

TOMSK'TAN DOĞAL HÜMİK ASİTLERİNİN ETKİSİ
BÖLGE OVAK Mİ TOKRONDRİ AL OKSİDATİF ÜZERİNDEKİ TORF
HİPOKSİK KOŞULLAR ALTINDA FOSFORİLASYON

MV Belousov,1 RR Akhmedzhanov,2 MV Zykova,1 K.
Yu. Vasil'ev,1 ve MS Yusubov1, 2

Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal, Vol. 49, sayı 4, s. 39 – 43, Nisan 2015.

Orijinal makale 28 Aralık 2012'de gönderildi.

Turba humik asitleri (PHA'lar), süksinat ve NAD'ye bağlı enerji üretim süreçlerinin aktivitesini normalleştirmek ve fare serebral ve hepatik mitokondride oksidatif fosforilasyonun bağlantısını kesilmesini önlemek için hiperkapni ile deneysel normobarik hipoksi altında bulundu. PHA'ların antihipoksik aktivitesi, fare beyindeki referans antihipoksan dihidrokuersetin ile karşılaştırıldı ve karaciğerde bunu aşmıştır. Serebral ve hepatik mitokondride oksidatif fosforilasyonun PHA'ları tarafından gözlenen normalleşmesi, muhtemelen hipoksik koşullar altında hücre ve organellerin serbest radikal hasarını önleyen koruyucu özellikleriyle ilişkilidir.

Anahtar Kelimeler: turba humik asitleri, hipoksi, antihipoksik aktivite, oksidatif fosforilasyon.

Literatüre göre hipoksik aktivite, lipid peroksidasyonunun yoğunlaşması ve bunun sonucunda hücre serbest radikal hasarı sonucu mitokondride (MC) oksidatif fosforilasyonun kesilmesi ile ilişkilidir [1].

Turba humik asitleri (PHA'lar), belirgin antioksidan [2 – 5] ve şelatlama özellikleri [6 – 9] sergiler ve hipoksik koşullar altında MC membranlarına zarar veren Ca²⁺ dahil metal iyonları ile kompleksler oluşturma yeteneğine sahiptir [10 – 13].

Bu nedenle, PHA'ların serebral ve hepatik MC'de oksidatif fosforilasyon üzerindeki etkisi, hipoksik koşullar altında incelendi ve PHA'ların antihipoksik aktivitesinin olası mekanizmalarını bulmak için dihidroquercetin (DHQ) [14] ile karşılaştırıldı. DHQ, akut beyin iskemisi [15] ve miyokard enfarktüsü [16] sırasında serebro-koruyucu ve hemo-reolojik özellikler sergiledi.

DENEYSEL KİMYASAL BÖLÜM

Hüyük asitler (HA'lar), Tomsk Oblast'taki Klyukvennoe yatağına odunsu-çimenli turbasından NaOH çözümü (0.1 N) ile sırtma olması için ekstrakte edildi ve ekstraktan HCl çözümü (%10) ile çöktürüldü, su ile durulandı.

¹ Sibiry Devlet Tıp Üniversitesi, Tomsk, 634050 Rusya.

² Tomsk Ulusal Araştırma Politeknik Üniversitesi, Tomsk, 634050 Rusya.

H₂O, turnusol için nötr olana kadar saflaştırıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Çalışılan PHA'lar, preslenmiş KBr peletleri (1:100 oranı sırasıyla) 500 – 4000 cm⁻¹ aralığında. Ters titrasyonlar (toplam fenolik ve karboksilik gruplar için barit yöntemiyle ve toplam karboksilik gruplar için Ca-asetat yöntemiyle belirlenen asidik fonksiyonel grupların içerikleri [18]; fonksiyonel grupların toplam içerikleri arasındaki farktan bulunan fenolik hidroksillerin içeriği ve karboksilik grupların içeriği), element analizi (Model 1106 CHN-analyzer, Carle Erba Strumentazione, Italy üzerinde yanma ile belirlenir; oksijen içeriği, farka göre), UV spektroskopisi (Uvikon 943 spektrofotometre, İtalya, 190 – 700 nm in HA'ların sulu çözeltilerini (%0,001) kullanan 1 cm kuvars küvetler, boyutlandırma kromatografisi (Supelco Progel-TSK GMPXL kolonu üzerinde HPLC, 300 x 7,8 mm, Japonya; sorbent 13 m, 11.000 teorik plaka; mobil faz H₂O, 1 mL/dak; Agilent 1100 kromatografi, Almanya, vakumlu gaz giderici, dört kanallı gradyan pompası ve sütun termo statı).

