

УДК 613.816: 612.112.94

ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ КОРТЕКСИНА В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭТАНОЛА НА МОДЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Жернова Е.В., Лосенков И.С., Вялова Н.М., Иванова С.А.*ФГБУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск, e-mail: ElenaZhernova@sibmail.com*

Проведено изучение влияния метаболитического протектора «Кортексин» на морфологические изменения и уровень белков апоптоза (антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка caspase-3) в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров, культивированных с индуктором окислительного стресса (гидропероксидом третичного бутила) и под влиянием этанола. Показано, что инкубация с гидроперексидом и этанолом приводила к нарушению баланса про- и антиапоптотических белков и увеличению доли клеток с гранулированным хроматином ядра. Выявлено, что гидропероксид третичного бутила вызывал более сильный токсический эффект, чем этанол на процессы запрограммированной клеточной гибели лимфоцитов. Исследуемый препарат оказывал выраженное антиапоптотическое действие на лимфоциты периферической крови здоровых людей защищая их от пагубного воздействия этанола и активных форм кислорода.

Ключевые слова: кортексин, индуцированный апоптоз, лимфоцит, этанол

PROTECTIVE EFFECT OF CORTEXIN IN INDUCED OXIDATIVE STRESS AND UNDER INFLUENCE OF ETHANOL ON THE MODEL OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF HEALTHY PERSONS

Zhernova E.V., Losenkov I.S., Vyalova N.M., Ivanova S.A.*Mental Health Research Institute SB RAMSci, Tomsk, e-mail: ElenaZhernova@sibmail.com*

Study of influence of metabolic protector «Cortexin» on morphologic changes and level of proteins of apoptosis (Bcl-2 and caspase-3) and peripheral blood lymphocytes cultivated with inducer of oxidative stress (tertiary butyl hydroperoxide) and under influence of ethanol has been carried out. It has been shown that incubation with hydroperoxide and ethanol led to disturbance of balance of pro- and antiapoptotic proteins and increase of part of cells with granulated chromatin of the nucleus. It has been revealed that tertiary butyl hydroperoxide has caused a stronger toxic effect than ethanol on processes of apoptosis of lymphocytes. Investigated preparation exerted substantial antiapoptotic action on lymphocytes of peripheral blood of healthy people protecting them from detrimental impact of ethanol and active forms of oxygen.

Keywords: cortexin, induced apoptosis, lymphocyte, ethanol

Систематическое употребление этанола, даже в малых дозах, является предпосылкой возникновения и прогрессирования заболеваний многих внутренних органов. Многочисленными исследованиями показаны метаболические, гормональные, нейромедиаторные и иммунные нарушения под влиянием хронической алкогольной интоксикации [1, 7, 15]. В условиях длительной алкоголизации этанол может повреждать любые органы и ткани из-за его мембранотропности и способности изменять ключевые звенья клеточного метаболизма, что приводит к повышенной гибели различных клеток [11, 12]. Кроме того, на всех этапах метаболизма этанола образуются активные формы кислорода (АФК), избыточное накопление которых может быть причиной повреждения и гибели клетки [11].

Убедительные данные о том, что хроническое поступление алкоголя в организм приводит к состоянию окислительного стресса и клеточной гибели во многих органах и системах, позволяют сделать заключение, что использование биорегулирующих средств в комплексных программах терапии

больных алкоголизмом является перспективным. Наиболее подходящими в данном направлении могут быть биорегулирующие низкомолекулярные соединения, способные понижать уровень радикалов и проникающие через гематоэнцефалический барьер. Нейрометаболический протектор кортексин относится к классу цитомединов и представляет собой комплекс L-аминокислот и полипептидов. Препарат обладает тканеспецифическим действием на кору головного мозга, оказывает ноотропное и противосудорожное действие, улучшает процессы обучения и памяти, снижает токсические эффекты нейротропных веществ, стимулирует репаративные функции и ускоряет восстановление головного мозга после стрессорных воздействий, регулирует процессы метаболизма нейромедиаторов и перекисного окисления в коре головного мозга, препятствует образованию избыточного количества свободных радикалов [6, 10]. В последние годы препарат успешно применяется в терапии аддиктивных расстройств и приводит к снижению уровня

невротизации и тревоги, улучшению клинической симптоматики пациентов, снижению уровня окислительного стресса у больных алкоголизмом [2, 4]. В то же время остаются недостаточно изучены механизмы действия препарата и его протективное влияние на клетки в условиях окислительного стресса и экспериментального воздействия этанола. Изучение запрограммированной клеточной гибели в культуре клеток несет важную биологическую информацию и является целесообразным для патогенетического обоснования применения препарата в терапии аддиктивных расстройств.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния препарата кортексин на процессы апоптоза лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, культивированных *in vitro* в условиях индуцированного окислительного стресса и под влиянием этанола.

