

УДК 546.174.611.817

ОКСИД АЗОТА И НИТРИТНЫЕ ИОНЫ В ЭНЕРГЕТИКЕ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА

Сорокина Е.Г., Пинелис В.Г., Реутов В.П., Юрвичус А.И., Сенилова Я.Е.

ГУ Научный Центр Здоровья Детей РАМН, Москва, Россия;

Институт ВНД и НФ РАН, Москва, Россия

valentinreutov@mtu-net.ru

Введение

Нарушение обмена основного возбуждающего медиатора глутамата (Глу) с последующим увеличением его содержания в синаптических щелях является пусковым механизмом в развитии цепочки повреждений нейронов при самых различных неврологических заболеваниях, включая инсульты, эпилепсию, болезни Паркинсона и Альцгеймера, а также травматические повреждения мозга. Все эти неврологические заболевания, как правило, сопровождаются гипоксией/ишемией нервной ткани [9] и активацией образования оксида азота (NO) в мозге [6, 8].

Снижение содержания АТФ в нейронах при гипоксии мозга и гиперстимуляции глутаматных рецепторов способно нарушить систему внутри- и межклеточной сигнализации в нейронах мозга, в частности ионный обмен, активность ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования, захват Ca^{2+} митохондриями и синтез белков [4, 5, 6, 7].

В данной работе изучали действие эндогенного глутамат-индуцированного NO и действие экзогенно добавленных доноров NO – нитрита натрия ($NaNO_2$) и нитрозоцистеина (SNOC) на содержание АТФ в культивируемых нейронах мозжечка.

Методы исследования

Исследования проводили на 7-8 дневных культивируемых нейронах мозжечка. Методика приготовления суспензии клеток для выращивания культуры нейронов описана в работах [1, 2, 3]. Клетки в культуре отмывали контрольным раствором следующего состава (в мМ): 130 NaCl; 5,6 – KCl; 1,8 – $CaCl_2$; 1,0 –

$MgCl_2$; 20 – HEPES; 5,0 – глюкоза; pH=7,4. Изучали воздействие на уровень АТФ 100 мкМ Глу, ингибирование NO-синтазы 100 мкМ L-NAME и доноров NO – $NaNO_2$ и SNOC в концентрации 100 -1000 мкМ.

Экстракцию АТФ проводили раствором 2% ТХУ с 2 мМ ЭДТА, после чего полученные экстракты нейтрализовали 3М KOH/1,5 М Tris. После центрифугирования концентрацию АТФ определяли люминесцентным методом в аликвоте супернатанта с помощью люциферин-люциферазы (Calbiochem) в 0,1 М Tris-ацетатном буфере при pH= 7,75. Полученные значения АТФ соотносили с содержанием белка в исследуемом образце. Концентрацию белка определяли после добавления к клеткам 0,1н NaOH с помощью реактива и протокола фирмы Bio Rad. Результаты представляли в % по отношению к контролю, содержание АТФ в котором соответствовало $6,8 \pm 0,5$ нмоль/мг белка и принималось за 100%. Содержание продуктов NO (нитритов и нитратов, NO_x) в культуре клеток мозжечка определяли после осаждения белков с помощью набора реактивов фирмы Calbiochem, основанного на переводе нитратов с помощью нитратредуктазы в нитриты с последующим анализом содержания нитритов по методу Грисса (соответственно протоколу фирмы-разработчика).

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что снижение концентрации АТФ в культуре клеток мозжечка зависело от длительности воздействия Глу, при этом наиболее выраженное снижение наблюдалось лишь в первые 30 мин.

Сразу после 10 мин воздействия Глу содержание АТФ снижалось до $62 \pm 10\%$, после 30 мин воздействия – до $47 \pm 5\%$, после 2-х часов – до $40 \pm 4\%$, а после 4х часов – до $36 \pm 2\%$ от контрольного уровня. После прекращения воздействия Глу уровень АТФ в нейронах восстанавливался к 24 часам практически до контрольного уровня (рис. 1). Ингибирование NO-синтазы во время действия Глу предотвращало снижение АТФ лишь на 15 - 20%. В постглутаматном периоде ингибирование синтеза NO во время действия Глу либо не оказывало существенного влияния на динамику изменений [АТФ], либо способствовало снижению восстановления уровня АТФ по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствовали о том, что эндогенный NO неоднозначно влияет на содержание АТФ в постглутаматный период: во время действия Глу снижает [АТФ], а в дальнейшем или не оказывает никакого влияния, или участвует в восстановлении [АТФ]. Известно, что NO является короткоживущей молекулой и быстро превращается в нитриты и нитраты. Проведенные исследования концентрации NO_x в культуре мозжечка показали, что сразу после 30 мин воздействия Глу уровень NO_x существенно превышал таковой в контрольных культу-

рах (15 ± 3 мкМ – в контроле и 75 ± 13 мкМ – после действия глутамата).