Elde edilen PHA'lar, kokusuz koyu kahverengi bir kristal tozdu. PHA'ları n IR spektrumu, 3500 – 3300, 3250 – 3200, 2920, 2860, 1460 – 1440, 700 – 900, 2600 – 2500, 1725 – 1700, 1625 – 1610, 1510 – 1500, 125 – 125 1225 ve 1050 – 1150 cm⁻¹. Karboksilik grupları n içeriği 2.86 mg eq/g idi; fenolik hidroksiller, 3.22 mg eq/g. PHA'ları n UV absorpsiyon spektrumu, kı sa dalga boyu tarafı nda keskin bir şekilde artan ve 245 2 nm ve 294 2 nm'de iki absorpsiyon maksimumuna sahip olan 220 – 800 nm aralı ğ ı nda sürekli absorpsiyon ile düzgün bir eğ riydi. 465 nm'de (E465) sö nme katsayı ları 0,020 ± 0,002 idi; 650 nm'de (E650), 0,0041 0,0004. Renklilik katsayı sı (E465/E650) 4,88 ± 0,05 idi. PHA'ları n temel bileşimi (% kütle) C 47.0, H 5.5, N 3.8 ve O 43.5 idi. PHA'ları n moleküler ağı rlı k (MW) dağı lı mı karakteristik bir spektruma sahipti. PHA'lar MW 1.000 – 1.200 kDa idi.

DENEYSEL Bİ YOLOJİ K BÖLÜM

Deneylerde, her biri altı hayvandan oluşan dört ç alı ş ma grubuna ayrı lan 24 olgun laboratuvar erkek faresi (18 – 22 g) [19] kullanı ldı . Birinci grup, modelmeden ö nce 100 mg/kg sulu ç ö zelti (%3 kütle) dozunda 5 gün boyunca günde bir kez hipoksi PHA'ları ip alan fareleri iç ermiştir. İ kinci grup, serebro-koruyucu ve hemo-reolojik öz elliklere sahip bir polifenol (flavonoid) [14] olan referans antioksidan ilaç DHQ'yu (Lavitol, ZAO Ametis, Blagoveshchensk, TU 9325-001- 70692152-07, 12 Nisan 2007) aldı . akut beyin iskemisi [15] ve miyokard enfarktüsü [16] için. DHQ, 100 mg/kg'lı k bir dozda bir EtOH ç ö zeltisi (%10) olarak 5 gün boyunca günde bir kez ö nceden ip olarak enjekte edildi. Son PHA ve DHQ enjeksiyonları , hipoksiyi indüklemeyen 2 saat ö nce yapı ldı .

Ü ç üncü grup, hipokside ö nce eş it hacimlerde damı tı lı mı ş H2O alan kontrollerden oluşuyordu . Dördüncü grup, tedavi edilmemiş kontrol farelerini iç ermiştir.

Hiperkapnili normobarik hipoksi [20], farelerin agonal solunum ve jeneralize konvülsiyonları n başlangı cı ndan ö nce 20 – 22°C'de hermetik bir odaya (0,2 L) yerleştirilmesiyle modellendi ve gö rsel olarak belirlendi (tedavi edilmeyen hayvanlar için ortalama 16,5 ± 1,5 dakika idi) ve hareket, nefes alma ve konvülsiyonları n bozulmuş koordinasyonu ile ilişkilendirildi. Hayvanlar, hipoksiye 16.5 dakika maruz kaldı ktan sonra hemen servikal dislokasyonla ö ldürüldü.

