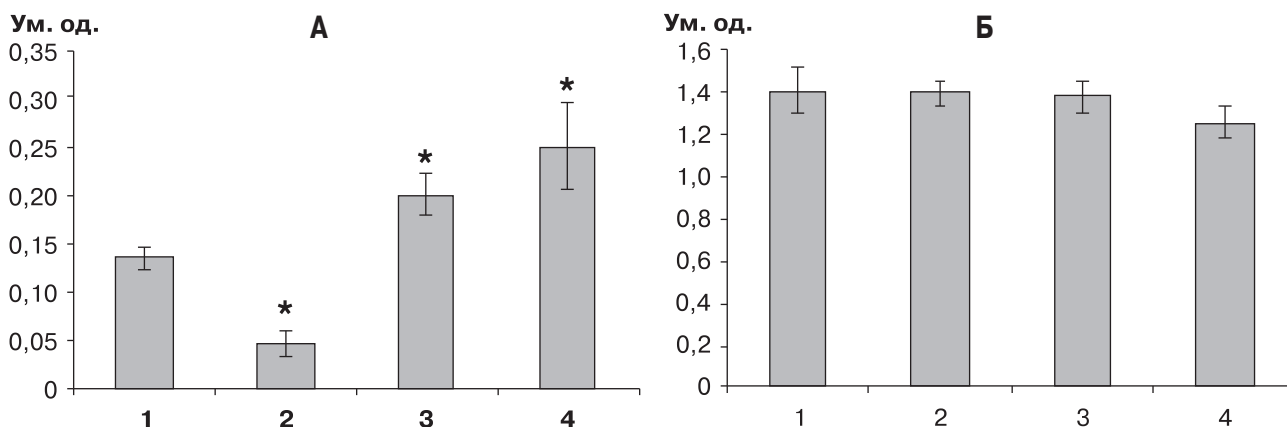


Рис. 3. Вміст радикалів убісеміхінону у мозку (А) та печінці (Б) щурів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту при введенні біологічно активних сполук, $M \pm m$, $n=5-10$, $p < 0,05$

датковим підтвердженням можливого порушення синтезу CoQ за даних умов. Таким чином, зниження рівня PU, цілком можливо, пов'язано з порушенням утворення CoQ в організмі щурів за індукції ЕАЕ.

Зниження рівня CoQ призводить до зниження рівня вітаміну Е [30] та інших антиоксидантів, а також може призвести до порушення переносу електронів у мітохондріях нервових клітин та генерації в них АФК, сприяючи заглибленню розвитку оксидативного стресу в нервовій тканині.

При застосуванні досліджуваних біологічно активних сполук і їх комплексів в умовах моделі вміст убісеміхінону в мозку достовірно підвищується. При цьому його рівень у досліджуваній термін захворювання навіть перевищує величини, що реєструються в інтактних тварин, що, як ми вважаємо, пов'язано не тільки з антиоксидантними й мембраностабілізаційними властивостями досліджуваних речовин, а й з їх здатністю регулювати біосинтез CoQ.

ВИСНОВКИ

Отже, результати досліджень показали, що за умов розвитку ЕАЕ відбуваються процеси порушення функціональної активності мітохондрій у клітинах мозку й печінки тварин. Зокрема, спостерігається суттєве зниження у мітохондріях мозку й печінки імунізованих тварин вмісту залізо-сірчанних білків N-2, що належать до NADH-убіхінон-оксидоредуктазного комплексу, а також радикалів убісеміхінону у мозку. При цьому у мозку тварин за умов розвитку ЕАЕ підвищується рівень нітрозильних комплексів заліза, що свідчить про істотну роль активних форм нітрогену в ушкодженні ЛТЕ мітохондрій мозку. Ці зміни свідчать про ушкодження за умов розвитку ЕАЕ мембранних і субмембранних структур, мітохондріального електрон-транспортного ланцюга та роз'єднання клітинного дихання з окислювальним фосфорилуванням.

Спектр ЕПР тканини мозку тварин за умов ЕАЕ, має відмінності, які можна трактувати як зсув у редокс-стані мітохондрій і мікросом у бік окислення, яке характеризується зростанням рівня утворення супероксидних аніон-радикалів, NO та нітрозильних сполук. Це може призводити до незворотніх змін в мембранах мітохондрій, втрати здатності до енергізації, порушення спряження дихання і фосфорилування, і в подальшому, навіть, до руйнування дихального ланцюга.

