

ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СДВИГОВ ПРИ ГИПОКСИИ НА МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ

Бульон В.В., Хныченко Л.К., Сапронов Н.А., Коваленко А.Л.,
Алексеева Л.Е., Романцов М.Г., Чеснокова Н.П., Бизенкова М.Н.

*Отдел нейрофармакологии НИИ экспериментальной медицины РАМН,
Научно-технологическая фармацевтическая фирма «Полисан»,
Санкт-Петербург,
Саратовский государственный медицинский университет, Саратов*

В первичной культуре неонатальных миокардиоцитов крыс в условиях экспериментальной гипоксии обнаружено одновременное снижение содержания РНК в цитоплазме, площади клеток и площади ядер миокардиоцитов. Добавление в культуральную среду миокардиоцитов в условиях гипоксии цитофлавина обеспечивало резкое увеличение по сравнению с показателями контроля содержания РНК в цитоплазме миокардиоцитов, площади клеток и площади ядер. Эффекты неотона в культуре клеток проявились лишь в депотенцировании катаболических эффектов гипоксии; при этом площадь миокардиоцитов и ядер клеток уменьшалась в меньшей степени, а уровень РНК в цитоплазме не снижался по сравнению с таковыми показателями в опытах без добавления неотона в культуральную среду миокардиоцитов с экспериментальной гипоксией.

Гипоксия - типовой патологический процесс, осложняющий течение различных заболеваний инфекционной и неинфекционной природы, определяющий в значительной мере тяжесть течения патологии и ее исход.

Несмотря на различие этиологических факторов, инициирующих развитие гипоксии, сложность патогенеза метаболических и функциональных сдвигов в случаях развития гипоксии и аноксии, выявляются общие закономерности нарушения структуры и функции клеток различных органов и тканей. При этом возникают активация процессов липопероксидации и повышение проницаемости биологических мембран, что проявляется явлениями деполяризации клеток, набуханием митохондрий, активацией лизосомальных гидролаз и соответственно нарушением возбудимости, функциональной активности клеток, развитием синдрома цитолиза [4,5].

Последнее определяет целесообразность дальнейшей апробации антиоксидантов на клеточном уровне в условиях ишемии и гипоксии.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния цитофлавина и неотона на культуру первичных неонатальных кардиомиоцитов крыс в условиях экспериментальной гипоксии.

Материалы и методы исследования

Гипоксия неонатальных кардиомиоцитов крыс в экспериментальных условиях воспроиз-

водилась заменой кислорода в культуральной среде инертным газом (N₂ 95%, CO₂ 5%) на 60, 120 и 180 мин культивирования в среде с ограничением культурального объема (в 2 раза) и сыворотки (1% телячьей сыворотки) (Van Nieuwenhoven et al., 1996).

В каждой группе экспериментов проведено по 10 – 15 наблюдений. Контролем служили неонатальные кардиомиоциты, полученные методом ферментативной диссоциации фрагментированных желудочков крыс и культивируемые в среде с добавлением 5% телячьей сыворотки (Simpson, 1985).

Механизмы действия цитофлавина и неотона изучали на модели острой гипоксии культуры в процессе добавления в среду культивирования за двое суток до эксперимента и затем ежедневно неотона в дозе 0,2 мг/мл или цитофлавина в дозе 2 мкг/мл среды.

В экспериментах с хронической гипоксией препараты добавлялись ежедневно в течение 7 суток культивирования. Смена среды производилась 1 раз в 2-3 суток.

Для сравнительной оценки биологических эффектов тестируемых препаратов использованы следующие параметры:

1) цитометрические показатели (площадь кардиомиоцитов планиметрическим методом, размеры ядер).

2) Содержание РНК в цитоплазме кардиомиоцитов методом сканирующей денситометрии препаратов, окрашенных галлоцианинхромовыми квасцами, на интегрирующем цитофотометре МЦФУ2-МП (ЛОМО) при длине волны 550 нм (Селинова и др., 1988);

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований обнаружено, что в условиях экспериментальной гипоксии культуры тканей миокардиоцитов возникает резкое уменьшение площади ядер (на 31 %) и площади клеток (на 30 %), то есть примерно в равной мере. Одновременно отмечается снижение уровня РНК примерно на 51 %, то есть выраженное в большей степени, чем снижение площади клеток и площади ядер (таб. 1).