MC'nin fonksiyonel durumu, H20'da ç ö zünmüş oksijeni ölç mek için sensö rlü bir Ekspert-001-401 analiz cihazı nda (Ekoniks-Eks pert, Moskova) polarografi kullanı larak beyin ve karaciğ er homojenatları nı n solunum aktivitesinden değ erlendirildi [21]. ADP'nin fosforilasyon dö ngüsünden ö nce, sı rası nda ve sonrası nda MC oksijen talebinin oranı ,

1 10–4 M konsantrasyon (V4p, V3 , ve V4o) ve fosforilasyon süresi hesaplandı . Substratlar flavin bağı mlı süksinat (110–3 M) ve NAD bağı mlı malat ve glutamat (her biri 310–3 M) idi. süksinat de

NAD'a bağı lı substratları n (NAD-DS) endojen süksinat asit tarafı ndan oksidasyonu sı rası nda MC enerji üretiminin katkı sı nı bulmak için hidrogenaz (SDH) inhibitö rü malonat (2 · 10–3 M) ve aminotransferaz inhibitö rü aminooksiasetat (5 · 10–4 M) kullanı ldı . (ESA). Solunum stimülasyonu (RS = V3 /V4p), solunum kontrolü (RC = V3 /V4o) ve oksidatif fosforilasyon bağı lantı sı (ADP/O) katsayı ları hesaplandı .

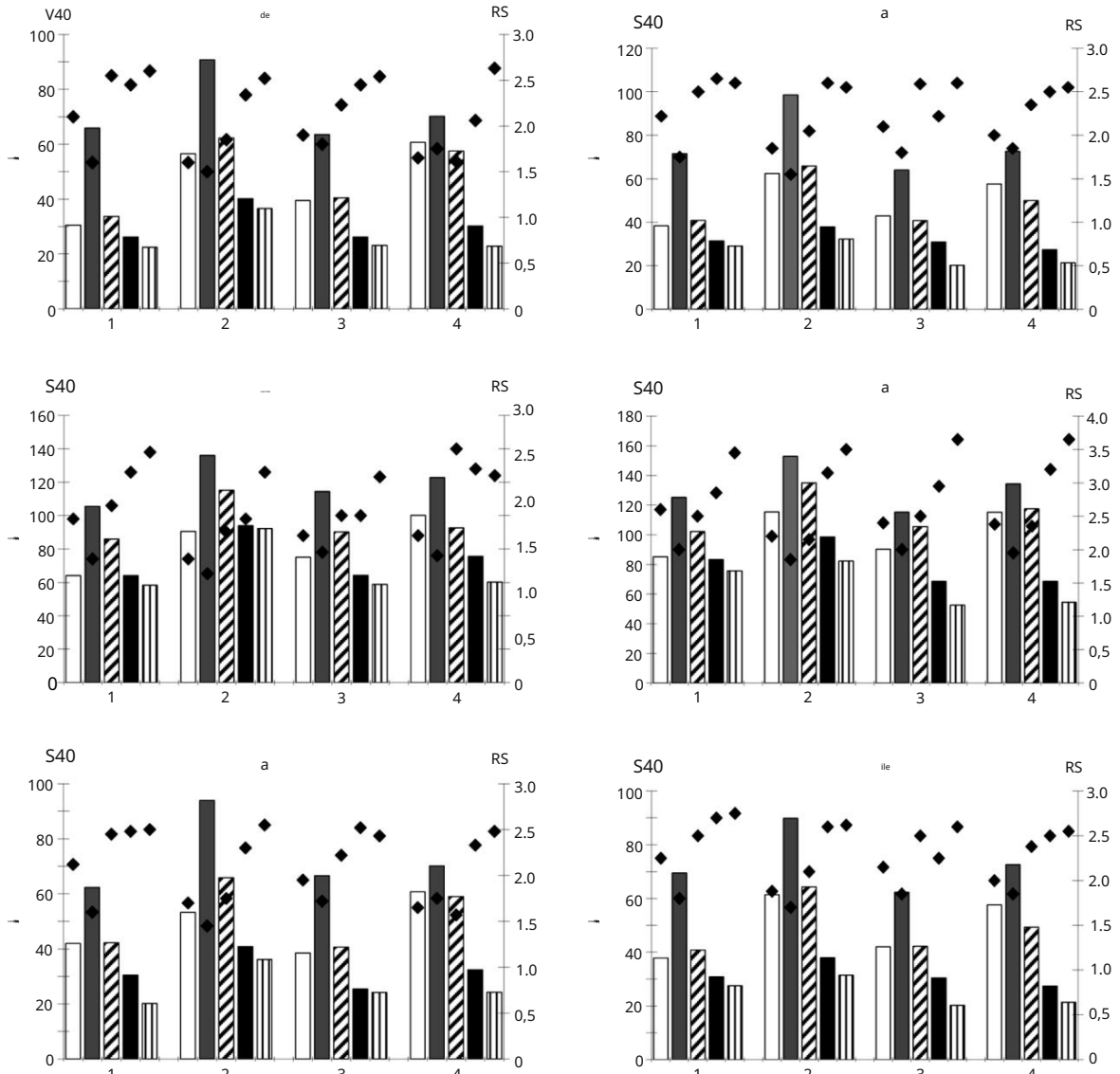
Farklı lı kları n istatistiksel önemi, %5 anlamlı lı k düzeyinde (p < 0.05) Wilcoxon-Mann-Whitney kriteri kullanı larak tahmin edildi.