Зниження мітохондріальної функції ушкоджених нервових клітин призводить до зниження енергетичного потенціалу, що обумовлює багато патомеханізмів за умов РС, включаючи руйнування складових мієліну та апоптоз клітин.

Дослідження показали також, що застосування окремо вітаміну D3 на фоні розвитку захворювання призводило до деякого поліпшення функціонального стану мітохондрій тканин, в той час, як доповнення раціону тварин композицією вітамінів і мінеральних речовин в основному ефективно запобігало його порушенню. Розроблена композиція біологічно активних речовин, зокрема, ефективно усувала зниження рівня ЗСБ N2 та убісеміхінону в мозку, сприяючи нормалізації ланцюга транспорту електронів мітохондрій і виявляючи тим самим антиоксидантний, антиапоптичний, протекторний ефект на клітини головного мозку щурів в умовах ЕАЕ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ажипа Я.И. Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса. — М.: Наука, 1983. — 528 с.
2. Донченко Г.В. Биохимия убихинона (Q). — К.: Наук. думка, 1988. — 240 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
4. Лукьянчук В.Д. Влияние фенобарбитала на кинетику изменения уровней парамагнитных комплексов некоторых металлопротеидов при интоксикации динитрофенолами // Фармакол. и токсикология. — 1985. — № 6. — С. 102–104.
5. Морозова Р.П., Пасічна Е.П., Донченко Г.В., Кастрикіна Т.Ф., Сілонов С.Б., Паливода О.М., Делеменчук Н.В. Ліпіди і кальпайн у тканинах морських свинок у процесі розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту // Укр. біохім. журнал. — 2007. — Т. 79, № 1. — С. 104–111.
6. Пасічна Е.П., Донченко Г.В., Морозова Р.П. Дія вітаміну D3 на розвиток оксидативного стресу та ліпідного дисбалансу в тканині мозку щурів за умов експериментального аутоімунного енцефаломієліту // Біологія тварин (Львів). — 2010. — Т. 12, №1. — С. 204–211.
7. Пасічна Е.П., Донченко Г.В., Морозова Р.П. Ліпіди клітин головного мозку за умов експериментального аутоімунного енцефаломієліту // Медична хімія. — 2009. — Т. 11, № 3. — С. 113–115.
8. Campbell G.R, Ziabreva I, Reeve AK, et. al. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. // Ann. Neurol. — 2011. — Vol. 69, № 3 — P. 481–492.
9. Cecchini O. Function and structure of complex II of the respiratory chain // Ann. Rev. Biochem. — 2003. — Vol. 72. — P. 77–109.
10. Clementi E., Brown G.C., Feelisch M., Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. — 1998. — Vol. 95, № 13 — P. 7631–7636.
11. Depeint F., Bruce W.R., Shangari N., Mehta R., O'Brien P.J. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism // Chem. Biol. Interact. — 2006. — Vol. 163, № 1–2. — P. 94–112.