Основываясь на данных о способности NO_2^- ионов в гипоксических условиях акцептировать электроны с дыхательной цепи на уровне цитохромоксидазы и, таким образом участвовать в образовании АТФ [2], представляло интерес выяснить, способны ли нитриты участвовать в восстановлении содержания АТФ после действия глутамата. В наших экспериментах показано, что действие Глу на фоне нитритов увеличивало содержание АТФ на 50% по сравнению с действием одного Глу (рис. 2А). Более того, NaNO_2 и NO-генерирующее соединение SNOС в концентрации 100 мкМ повышали уровень АТФ по сравнению с контролем в отсроченном периоде после действия (рис. 2Б).

Это повышение содержания АТФ мы связываем с акцептированием электронов с цитохромоксидазы ионами NO_2^- при добавлении NaNO_2 или с образованием этих же ионов при распаде 100 мкМ SNOС. Однако при действии более высоких (1000 мкМ) концентраций SNOС мы наблюдали снижение [АТФ] в нейронах. Значительное снижение [АТФ] при действии высоких концентраций SNOС связано с ингибированием NO не только IV комплекса [5, 6], но также I и II комплексов (с ингибированием электронно-транспортной цепи митохондрий NO за счет связывания его с гемовым и негемовым железом, входящим в состав этой цепи). В этих условиях способность акцептировать электроны с дыхательной цепи ионами NO_2^- , образующимися при распаде SNOС, не может эффективно влиять на повышение уровня АТФ. Более высокие концентрации SNOС способны генерировать большее количество NO, а, следовательно, больше таких токсичных продуктов NO, как пероксинитрит (ONOO^-) и двуокись азота (NO_2), блокирующих начальные звенья дыхательной цепи и способных повреждать ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов мембран митохондрий. С этим мы

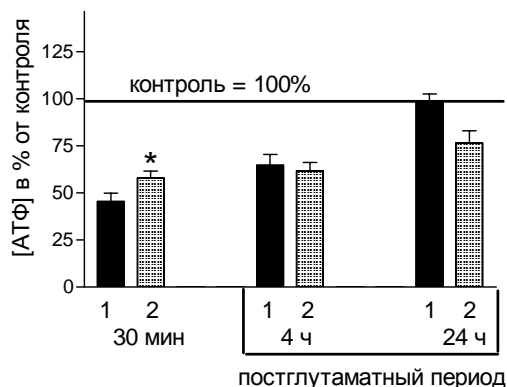


Рис. 1. Восстановление уровня АТФ в постглутаматном периоде:

- 1- действие 100 мкМ Глу;
- 2- действие 100 мкМ Глу в присутствии 100 мкМ L-NAME

* - $p < 0,05$ с контролем.