SONUÇ LAR VE TARTIŞ MA

Deneyel koşulları mız altı ndaki hipoksi, endojen substratları n oksidasyonu sı rası nda farelerde serebral ve hepatik MC tarafı ndan oksijen absorpsiyon oranı nı arttı rdı ve oksidatif fosforilasyonun etkinliğ ini azalttı (düş ük RS, RC ve ADP/O) (Ş ekil 1a). Benzer bir eğ ilim, serebral ve hepatik MC tarafı ndan eksojen substratları n, yani süksinat ve NAD-DS'nin kullanı mı sı rası nda da göz lemlendi. NAD-DS'nin onlar tarafı ndan oksidasyonu sı rası nda organel solunumunun metabolik kontrolü azalmı ş tı r. Fosforilasyona (V3) kı yasla kontrollü substrat oksidasyonunun (V4p ve V4o) önemli ölç üde artan oranları ve oksidatif fosforilasyon etkinliğ inin, yani ADP/O katsayı sı nı n önemli ölç üde azalması bunun göstergesiydi. Bu değ iş iklik grubu, hipoksi etkisi altı ndaki farelerde serebral ve hepatik MC'deki oksidatif fosforilasyonun bağı lantı sı nı n kesildiğ ini gösterebilir.

İ nhibitör analizi, miyokardiyumdaki NAD-DS'nin SDH bloker malonata ve aminotransferazları n aminooksiasetata oksidasyonu sı rası nda serebral MC solunumunun duyarlı lı ğ ı nı n, seç ilen hipoksi modeli için azaldı ğ ı nı gösterdi (Ş ekil 1b). Bu, ESA oluşumu ve oksidasyonunun geliş en inhibisyonunu yansı tmaktadı r [22, 23]. Fare serebral MC'nin aksine, NAD-DS oksidasyonu sı rası ndaki hepatik MC, inhibitör malonattaki SDH'ye artan duyarlı lı k ile karakterize edildi. Bu, ESA'nı n esas olarak onlar tarafı ndan oksitlendiğ ini gösterdi. Bu sonuç lar, serebral hücrelere kı yasla hepatik hücrelerin oksijen eksikliğ ine duyarlı lı ğ ı nı n azalması na ilişkin literatürle iyi bir uyum içindedir [24].