Материалы и методы исследования

В качестве экспериментального материала использованы лимфоциты периферической крови 6 психически и соматически здоровых лиц. Отбор здоровых лиц проводили, используя углубленный опрос с помощью специальной анкеты, разработанной в лаборатории клеточных и молекулярно-биологических исследований НИИПЗ СО РАМН. Вопросы, приведенные в анкете, позволяют при формировании группы контроля исключить лица с возможными нарушениями соматического или психического здоровья. Исследование проводилось в строгом соответствии с биоэтическими нормами. Протокол исследования, информация для обследуемых лиц и форма информированного согласия были одобрены локальным этическим комитетом.

Забор венозной крови у здоровых доноров проводили утром, натощак. Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови общепринятым методом на градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция). Далее клетки культивировали с тремя тестируемыми веществами: раствором Хенкса (контроль), 140 мкМ гидроперекиси третичного бутила (моделируя ситуацию окислительного стресса) и 0,5% этанолом. Указанные концентрации исследуемых веществ были подобраны исходя из литературных данных [3, 9]. Для изучения эффекта метаболического протектора «Кортексин» (ООО «Герофарм») лимфоциты предварительно инкубировали с 20 мкл препарата в концентрациях 0,1; 1, 10 мкг/мл в течение 18 часов, а затем добавляли исследуемые индукторы.

Концентрацию белков апоптоза Bcl-2 (антиапоптотического) и caspase-3 (проапоптотического) определяли в лизате клеток методом иммуноферментного анализа с использованием наборов human Caspase-3 instant ELISA и human Bcl-2 ELISA (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) на спектрофотометрическом анализаторе Epoch (США). Морфологические изменения лимфоцитов, характерные для апоптоза, оценивали методом световой микроскопии мазков крови. Мазки фиксировали 5 мин в азур-эозине метиленовом синем по Май-Грюнвальду и окрашивали 40 мин по Романовскому-Гимза.

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета STATISTICA,

версия 6.0 для Windows. Производили расчеты средней арифметической (М), среднеквадратического отклонения (σ), ошибки средней арифметической (m). Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и Краскела-Уолиса. Различия оценивали как достоверные при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для выяснения механизмов действия препарата кортексин на процессы запрограммированной клеточной гибели важным представляется исследование концентрации про- и антиапоптотических белков, поскольку именно относительный уровень протеаз определяет судьбу клетки. Белок Bcl-2 (антиапоптотический) – один из основных регуляторов апоптоза, в случае избыточного присутствия данного белка в клетке, формируются факторы, ингибирующие апоптоз.

Уровень Bcl-2 в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров составил $12,2 \pm 0,9$ нг/мл. В культурах, подвергшихся действию окислительного стресса, индуцированного 4-часовой инкубацией с гидропероксидом третичного бутила, наблюдалось достоверное снижение уровня антиапоптотического белка ($5,5 \pm 0,8$ нг/мл). Выявленные эффекты хорошо согласуются с данными других авторов о нарушениях процессов апоптоза различных типов клеток в условиях окислительного стресса [8]. Так, Tejedo J. с соавторами [14] доказали, что при действии оксида азота на клетку значимо понижается уровень внутриклеточного Bcl-2 белка. Добавление в культуральную среду 0,5% этанола не приводило к статистически значимым изменениям содержания Bcl-2 (рис. 1).

Предварительное культивирование клеток с кортексином приводило к нормализации количества антиапоптотического белка в лимфоцитах. Согласно полученным результатам, максимальный эффект оказывала концентрация препарата 1 мкг/мл, уровень белка составил $21,4 \pm 0,8$ нг/мл ($12,2 \pm 0,9$ – в контроле) (рис. 2).

