

Алисултанова Надежда Жафаровна

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3,4-ТИАДИАЗИНА НА АКТИВНОСТЬ
СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Сыктывкар 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор

Бойко Евгений Рафаилович

Официальные
оппоненты:

Сарапульцев Петр Алексеевич

доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, лаборатория иммунопатофизиологии, главный научный сотрудник.

Коротков Сергей Михайлович

кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, лаборатория функциональной биохимии мышц, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук (г. Петрозаводск)

Защита диссертации состоится “28” сентября 2016 г. в 10-00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.017.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 167982, Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50, nivarlam@physiol.komisc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук: Сыктывкар, ул. Первомайская, 50, <http://www.physiol.ru>.

Автореферат разослан “_____” 2016г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Варламова Нина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Познание механизмов адаптации человека, попадающего в особые или экстремальные условия, а также разработка методов, позволяющих повысить устойчивость организма к пребыванию в таких условиях, является фундаментальной медико-биологической проблемой. При техногенных авариях и природных катастрофах человек часто оказывается в замкнутых помещениях в условиях недостаточного содержания кислорода (подводные лодки и аппараты, авиакосмические объекты, шахты, подземные сооружения) (Castellani et al., 2005; Farías, 2013; West, 2013; Wolf, 2014). Выживание организма в таких условиях во многом ограничено плохой переносимостью гипоксии головным мозгом. Известно, что в отсутствие кислорода резерв времени для сохранения полноценной мозговой деятельности не превышает 5-10 минут (Hochachka et al., 1994). Решение проблемы выживания в таких условиях возможно путем искусственного снижения потребления кислорода некритическими органами и системами (например, мышечной системой), а также относительного снижения чувствительности мозга к гипоксии. Для этого традиционно используют общее охлаждение организма, а также применение антигипоксических препаратов, улучшающих утилизацию кислорода органами и тканями (Чернилевский, 2008). Однако, в условиях нехватки кислорода в закрытых помещениях ни охлаждение, требующее сложного технического обеспечения, ни средства, повышающие утилизацию кислорода, не могут быть использованы. В таком случае важное практическое значение могут приобрести соединения, вызывающие гипометаболический эффект, что способствует сохранению функциональных резервов организма в условиях недостатка кислорода и повышению устойчивости к гипоксии.

Существуют сведения об особенностях и механизмах формирования таких гипометаболических состояний как гибернация (Staples, 2014), эстивация (Storey, Storey, 2012) анаэробноз (Brooks, Storey, 1997), ангидробноз (Erkut, 2012), которые широко распространены у животных для выживания в неблагоприятных условиях среды. При этом наблюдается снижение скорости метаболизма до 20-30%, или даже до 1-10% от нормы, что может продолжаться от нескольких дней до нескольких месяцев (Чернилевский, 2008; Daniels et al., 2010; Storey, Storey, 2007; Storey, Storey, 2012). Однако, есть мнение, что млекопитающие, не впадающие в спячку, включая человека, не могут формировать состояния, подобные гипобнозу, поскольку он сопровождается глубокой гипотермией, которая приводит к фибрилляции желудочков и остановке сердца (Чернилевский, 2008). Вместе с тем, ряд научных работ свидетельствуют о возможности формирования у мышей гипометаболических состояний, например, с помощью

метаболита 5'-аденозинмонофосфата (Daniels et al., 2010) или субтоксических концентраций газообразного сероводорода (Bos et al., 2009). При этом наблюдается снижение частоты сердечных сокращений, температуры тела практически до температуры окружающего воздуха, снижение образования CO_2 на 60% и потребления O_2 на 90 %. Кроме того, существует гипотеза о возможности формирования у человека гипоксического гипометаболизма, как в результате снижения образования макроэргических соединений, вследствие нарастающего дефицита кислорода в клетках, так и по причине снижения энергетического запроса в ответ на энергетическую недостаточность любой этиологии, что проявляется снижением интенсивности метаболизма (Гришин, 2011).