PHA alan fare grubunda 16.5 dakika boyunca hipoksiye maruz kaldı ktan sonra agonal solunum ve jeneralize konvülsiyon belirtileri gör ülmedi. HA'lar, tüm metabolik durumlarda serebral ve hepatik MC tarafı ndan endojen substratları n (V4p, V3 , V4o) kullanı m oranları nı azaltmaya yardımcı olurken, oksidatif fosforilasyonun bağı lantı sı nı arttı rdı rken (artan ADP/O katsayı sı) (Ş ekil 1b ve 1e) . Hipoksik hayvanları n serebral ve hepatik MC'lerinde PHA'ları n etkisiyle tüm substrat tiplerinin oksidasyon etkinliğ i (tüm metabolik durumlarda azalan MC solunum oranları) ve oksidatif fosforilasyon (artan katsayı lar RS ve RC). Metabolik solunum kontrolü sağ landı . NAD-DS'nin hepatik MC tarafı ndan oksidasyonu sı rası nda PHA'ları n RS ve RC katsayı ları nı arttı rması dikkat çekicidir.



Şekil 1. Turba hüyük asitleri ve dihidroquercetin'in, hiperkapnili normobarik hipoksi ile fare serebral (a, b, c) ve hepatik (d, e, f) mito kondrinin oksidatif fosforilasyonu üzerindeki etkileri. Not: a) Apsis boyunca gruplar: kontrol (1), hipoksi (2), hipoksi + HC (3), hipoksi + DHQ (4). Beyaz çubuklar, endojen substratların oksidasyonu ile çalışılan göstergelerin değeri; koyu çubuklar, süksinat; taramış çubuklar, malat-glutamat karışımı; siyah çubuklar, malat, glutamat ve malonat; dikey çizgili çubuklar, malat, glutamat ve aminooksiasetat. b) Ordinat boyunca, karolar sağ ölçekteki değeri gösterir (RS, RC, ADP/O); çubuklar, sol skaladaki değerler (ng-atom O₂/dk mg protein). c) PHA'ların DHQ ve kontrolden yalnızca istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları verilmiştir.

ve ayrıca kontrollü oksidasyon V4o ve V4p oranlarını önemli ölçüde azaltması na yardımcı oldu. Bu, organel solunum aktivite aralığını genişletti (V3 - V4). PHA'ları alan hayvanların MC'sindeki ADP/O katsayıları, tedavi edilmemiş hayvanların aynı parametresine kıyasla tüm substrat tiplerinin oksidasyonu sırasında normalleşti (Şekil 1b ve 1e). Bu, hipoksi sırasında oksidatif fosforilasyonun bağlantısını kesilmesine dair işaretlerin, PHA'ları etkisiyle kaybolduğunu gösterdi.

NAD'ye bağlı oksidasyonun inhibitör analizi, önceden PHA'lar ile tedavi edilmiş farelerin serebral MC'sinde ESA oluşumunun ve oksidasyonun arttığını göstermiştir (Şekil 1b).

[25]. Özünde bu, PHA'ları bu koşullar altındaki koruyucu etkisini yansıttıyordu. Farelerin hepatik MC'sindeki HA'lar, yüksek düzeyde ESA oksidasyonu ve oluşumu ve dirençli bir enerji üretim durumu sürdürdü.

PHA'ları aksine, önceden DHQ ile tedavi edilen fare grubundaki hayvanların %16,7'sinde 16,5 dakikalık hipokside sonra konvülsiyonlar gözlemlendi. DHQ, ekzojen substratların fare serebral MC'si tarafından oksidasyon sırasında ADP/O katsayısını artırmasına yardımcı oldu. DHQ, ekzojen substratların (süksinat veya malat ve glutamat karışımı) fare serebral MC'si tarafından oksidasyon sırasında MC fosforile edici solunum oranını artırmasını ve ko

ilaç tarafı ndan korunmayan hipoksik hayvanlarda düşmeye karşı azaltılmış verimli RS, RC ve ADP/O (Şekil 1, ac). Bu, DHQ alan hayvanları n serebral MC'lerinde oksidatif fosforilasyonun etkinliğinin arttığı nı gösterdi.