Активация каспаз является ключевым моментом в промежуточных и терминальных стадиях апоптоза. Количество caspase-3 в лимфоцитах здоровых доноров составило $3,8 \pm 1,1$ мкг/мл. Инкубация клеток с гидроперекисью приводила к увеличению уровня проапоптотического белка ($4,8 \pm 1,7$ мкг/мл). Выявленные нами данные свидетельствуют о том, что в условиях окислительного стресса наблюдается индукция апоптоза лимфоцитов, что выражается в значительном увеличении уровня проапоптотического белка caspase-3. Инкубация клеток с этанолом не вызывала изменений концентрации caspase-3 ($3,6 \pm 0,5$ мкг/мл, в контроле – $3,8 \pm 1,1$ нг/мл) (табл. 1).

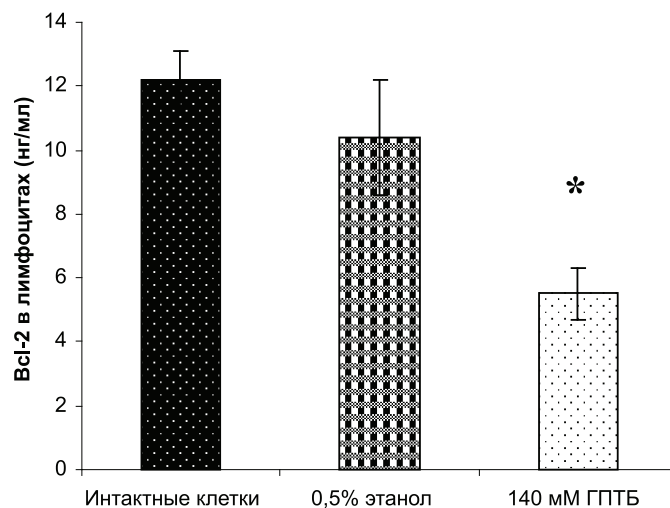


Рис. 1. Уровень Bcl-2 в лимфоцитах при инкубации с ГПТБ и 0,5% этанолом.
Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

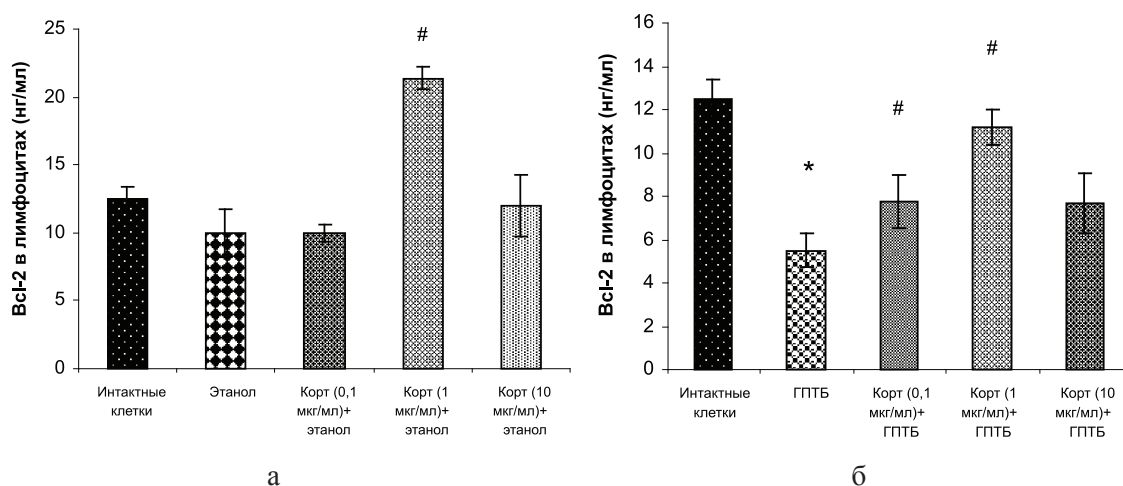


Рис. 2. Влияние кортексина на уровень Bcl-2 в лимфоцитах периферической крови человека под действием этанола (а), в условиях окислительного стресса (б).