12. Dhanasekaran M, Ren J. The emerging role of coenzyme Q-10 in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus // *Curr. Neurovasc. Res.* — 2005. — Vol. 2, № 5. — P. 447–459.
13. Heales S.J.R., Bolaños J.P. Impairment of brain mitochondrial function by reactive nitrogen species: the role of glutathione in dictating susceptibility // *Neurochemistry International.* — 2002. — Vol. 40, P. 469–474.
14. van Horsen J., Schreibelt G., Drexhage J. et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression // *Free Radic. Biol. Med.* — 2008. — Vol. 45, № 12. — P. 1729–1737.
15. Lassmann H., Brück W., Lucchinetti C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview // *Brain Pathol.* — 2007. — № 2. — P. 210–218.
16. Lenaz G., Fato R., Gerova M.L. et al. Mitochondrial Complex I: structural and function aspects // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — № 9–10. — P. 1406–1420.
17. Liu J.S., Zhao M.L., Brosnan C.F., Lee S.C. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions // *Am. J. Pathol.* — 2001. — Vol. 158, № 6. — P. 2057–2066.
18. Mahad D., Lassmann H., and Turnbull D. Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* — 2008. — Vol. 34, № 6. — P. 577–589.
19. Mahad D.J., Ziabreva I., Campbell G. et al. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis // *Brain.* — 2009. — Vol. 132 (Pt 5). — P. 1161–1174.
20. Mahad D., Ziabreva I., Lassmann H., Turnbull D. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions // *Brain.* — 2008. — Vol. 131 (Pt 7). — P. 1722–1735.
21. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species // *Biochem. J.* 2009. — Vol. 417, № 1. — P. 1–13.
22. Sanina N.A., Syrtsova E.A., Shkondina N.I. Reactions of sulfox-nitrosylation complexes of g-2,03 family with gentoglobin (Hg) kinetics of Hb-NO formation in aqueous solutions // *Nitric Oxide.* — 2007. — Vol. 16, № 2. — P. 181–188.
23. Selmaj K.W., Raine C.S. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro // *Ann. Neurol.* — 1988. — Vol. 23. — P. 339–346.
24. Sharma R., Fischer M.T., Bauer J. et al. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination // *Acta Neuropathol.* — 2010. — Vol. 120, № 2. — P. 223–236.
25. Syburra C., Passi S. Oxidative stress in patients with multiple sclerosis // *Ukr. Biokhim. Zh.* — 1999. — Vol. 71, № 3. — P. 112–115.
26. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q // *BBA.* — 2004. — Vol. 1660, № 1–2. — P. 177–199.
27. Veto S., Acs P., Bauer J. et al. Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death // *Brain.* — 2010. — Vol. 133 (Pt 3). — P. 822–834.
28. Werner P., Pitt D., Raine C.S. Glutamate excitotoxicity — a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis? // *J. Neural. Transm. Suppl.* — 2000. — Vol. 60. — P. 375–385.
29. Witte M.E., Geurts J.J., de Vries H.E. et al. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? // *Mitochondrion.* — 2010. — Vol. 10, № 5. — P. 411–418.
30. Ziabreva I., Campbell G., Rist J. et al. Injury and differentiation following inhibition of mitochondrial respiratory chain complex IV in rat oligodendrocytes // *Glia.* 2010. — Vol. 58, № 15. — P. 1827–1837.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ ВИТАМИНАМИ

Э.П. Пасичная, Г.В. Донченко,
Н.В. Делеменчук, А.П. Бурлака

Экспериментальный аллергический энцефаломиелит на сегодняшний день считается наиболее адекватной моделью аутоиммунных заболеваний ЦНС человека, в частности рассеянного склероза. Методом ЭПР-спектроскопии выявлено существенное снижение в мозге и печени иммунизированных животных уровня железосерных белков N-2 (ЖСБ N2), входящих в состав NADH-убихинон-оксидоредуктазного комплекса митохондрий, а также (в мозге) радикалов убисемикинона; при этом в мозге повышаются уровни нитрозильных комплексов железа. Эти изменения свидетельствуют об окислительном повреждении компонентов электрон-транспортной цепи митохондрий и разобщении клеточного дыхания с окислительным фосфорилированием, что может способствовать активации процессов демиелинизации и нейродегенерации. Применение витамина D3 и разработанной нами композиции биологически активных веществ эффективно предупреждало снижение уровня ЖСБ N2 в мозге и печени, а также убисемикинона в мозге, способствуя нормализации функционального состояния митохондрий, тем самым проявляя антиоксидантный, антиапоптотический, протекторный эффект на клетки головного мозга и печени крысы. При этом композиция биологически активных веществ была эффективнее в нормализации обнаруженных нарушений.

FUNCTIONAL STATE OF MITOCHONDRIA AT EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS AND ITS VITAMIN CORRECTION

E.P. Pasichna, G.V. Donchenko,
N.V. Delemenchuk, A.P. Burlaka

Experimental allergic encephalomyelitis is presently considered as the most adequate model of human autoimmune diseases of CNS, in particular multiple sclerosis. The method of EPR-spectrometry allowed to reveal an essential decrease of level of iron-sulfur (Fe/S) proteins N2 which are the part of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase complex in brain and liver of rats with EAE, as well as a brain level of the radicals of ubisemiquinone. At the same time the level of nitroso-iron complexes in brain was raised. These changes confirm the oxidative damage of mitochondrial electron transport chain components and decouple of the cellular respiration with the oxidative phosphorylation that can promote activation of processes of demyelination and neurodegeneration. Supplements of vitamin D3 as well as the composition of biologically active substances were developed by us effectively prevented decrease level of Fe/S proteins N2 in brain and liver, as well as level of ubisemiquinone in brain, promoting normalization of a functional condition of mitochondria, thereby showing antioxidant, antiapoptotic and protective effect on cells of brain and liver of rats. Thus the composition of biologically active substances was more effective in normalization of the found disturbances.