Malonat kullanılarak NAD'ye bağlı solunumun inhibitör analizi, hipoksik hayvanları n (V4p ve V4o) serebral MC tarafı ndan kontrollü solunum oranları nı azalttığı nı , buna karşılıklı k ADP/O katsayısı nı n arttığı nı buldu (Şekil 1, a-c). İnhibitör aminooksiasetat kullanımı , hepatik MC'nin tüm metabolik durumlardaki solunum aktivitesinin azaldığı nı , buna karşılıklı n RS ve RC katsayıları nı n değışmediğini gösterdi (Şekil 1, d-f). Bu nedenle DHQ, bu patolojiye en duyarlı olan MC'de hipoksi sı rası nda substratları n NAD'ye bağlı oksidasyon döngüsünün bozulması nı önledi [26].

Hipoksik hayvanları n hepatik MC'sindeki oksidatif fosforilasyon etkinliği, endojen substratları n onlar tarafı ndan oksidasyonu sı rası nda DHQ'nun etkisiyle artmıştı r. Süksinat oksidasyonu sı rası nda DHQ, ADP fosforilasyon döngüsünden önce, sı rası nda ve sonrası nda hepatik MC solunum hızları ndaki artışları ve oksidatif fosforilasyonun bağlantısı nı kesilmesini (RS, RC ve ADP/O artışları) önledi. Tüm metabolik durumlardaki solunum hızları , DHQ verilen hipoksik farelerin hepatik MC tarafı ndan malat ve glutamat karışımı nı n oksidasyonu sı rası nda azaldı . Artan RS, RC ve ADP/O katsayıları da oksidatif fosforilasyon bağlantısı nı n arttığı nı ve organel yapıları nı n korunduğunu öne sürdü [27]. DHQ alan farelerin hepatik MC'si tarafı ndan NAD'ye bağlı solunumun inhibitör analizi, organellerin aminooksiasetata duyarlı lığı nı n önemli ölçüde arttığı nı ortaya koydu (Şekil 1e). Bu, hipoksi sı rası nda hücrede hızlı ATP oluşum mekanizmaları nı n, yani ESA üretiminin, ilacı n etkisi altında devam ettiğini göstermiştir [25, 27].

Ayrıca, DHQ tarafı ndan korunan fare grubunda endojen ve NAD-DS kullanımı sı rası nda hepatik MC solunum oranları , PHA'lar tarafı ndan korunan hipoksik hayvanlarda gözlemlenenenden daha yüksekti (Şekil 1). Bu, seçilen hipoksi modeli için karaciğ erde nispeten daha düşük DHQ antihipoksik aktiviteye işaret edebilir.

Böylece PHA'lar, hiperkapni modeli normobarik hipoksi için fare beyininde ve karaciğ erinde süksinat ve NAD'ye bağlı enerji üretim süreçlerinin aktivitelerini normalleştirdi. Oksidatif fosforilasyonun kesilmesini engellediler. PHA'ları n antihipoksik aktivitesi, beyindeki referans DHQ'nunla karşı laştı rılabilir ve karaciğ erde onu aştı . PHA'ları n etkisiyle gözlenen serebral ve hepatik MC'de oksidatif fosforilasyonun normalleşmesi, muhtemelen hipoksik koşullar altında hücre ve organellerin serbest radikal hasarı nı önleyen koruyucu özellikleriyle ilişkilidir.