Несмотря на то, что в настоящее время существуют несколько методов получения искусственного гипобиоза, следует отметить, что у многих видов лабораторных животных гипобиоз достигается на ограниченное время с помощью трудоемкого комбинированного воздействия фармакологических средств (резерпин, орнид), газовых сред с повышенным содержанием CO_2 , голода и снижения температуры тела, и зачастую является неэффективным (Чернилевский, 2008). В связи с этим поиск безопасных химических соединений, способных с меньшими трудностями формировать гипометаболические состояния у млекопитающих, остается актуальным.

В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург) синтезированы производные 1,3,4-тиадиазина, и в лабораторных экспериментах на мелких теплокровных животных (мыши, крысы) показано, что тиадиазины проявляют общий гипометаболический эффект, сопровождающийся снижением потребления кислорода. Кроме того, из данных литературы известно, что соединения, принадлежащие к классу тиадиазинов, обладают широким спектром фармакологической активности (Логвинова и др., 2010; Almajan et al., 2010; Shehry et al., 2010). Например, среди производных 1,3,4-тиадиазина существуют соединения, обладающие миорелаксирующей, антиспазмолитической активностью (Novikova et al., 1992), гиполипидемическим и гипергликемическим эффектами (Бойко и др., 2009), вещества, снижающие агрегацию тромбоцитов (Campillo et al., 2000) и благотворно влияющие на течение системного воспаления при остром инфаркте миокарда (Sarapultsev P. et al., 2012) и остром панкреатите (Sarapultsev A. et al., 2012), производные с антибактериальными, противовирусными (Yang et al., 2011), противогрибковыми и антиоксидантными (Ѓаћић et al., 2014) эффектами. Однако, несмотря на разнообразие биологической активности тиадиазиновых соединений механизм их действия на клеточном уровне остается мало изученным.

Среди обсуждаемых клеточных механизмов развития гипометаболизма выделяют снижение митохондриальных процессов энергообразования, поскольку в покое именно в митохондриях генерируется до 2/3 необходимой энергии в виде макроэргических соединений, и используется до 90% поступающего в организм кислорода (Титов, 2012; Osellame et al., 2012; Smith et al., 2012). Центральным звеном энергетического метаболизма клетки выступают ферментные системы электрон транспортной цепи и цикла Кребса митохондрий. Одним из таких ферментов является сукцинатдегидрогеназа (СДГ; КФ 1.3.99.1), которая относится к классу оксидоредуктаз и локализуется на внутренней мембране митохондрий. СДГ является единственным митохондриальным ферментом, который участвует, как в реакциях цикла Кребса, где он катализирует окисление сукцината до фумарата, так и в переносе электронов в составе комплекса II дыхательной цепи митохондрий (Saraste, 1999; Ackrell, 2000; Cecchini, 2003; Rutter et al., 2010; Iverson, 2013). Поэтому, регулируя ее активность можно корректировать характер протекания метаболических процессов в клетке с целью приспособления организма к условиям окружающей среды.

В соответствии с выше изложенным, особый интерес представляет поиск оптимального соединения, способного оказывать гипометаболический эффект на организм, возможно, в результате действия на активность митохондриальных ферментов, в частности, на активность ферментов цикла Кребса, для сохранения жизненно важных функций организма в экстремальных условиях существования, таких как гипоксия. Поэтому тестирование новых производных 1,3,4-тиадиазина на их способность изменять активность митохондриальной сукцинатдегидрогеназы млекопитающих является актуальным.

Цель исследования. Изучить влияние производных 1,3,4-тиадиазина на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени млекопитающих в условиях *in vitro*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить активность сукцинатдегидрогеназы в суспензии нативных митохондрий печени млекопитающих.
2. Определить активность сукцинатдегидрогеназы в суспензии митохондрий, инкубированных с растворами производных 1,3,4-тиадиазина.
3. Оценить степень физиологического воздействия производных 1,3,4-тиадиазина на сукцинатдегидрогеназу митохондрий печени млекопитающих в зависимости от химической структуры этих соединений.

Научная новизна исследования. Впервые выявили способность производных 1,3,4-тиадиазина ингибировать активность СДГ митохондрий печени млекопитающих в условиях *in vitro*. В результате скрининга тиadiaзиновых соединений обнаружили вещества с минимальным и максимальным ингибирующим эффектом на активность фермента. Установили характер влияния структуры тиadiaзиновых соединений на степень их воздействия на СДГ митохондрий печени экспериментальных животных. Определили возможные участки молекулы производных 1,3,4-тиадиазина, отвечающие за их физиологическую активность. Расширили данные об активности СДГ митохондрий печени млекопитающих в зависимости от возраста и вида животного.