Принимая во внимание важную роль всех видов РНК в процессе синтеза структурных и ферментных белков клеток, становится очевидной возможность подавления белоксинтетической функции миокардиоцитов в условиях экспериментальной гипоксии.

Добавление в культуральную среду цитофлавина не только препятствовало развитию структурных и метаболических сдвигов, свойственных миокардиоцитам в условиях экспериментальной гипоксии, но и обеспечивало резкое увеличение синтеза РНК в цитоплазме миокардиоцитов и соответственно активацию анаболических процессов. Об этом свидетельствовало резкое возрастание уровня РНК в цитоплазме миокардиоцитов, увеличение площади клеток и площади ядер не только по отношению к таковым показателям культуры клетки в условиях гипоксии, но и по отношению к интактной культуре тканей (таб. 1).

Касаясь анаболических эффектов цитофлавина в культуре тканей ишемизированных миокардиоцитов, следует отметить особенности биологических эффектов его активных компонентов: янтарной кислоты, никотинамида, рибоксина, рибофлавина мононуклеотида.

Так, янтарная кислота является естественным эндогенным субстратом клетки, действие которого реализуется в цикле трикарбоновых кислот, в процессе окислительного фосфорилирования и активации тканевого дыхания. В условиях гипоксии экзогенно вводимый сукцинат может поглощаться через альтернативный метаболический путь сукцинатаоксидазной системы, с последующим потреблением в дыхательной цепи митохондрий.

Что касается других компонентов цитофлавина, следует отметить, что рибоксин – производное пурина, рассматривается как предшественник АТФ, повышает активность ряда фермен-

тов цикла Кребса, стимулирует синтез нуклеотидов и обменных процессов в миокарде.

Один из компонентов цитофлавина - никотинамид является простетической группой ферментов – кодегидрогеназ – переносчиков водорода и осуществляющих окислительно - восстановительные процессы.

В то же время рибофлавин мононуклеотид входит в состав ферментов, регулирующих окислительно-восстановительные реакции и участвующий в процессах белкового и жирового обмена [1].

Таким образом, сочетание активных компонентов в цитофлавине – сукцината, рибоксина, рибофлавина мононуклеотида и никотинамида обеспечивает развитие анаболических эффектов в культуре тканей миокардиоцитов, что свидетельствует о целесообразности использования указанного препарата в клинической практике в комплексном лечении ИБС.

В последующих наблюдениях проведено изучение метаболических эффектов другого препарата – неотона (экзогенного креатинфосфата) в культуре миокардиоцитов в условиях экспериментальной гипоксии [2].

Как оказалось, неотон, являясь донатором макроэргических фосфатных связей, обладал значительно меньшим анаболическим действием по сравнению с цитофлавином, препятствуя, в определенной степени, развитию катаболических реакций, свойственных экспериментальной гипоксии.

Так, на фоне введения неотона в культуральную среду при экспериментальной гипоксии возникало уменьшение площади клеток и площади ядер миокардиоцитов по сравнению с таковыми показателями контроля, выраженное, однако, в меньшей мере, чем в культуре миокардиоцитов в условиях гипоксии без добавления неотона (таб. 1). В то же время неотон препятствовал снижению содержания РНК в цитоплазме миокардиоцитов, обеспечивая даже некоторое увеличение этого соединения по сравнению с показателями контроля (таб. 1).

Таким образом, эксперименты с культурой миокардиоцитов позволили обнаружить метаболические эффекты гипоксии на клеточном уровне, а также определенные возможности их медикаментозной коррекции.

Выводы.

1. В культуре неонатальных миокардиоцитов крыс в условиях экспериментальной гипоксии обнаружено преобладание катаболических реакций, о чем свидетельствуют снижение содержания РНК в цитоплазме миокардиоцитов, площади клеток и площади ядер.

2. Введение цитофлавина в культуральную среду с миокардиоцитами в условиях экспериментальной гипоксии обеспечивает развитие анаболических эффектов, что проявляется увеличением содержания РНК в цитоплазме миокардиоцитов, возрастанием площади клеток и площади ядер.

3. Метаболические эффекты неотона в культуре миокардиоцитов в условиях экспериментальной гипоксии выражены в меньшей сте-

пени, чем у цитофлавина, и проявляются в увеличении содержания РНК в цитоплазме при одновременном снижении площади клеток и площади ядер миокардиоцитов.