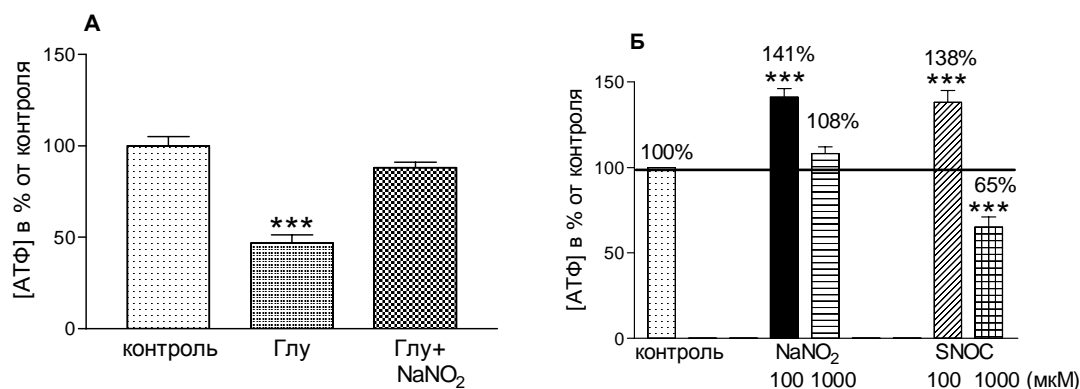


Рис. 2. Действие нитритов и нитрозоцистеина на содержание АТФ в культуре нейронов мозжечка. А – уровень АТФ после 30 мин действия 100 мкМ глутамата (Глу) и 100 мкМ NaNO₂; Б – уровень АТФ через 4 часа после 30 мин действия NaNO₂ и нитрозоцистеина (SNOС); *** - $p < 0,001$ с контролем.

полагаем и связано неоднозначное действие 100 и 1000 мкМ SNOС на синтез АТФ в нейронах мозжечка.

Таким образом, нами показано, что оксид азота оказывает неоднозначное действие на уровень АТФ в нейронах мозжечка: в небольших концентрациях NO способно повышать, а в высоких концентрациях – снижать образование АТФ. Нитриты, являясь одними из продуктов NO, способны выступать в качестве альтернативных источников образования АТФ в условиях гиперстимуляции глутаматных рецепторов.

Поддержано грантами РФФИ.

Литература

1. Пинелис В.Г., Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Винская Н.П., Исаев Н.К., Викторов И.В. // Доклады РАН. 1997. Т. 352. № 2. С. 259 - 261.
2. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука. 1998. 156 с.
3. Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Пинелис В.Г., Винская Н.П., Вергун О.В., Ходоров Б.И. // Биологические мембраны. 1999. Т. 16. № 3. С. 318 - 323.
4. Ames A. III. // Brain Res. Rev. 2000. V.34. P. 42-68.

5. Beltran B., Mathur A., Duchon M.R. et al. // PNAS. 2000.V. 97. No. 26. P. 14602 - 14607.
6. Bolanos J.P., Almeida A., Stewart V. et al. // J.of Neurochem. 1997. V. 68. №. 6. P. 2227-2240.
7. Brorson J.R., Schumacker P.T., Zhang He.// The J. of Neuroscience. 1999. Vol. 19. No. 1. P. 147 - 158.
8. Lipton P. // Physiol. Rev. 1999. V. 79. No. 4. P. 1431 - 1568.
9. White B. S. et al.// J. of Neurol. Sciences. 2000. V.179. P. 1 - 33.

Резюме

ОКСИД АЗОТУ І НІТРИТНІ ІОНИ В ЕНЕРГЕТИЦІ НЕЙРОНІВ МОЗОЧКА

Сорокина Е.Г., Пинелис В.Г., Реутов В.П., Юрвичус А.І., Сенилова Я.Е.

Зниження вмісту АТФ в нейронах при гіпоксії мозку і гіперстимуляції глутаматних рецепторів здатне порушити систему внутри- і міжклітинної сигналізації в нейронах мозку, зокрема іонний обмін, активність ферментів гліколізу і окислювального фосфорилування, захоплення Ca²⁺ мітохондріями і синтез білків. В даній роботі вивчали дію ендogenous глутамат-індукованого NO і дію екзогенних донорів NO – нитриту натрію (NaNO₂) і нитрозоцистеїну (SNOС) на вміст АТФ в 7-8 денних культивованих нейронах мозочка.

Summary

NITRIC OXIDE AND NITRITE IONS IN THE CEREBELLUM NEURONE ENERGETICS

Sorokina E.G., Pinelis V.G., Reutov V.P., Yurjavichus A.I., Senilova Ya.E.

Decrease of content АТРА in neurones at a hypoxia of a brain and a hyperstimulation глутаматных receptors is capable to break system inside and the intercellular signal system in neurones of a brain, in particular an ion exchange, activity of enzymes of glycolysis and oxidative

phosphorylation, seizure Ca^{2+} mitochondrions and synthesis of proteins. In the given work studied action endogenic glutamate - induced NO and action of exogenous padding donors NO - diazotizing salt ($NaNO_2$) and нитрозоцистеина (SNOС) on content АТРА in 7-8 diurnal cultivated{incubated} neurones of a cerebellum.

*Впервые поступила в редакцию 18.09.2007 г.
Рекомендована к печати на заседании ученого совета НИИ медицины транспорта (протокол № 6 от 19.11.2007 г.).*