Научно-практическая значимость исследования. Полученные результаты расширяют знания о химических соединениях, способных влиять на метаболические пути клетки, которые могут быть использованы с целью сохранения жизнеспособности организма в неблагоприятных условиях среды. Кроме того, результаты нашего исследования обеспечивают начальную базу в области разработки и тестирования фармакологических препаратов с гипометаболическим эффектом на основе новых производных 1,3,4 – тиadiaзина.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Активность сукцинатдегидрогеназы нативных митохондрий печени зависит от видовой принадлежности млекопитающих.
2. Производные 1,3,4-тиадиазина ингибируют активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени млекопитающих в условиях *in vitro*.
3. Наибольший ингибирующий эффект производных 1,3,4-тиадиазина зависит от наличия в их структуре морфолинового кольца. Характер заместителя в 5-м положении тиadiaзинового кольца влияет на степень физиологического воздействия производных 1,3,4-тиадиазина.

Апробация диссертации. Материалы исследования были представлены на молодежной научной конференции ФГБУН Института физиологии Коми научного центра УрО РАН (Сыктывкар, 2014); на Уральском научном форуме «Современные проблемы органической химии» (Екатеринбург, 2014).

Личное участие автора в получении результатов. Автором самостоятельно выполнены экспериментальные процедуры и статистическая обработка полученных данных. Материалы представленной работы обсуждались и публиковались лично, совместно с сотрудниками рабочей группы и с научным руководителем.

По материалам исследования опубликованы 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 2 работы в рамках докладов материалов конференций.

Легитимность исследования. При обращении с животными соблюдали все правила биозтики (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, изложенные в публикации – The National Institute of Health. NIH No. 85-23, в редакции 1996 г.). Протоколы экспериментов одобрены независимым локальным комитетом по этике Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (протокол № 34 от 10 мая 2016 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы результатов исследования и их обсуждения, общих выводов по работе. Список цитируемой литературы включает 40 отечественных и 172 зарубежных источников. Работа содержит 22 рисунка и 12 таблиц.

Работа выполнена в отделе экологической и медицинской физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук в период прохождения аспирантуры (2011-2014) совместно с ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет» имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» и с Институтом органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект ФНМ 12-П-4-1031) и программы ориентированных фундаментальных исследований УрО РАН (проект 12-43-003-ВМА) «Исследование механизмов действия производных тиадиазинов при регулируемом снижении потребления кислорода в организме млекопитающих».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Первая глава диссертации является обзором литературы по рассматриваемой проблеме и состоит из трех разделов с подразделами, содержащими сведения о строении, роли, особенностях функционирования сукцинатдегидрогеназы живых организмов. Последний раздел обзора литературы посвящен биологической активности производных класса 1,3,4-тиадиазина.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Объектами исследования были обоеполые крысы линии Wistar ($n=25$) в возрасте 3-12-ти месяцев, массой $264,6 \pm 84,0$ г.; беспородные кошки ($n=2$) в возрасте 0,5 и 1,5 года, массой $3635,0 \pm 459,6$ г.; кролики ($n=5$) в возрасте 6-ти месяцев; свинья ($n=1$) в возрасте 3-х месяцев и массой 19,1 кг. Перед проведением экспериментальных процедур крыс анестезировали хлороформом в течение 2-3 минут, остальным животным вводили внутримышечно золетил: кошкам - в концентрации 7,5 мг/кг массы тела, свинье - 15 мг/кг, кроликам - 25 мг/кг.