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем;
– $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без протектора

Таблица 1

Эффекты кортексина на уровень caspase-3 в лимфоцитах здоровых лиц

	Интakтные клетки	Интakтные клетки + 140 мкМ ГПТБ	Интakтные клетки + 0,5%-й этанол
Уровень caspase-3 (мкг/мл)	3,8 ± 0,6	6,3 ± 0,2*	3,9 ± 0,5
Уровень caspase-3 при инкубации с кортексином (0,1 мкг/мл)	1,7 ± 0,5*	3,8 ± 1,1	2,7 ± 0,9
Уровень caspase-3 при инкубации с кортексином (1 мкг/мл)	2,3 ± 0,4	1,9 ± 0,5#	2,3 ± 0,7
Уровень caspase-3 при инкубации с кортексином (10 мкг/мл)	1,9 ± 0,4*	1,6 ± 0,2*#	2,8 ± 0,1

Примечание:

* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем;

– $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без кортексина.

Все три концентрации кортексина оказывали протекторный эффект в отношении клеточной гибели лимфоцитов: уровень caspase-3 значительно снижается при добавлении в культуральную среду препарата по сравнению с интактными клетками.

Цитологический анализ мазков крови показал, что инкубация образцов с гидроперекисью третичного бутила приводила

к снижению жизнестойкости мононуклеаров, наблюдалась тенденция к увеличению количества апоптотических клеток в популяции лимфоцитов по сравнению с контролем ($8,2 \pm 2,2$ и $6,8 \pm 0,6\%$ соответственно). Число лимфоцитов, подвергшихся апоптозу под действием 0,5%-го этанола, составило $7,8 \pm 2,1$, что соответствует показателю в контрольной группе (табл. 2).

Таблица 2

Доля лимфоцитов с фрагментированным ядром, %, при культивировании *in vitro*

	Интактные клетки	Интактные клетки + 140 мкМ ГПТБ	Интактные клетки + 0,5% этанол
Без инкубации	$6,8 \pm 0,6$	$8,2 \pm 2,2$	$7,8 \pm 2,1$
Инкубация с кортексином (0,1 мкг/мл)	$1,5 \pm 0,8^*$	$2,4 \pm 1,1^*$	$3,7 \pm 1,2$
Инкубация с кортексином (1 мкг/мл)	$5,9 \pm 1,5$	$1,6 \pm 0,8^{##}$	$5,5 \pm 1,6$
Инкубация с кортексином (10 мкг/мл)	$1,9 \pm 0,8^*$	$3,5 \pm 0,7^*$	$2,7 \pm 1,2^*$

Примечания:

* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем;

– $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без кортексина.

При долгосрочной прединкубации иммунокомпетентных клеток с кортексином (в 3 концентрациях) доля клеток с гранулированным хроматином ядра уменьшалась по сравнению с контрольным значением, что показывает антиапоптотическое действие исследуемого препарата. Максимальный эффект наблюдался при добавлении кортексина в концентрации 0,1 мкг/мл ($1,5 \pm 0,8\%$, в контроле – $6,8 \pm 0,6\%$, $p < 0,05$) и добавлении кортексина в концентрации 10 мкг/мл ($1,9 \pm 0,8\%$, в контроле $6,8 \pm 0,6$, $p < 0,05$), в то же время концентрация 1 мкг/мл оказывает протективный эффект в условиях окислительного стресса, не влияя на интактные клетки и клетки, инкубированные с этанолом (см. табл. 2).

Заключение

В результате проведенного исследования было показано токсическое влияние гидропероксида третичного бутила на процессы апоптоза лимфоцитов, в то время как инкубация клеток с этанолом не приводила к статистически значимым изменениям исследуемых параметров. Полученный результат подтверждает гипотезу о том, что в организме в условиях хронической алкоголизации на клетки может оказывать негативное действие не столько сам этанол, а продукты его метаболизма, в частности активные формы кислорода.