4. Анаболические эффекты цитофлавина в культуре тканей первичных миокардиоцитов в условиях экспериментальной гипоксии свидетельствуют о целесообразности использования указанного препарата в комплексной терапии ИБС.

Таблица 1. Метаболические эффекты цитофлавина и неотона в культуре тканей неонатальных миокардиоцитов в условиях экспериментальной ишемии

Варианты культивирования	Площадь ядер, у.е.		Площадь клеток, у.е.		Содержание РНК в цитоплазме, у.е.	
	M±m	p	M±m	p	M±m	p
Контроль	1,32 ± 0,09	-	12,3 ± 0,38	-	0,406 ± 0,012	-
Контроль + неотон	1,28 ± 0,04	P ₁ >0.1	13,52 ± 0,75	P ₁ >0.1	0,392 ± 0,022	P ₁ >0.1
Контроль + цитофлавин	1,13 ± 0,05	P ₁ <0.01	15,39 ± 0,47	P ₁ <0.001	0,585 ± 0,018	P ₁ <0.001
Гипоксия	0,92 ± 0,03	P ₁ <0.001	8,70 ± 0,28	P ₁ <0.001	0,209 ± 0,012	P ₁ <0.001
Гипоксия + неотон	1,07 ± 0,04	P ₁ <0.01 P ₂ <0.001	10,07 ± 0,33	P ₁ <0.01 P ₂ <0.005	0,453 ± 0,015	P ₁ <0.01 P ₂ <0.1
Гипоксия + цитофлавин	1,59 ± 0,06	P ₁ <0.01 P ₃ <0.001	18,63 ± 0,48	P ₁ <0.01 P ₃ <0.001	0,764 ± 0,020	P ₁ <0.001 P ₃ <0.05

Примечание: количество наблюдений в каждой серии 10 – 15.

P₁ – степень достоверности по отношению к контролю,

P₂ – степень достоверности по отношению к контроль + неотон,

P₃ – степень достоверности по отношению к контроль + цитофлавин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Афанасьев В.В. Цитофлавин в интенсивной терапии: Пособие для врачей. – СПб. – 2005.- 36 с. – с. 9-30.

2. Галяутдинов Г.С., Коц Я.И., Вдовенко Л.Г., соавт. Лечебное применение неотона при застойной сердечной недостаточности/Неотон: современное состояние исследований.-Л.90.С.21.

3. Зарубина И.В. Принципы фармакотерапии гипоксических состояний антигипоксантами – быстросействующими корректорами метабо-

лизма //Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапия. – 2002. – Т.1. - № 1. с. 19-28.

4. Патологическая физиология и биохимия: Учебное пособие для ВУЗов /- М.: Издательство «Экзамен». 2005. – 480с. – с.140-151.

5. Типовые патологические процессы /Н.П. Чеснокова: Монография /- Издательство Саратовского медицинского университета. 2004. – 400 с. - с. 132-136.

THE EVALUATION OF THE METABOLIC SHIFTS AT HYPOXIA ON THE MOLECULAR-CELLULAR LEVEL AND THE POSSIBILITIES OF THEIR MEDICAL CORRECTION

Bulion V.V., Hnychenko L.K., Saprionov N.A.,

Kovalenko A.L., Aleksejeva L.E., Romantsov M.G., Chesnokova N.P., Bizenkova M.N.

*Scientific –technological pharmaceutical company “Polysan”, Saint-Peterburg,**The department of neuropharmacology of the research institute of experimental medicine of RAMS,
Saratov State Medical University, Saratov*

In the initial culture of the rats' neonatal myocardiocyte in the environment of experimental hypoxia we discovered the simultaneous decrease of the RNA content in cytoplasm, cells and square nucleus of myocardiocytes. The addition of cytoflavin to cultural environment of myocardiocytes in the conditions of hypoxia provided sharp increase in comparison with the RNA content control indices in the cytoplasm of myocardiocytes, cells and nuclei squares. The neoton effects in cells' culture appeared only in deexponentiation of catabolic hypoxia effects; in this case the square of myocardiocytes and cells' nuclei was decreasing to a lesser degree, and the RNA level in cytoplasm did not decrease in comparison with those indices of the experiments without neoton addition to cultural environment of myocardiocytes with experimental hypoxia.