Экспериментальные процедуры

Выделение митохондриальной фракции из печени млекопитающих

Все этапы по выделению митохондрий из печени животных осуществляли на льду при температуре 0-4 °С. Митохондриальную фракцию клеток печени получали стандартным методом дифференциального центрифугирования (Jacobus, Saks, 1982). Для этого непосредственно после извлечения печень максимально быстро трижды промывали в ледяной среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозу и 0,001 М динатриевую соль этилентетрауксусной кислоты (ЭДТА- Na_2), и измельчали в чашке Петри. После трехкратного промывания к измельченной ткани добавляли около 40 мл ледяной среды выделения и гомогенизировали на гомогенизаторе Potter S (Sartorius, Germany). Полученный гомогенат центрифугировали 10 минут при 600 g и температуре 0-4°C в высокоскоростной центрифуге Avanti J-301 (Beckman Coulter, USA). Супернатант сливали в центрифужные стаканы и центрифугировали при 14000 g в течение 10-ти минут, после чего к осадку добавляли 0,5 мл ледяной среды выделения и суспендировали, затем добавляли 40 мл среды и вновь центрифугировали 10 мин при 14000 g. Полученный осадок суспендировали в 0,5-ти мл 0,25 М раствора сахарозы и центрифугировали 10 мин при 14000 g. Конечный осадок промывали три раза путем наслоения 0,3-х мл 0,25 М сахарозы, затем к нему добавляли 0,5 мл 0,25 М сахарозы и после суспендирования получали суспензию митохондрий, которую замораживали при температуре -20 °С. Концентрацию белка в полученной суспензии митохондрий определяли биуретовым методом (Gornall et al., 1949). Для определения активности СДГ суспензию митохондрий подвергали процессу трехкратного замораживания/размораживания для разрушения мембраны и высвобождения фермента.

Инкубация митохондрий печени экспериментальных животных с производными 1,3,4-тиадиазина

Производные 1,3,4-тиадиазина (L-2, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8, L-9, L-10, L-14, L-17, L-29, ТД-100) были синтезированы в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург). Растворы тиadiaзиновых соединений готовили на диметилсульфоксиде в концентрации 10 мг/мл непосредственно перед использованием. Митохондрии инкубировали с растворами тиadiaзинов в соотношении 1:1 в течение 10-ти минут.

Определение активности СДГ в митохондриях печени млекопитающих

Активность СДГ нативных митохондрий и после инкубации с производными 1,3,4-тиадиазина определяли феррецианидным методом (Singer, Kearney, 1957), принцип которого заключается в восстановлении феррицианида калия $K_3[Fe(CN)_6]$ желтой окраски до бесцветного феррицианида калия $K_4[Fe(CN)_6]$ сукцинатом под действием СДГ. Активность фермента пропорциональна количеству восстановленного феррицианида калия.

Для определения активности СДГ готовили растворы опытной и контрольной проб, содержащие 1,48 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH=7,8) и по 0,1 мл следующих реактивов: 0,1 М янтарной кислоты (pH=7,8), 25 мМ ЭДТА (pH=7,8), 150 мМ азиды натрия, дисстилизованной воды. В контрольную пробу добавляли 2 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ), которая приводит к денатурации СДГ с начала инкубации, что препятствует специфическому восстановлению феррицианида калия сукцинатом. Затем в обе пробы вносили по 20 мкл суспензии митохондрий и инкубировали в течение 5-ти минут при комнатной температуре для ингибирования цитохромоксидазы азидом натрия. Реакцию начинали добавлением 0,1 мл 25 мМ феррицианида калия, затем пробы инкубировали в течение 15-ти минут при температуре 30 °С, после чего в опытную пробу добавляли 2 мл охлажденной 20% ТХУ для остановки реакции. Растворы центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут для осаждения денатурированного митохондриального белка. Надосадочную жидкость опытной и контрольной проб фотометрировали на фотоколориметре при длине волны 440 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм против оптического контроля, которым служила смесь растворов 20% ТХУ и 0,1 М фосфатного буфера в соотношении 1:1. По разности экстинций контрольной и опытной проб ($E_k - E_{оп}$) определяли количество феррицианида калия, восстановленного за время инкубации, используя калибровочную кривую. Активность СДГ выражали в нмолях сукцината/мин на мг белка и рассчитывали по следующей формуле: $A = 1000m/2Mat$, где m – количество восстановленного феррицианида калия в

пробе, мкг; а – содержание белка в пробе, мг; М – молекулярная масса феррицианида калия, 329,4 г/моль; t – время инкубации проб с феррицианидом калия, 15 мин.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных осуществляли, используя компьютерную программу «Statistica» (версия 8.0, 2007). Значимость различий оценивали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса с последующим использованием метода Дана (Гланц, 1998). Значения активности СДГ представлены как $M \pm SD$, различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Межвидовые различия в активности СДГ нативных митохондрий печени млекопитающих.