Кортексин снижает интенсивность свободнорадикального окисления, проявляет антиоксидантное действие, обладает нейрпротекторным и антиапоптотическим действием, воздействует на все этапы патологической цепи молекулярных событий,

приводящих к гибели нейронов. Установлено, что кортексин снижает уровень апоптоза нейронов, вызванного избыточным накоплением глутамата в синаптической щели [13]. Микроэлементы (цинк, марганец, селен, медь и др.), содержащиеся в препарате, участвуют в поддержании активности более 1000 внутриклеточных белков и ферментов, регулирующих процессы клеточной динамики и апоптоза. В последние годы показано наличие у кортексина множественных эффектов, затрагивающих каскадную регуляцию апоптоза, экспрессию нейротрофических факторов, энергетическое обеспечение нервной клетки и митохондриальный потенциал, функционирование рецепторов глутамата и регулирование концентрации кальция в клетке, что выражается в нейрпротекторном и нейротрофическом действии препарата [5]. Представленные выше собственные экспериментальные данные согласуются с литературными и свидетельствуют о том, что кортексин *in vitro* оказывает выраженный антиапоптотический эффект на лимфоциты периферической крови здоровых людей, защищая их от пагубного воздействия активных форм кислорода и этанола. Возможным механизмом реализации протекторного эффекта исследуемого препарата в отношении процессов апоптоза лимфоцитов является восстановление нарушенного баланса про- и антиапоптотических белков.

Список литературы

1. Анохина И.П., Иванец Н.Н., Дробышева В.Я. Основные достижения в области наркологии, токсикомании, алкоголизма // Вестник РАМН – 1998. – Т.7. – С. 29–37.