REFERANSLAR

1. Yu. A. Zozulya, VA Baraboi ve DV Sutkova, Beyin Patolojisi ile Serbest Radikal Oksidasyon ve Antioksidan Koruma [Rusça], Znanie, Moskova (2000).
2. GV Naumova, VP Strigutskii, NA Zhmakova ve diğ erleri, Khim. Tverd. Topl., Hayı r. 2, 3 – 13 (2001).
3. N.V. Yudina, S.I. Pisareva ve A.S. Saratikov, Khim. Tverd. Topl., No. 5, 31 – 34 (1996).
4. VI Saldan, içinde: 12. Uluslararası Turba Kongresi Özetleri , Tampere, Finlandiya (2004), s. 1205 – 1208.
5. VP Solovieva, HP Sotnikova ve TD Lotosh, içinde: 10. Uluslararası Turba Kongresi Özetleri , Almanya (1996), s. 137 – 140.
6. NG Vyazova, VN Kryukova ve VP Latyshev, Khim. Tverd. Topl., Hayı r. 6, 47 – 50 (1999).
7. N.I. Gamayunov, B.I. Maslennikov ve Yu. A. Shul'man, Pochvovedenie, Hayı r. 1, 113 – 116 (1992).
8. A. G. Zavarzina ve V. V. Demin, Pochvovedenie, no. 10, 1246 – 1254 (1999).
9. AI Popov, Hümik Maddeler: Özellikler, Yapı , Oluşum [Rusça], 1. zd. Petersburg Üniv., St. Petersburg (2004).
10. VM Bogolyubov ve GN Ponomarenko, General Physio Therapy [Rusça], SLP, Moskova, St. Petersburg (1996), s. 433 – 437.
11. ES Kashitskii, VM Kozin, VS Ulashchik ve diğ ., Izv. Belarus. İ nj. Akad., Hayı r. 2 (8), 53–56 (1999).
12. VM Kozin, VM Semenov ve DS Yanushevskii, Vestn. Bilim Allah Allah. İ le. Univ., 4(4), 93 – 96 (2005).
13. M. Kuhnert, V. Fuchs ve S. Golbs, içinde: Uluslararası Sempozyum Tutanakları , DTÖKomisyonları 4 ve 2 [Rusça], Minsk (1982), s. 232 – 243.
14. Rusya Uyuşturucu Sicili: Uyuşturucu Ansiklopedisi [Rusça], RLS, Moskova (2004).
15. MB Plotnikov, SV Loginov, NV Pugachenko ve diğ erleri, Byull. Eski. Biol. Med., Hayı r. 10, 542–547 (2000).
16. MB Plotnikov, OI Aliev ve AV Yamkin, Tromboz, Hemostaz Reoloji, No. 2, 30–32 (2001).
17. MV Zykova, MV Belousov, AM Gur'ev, et al., Khim.-farm. Zh., 47(12), 53 – 56 (2013); eczane kimya J., 47(12), 675–678 (2013).
18. NN Danchenko, IV Perminova, AV Garmash ve diğ ., Vestn. Moskova Üniv., Ser. 2: Khim., 39(2), 127–131 (1998).
19. RU Khabriev, Handbook of Experimental (Preclinical) Study of New Drugs [Rusça], Meditsina, Moskova (2005).
20. RV Gurto, Yazarı n Aday Tez Özeti Tıp Bilimleri, Tomsk (2000).
21. MN Kondrashova ve AA Ananenko, Handbook of Biological Oxidation Studied by Polarography [Rusça], Moskova (1973).
22. MN Kondrashova, Biofizika, 34(3), 450–458 (1989).
23. MN Kondrashova, Biokhimiya, 56(3), 388 – 402 (1991).
24. MV Bilenko, Organları n İ skemik ve Reperfüzyon Hasarı [Rusça], Meditsina, Moskova (1989).
25. MN Kondrashova, Mitokondri [Rusça], Moskova (1973).
26. VA Khazanov ve AN Poborskii, Byull. Teyrube. Biol. Med., 112(9), 258–260 (1991).
27. RR Saifutdinov ve VA Khazanov, Uzm. Klin. Eczacı lı k, 6(5), 27 – 29 (1997).

~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~