2. Бокхан Н.А., Иванова С.А. Окислительный стресс при алкоголизме: возможности метаболической коррекции на этапе формирования ремиссии // Наркология. – 2010. – №10. – С. 46–49.
3. Бокхан Н.А., Прокопьева В.Д. Молекулярные механизмы влияния этанола и его метаболитов на эритроциты in vitro и in vivo. – Томск, 2004. – 166 с.
4. Кортесин в комплексном лечении постабстинентного синдрома у больных алкоголизмом / В.В. Востриков, Н.В. Бушкова, В.П. Павленко, П.Д. Шабанов // Наркология – 2005. – №12. – С. 40–43.
5. Кортесин (нейропротекция на молекулярном уровне) / О.К. Гранстрем, Е.Г. Сорокина, М.А. Салыкина, Т.П. Сторозевых, А.М. Сурин, Г.В. Штучная, В.П. Реутов, Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Пинелис В.Г., М.М. Дьяконов // Нейроиммунология. – 2010. – Т. VIII, № 1–2. – С. 34–40.
6. Дьяконов М.М., Шабанов П.Д. К вопросу о нейропротекторном действии пептидных препаратов // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2011. – №1 (33). – С. 255–258.
7. Иванова С.А., Ветлугина Т.П., Бокхан Н.А., Эпштейн О.И. Иммунология аддитивных расстройств: механизмы психоиммунотрансдукции // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2002. – № 1. – С. 52.
8. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 8. – С. 995–1017.
9. Смирнова Л.П. Роль антиоксидантных ферментов в регуляции пролиферации опухолевых клеток: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2003 – 22 с.
10. Пептидные биорегуляторы и их применение: от неонатологии до геронтологии / В.М. Студеникин, Л.А. Пак, С.Ш. Турсунхужаева, В.И. Шелковский, С.В. Балканская // Лечащий врач: Клиническая фармакология. – 2010 – №6. – С. 72–75.
11. Chu J., Tong M., S. M. de la Monte Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons // Acta Neuropathol. – 2007. – № 113. – P. 659–673.
12. Ivanova S.A., Vyalova N.M., Zhernova E.V., Bokhan N.A. Spontaneous and in vitro induced apoptosis of lymphocytes and neutrophils in patients with alcohol dependence // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2010. – T. 149, № 2. – С. 246–249.
13. Neuroprotective effects of cortagen, cortixin and semax on glutamate neurotoxicity / V.G. Pinelis, T.P. Storozhevyykh, A.M. Surin, Ya.E. Senilova, N.F. Persiyantzeva, G.R. Tukhmatova, L.A. Andreeva, N.F. Myasoedov, O. Granstrom // J. Peptide Science. – 2008. – №14 (8). – P. 159–160.
14. Tejedo J, Bernabé J.C, Ramírez R, Sobrino F, Bedoya F.J. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells // FEBS Letters. – 1999. – Vol. 459. – P. 238–243.
15. Ward R.J., Lallemand F., Ph. de Witte Biochemical and Neurotransmitter Changes Implicated in Alcohol-Induced Brain Damage in Chronic or 'Binge Drinking' Alcohol Abuse // Alcohol & Alcoholism. – 2009. – Vol. 44. – №2. – P. 128–135.
3. Bokhan N.A., Prokop'eva V.D. Molekuljarnye mehanizmy vlijaniya jetanola i ego metabolitov na jetirocity in vitro in vivo, Tomsk, 2004, 166 p.
4. Vostrikov V.V., Bushkova N.V., Pavlenko V.P., Shabanov P.D. Korteksin v kompleksnom lechenii postabstinentnogo sindroma u bol'nyh alkogolizmom, Narkologija, 2005, no. 12, pp. 40–43.
5. Granstrom O.K., Sorokina E.G., Salykina M.A. Storozhevyyh T.P., Surin A.M., G.V. Shtuchnaja G.V., Reutov V.P., Krushinskij A.L., Kuzenkov V.S., Pinelis V.G., D'jakonov M.M. Korteksin (nejroprotekcija na molekuljarnom urovne), Nejroimmunologija, T. VIII, no. 1–2, 2010, pp. 34–40.
6. D'jakonov M.M., Shabanov P.D. K voprosu o nejroprotektornom dejstvii peptidnyh preparatov, Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii, 2011, no. 1 (33), pp. 255–258.
7. Ivanova S.A., Vetlugina T.P., Bokhan N.A., Jepshtejn O.I. Immunobiologija addiktivnyh rasstrojstv: mehanizmy psihonejroimmunomoduljacji // Sibirskij vestnik psixiatrii i narkologii, 2002, no. 1, p. 52.
8. Luwak V.I. Svobodnoradikal'noe okislenie belkov i ego svjaz' s funkcional'nym sostojaniem organizma, Biohimija, 2007, T. 72, no. 8, pp. 995–1017.
9. Smirnova L.P. Rol' antioksidantnyh fermentov v reguljacji proliferacii opuholevyh kletok: Avtoref. dis. kand. med. Nauk, Tomsk, 2003, 22 p.
10. Studenikin V.M., Pak L.A., Tursunhuzhaeva S.Sh., Shelkovskij V.I., Balkanskaja S.V. Peptidnye bioregulyatory i ih primenenie: ot neonatalogii do gerontologii // Lechavij vrach: Klinicheskaja farmakologija, 2010, no. 6, pp. 72–75.
11. Chu J., Tong M., S.M. de la Monte Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons, Acta Neuropathol, 2007, 113, pp. 659–673.
12. Ivanova S.A., Vyalova N.M., Zhernova E.V., Bokhan N.A. Spontaneous and in vitro induced apoptosis of lymphocytes and neutrophils in patients with alcohol dependence, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2010, T. 149, no. 2, pp. 246–249.
13. Pinelis V.G., Storozhevyykh T.P., Surin A.M., Senilova Ya.E., Persiyantzeva N.F., Tukhmatova G.R., Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Granstrom O. Neuroprotective effects of cortagen, cortixin and semax on glutamate neurotoxicity, J. Peptide Science 2008, no. 14(8), pp. 159–160.
14. Tejedo J., Bernabé J.C., Ramírez R., Sobrino F., Bedoya F.J. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells, FEBS Letters, 1999, Vol. 459, pp. 238–243.
15. Ward R.J., Lallemand F., Ph. de Witte Biochemical and Neurotransmitter Changes Implicated in Alcohol-Induced Brain Damage in Chronic or 'Binge Drinking' Alcohol Abuse, Alcohol & Alcoholism, 2009, Vol. 44, no. 2, pp. 128–135.

References

1. Anohina I.P., Ivanec N.N., Drobysheva V.Ja. Osnovnye dostizhenija v oblasti narkologii, toksikomani, alkogolizma, Vestnik RAMN, 1998, T.7, pp. 29–37.
2. Bokhan N.A., Ivanova S.A. Okislitel'nyj stress pri alkogolizme: vozmozhnosti metabolicheskij korrekcii na jetape formirovaniya remissii, Narkologija, 2010, no. 10, pp. 46–49.

Рецензенты:

Чурин А.А., д.м.н., руководитель отдела лекарственной токсикологии ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН, г. Томск;
Невидимова Т.И., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Томск.
Работа поступила в редакцию 30.05.2012.