Активность СДГ нативных митохондрий печени свиньи составила 13,1 нмоль сукцината / мин, мг белка, что является максимальным показателем активности фермента среди исследуемых видов млекопитающих. Среднее значение активности СДГ митохондрий печени крыс составило $10,07 \pm 2,47$, кошек – $5,27 \pm 0,04$ нмоль сукцината / мин, мг белка. Минимальная активность фермента была показана для митохондрий печени кролика, которая составила $3,59 \pm 1,90$ нмоль сукцината / мин, мг белка (рисунок 1).

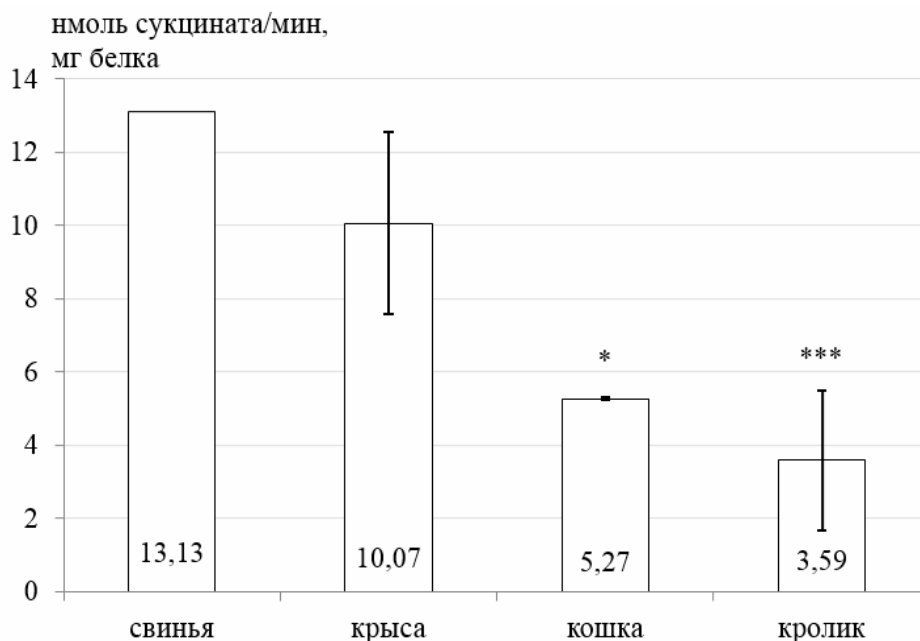


Рисунок 1. Активность нативных митохондрий печени крыс, кроликов, кошек и свиньи (различия значимы относительно крыс .при * - $p < 0,05$, *** - при $p < 0,001$)

Таким образом, показаны межвидовые различия в активности СДГ митохондрий печени млекопитающих, средние значения активности фермента которых убывают в ряду свинья>крыса>кошка>кролик.

Возрастные различия активности СДГ нативных митохондрий печени крыс.

В экспериментальную группу крыс входили животные в возрасте 3-х (n=4), 4-х (n=3), 5-ти (n=3), 6-ти (n=5) и 12-ти (n=10) месяцев. Средние значения активности СДГ нативных митохондрий печени крыс в возрасте 3-х, 4-х, 5-ти и 6-ти месяцев составили $10,03 \pm 1,93$, $9,95 \pm 3,53$, $7,72 \pm 0,68$, $8,64 \pm 1,64$ нмоль сукцината / мин, мг белка, соответственно. Результаты сравнений значений активности фермента не показали статистически значимых различий между этими возрастными группами ($p > 0,05$), поэтому они были объединены в одну выборку. Возрастные различия в активности СДГ митохондрий печени крыс были выявлены у животных возрастом 3-6 месяцев и 12 месяцев (рисунок 2). Контрольное значение активности СДГ у крыс в возрасте 3-6 месяцев составило $9,09 \pm 2,07$ нмоль сукцината / мин, мг белка, что на 21% ниже по сравнению со значением активности фермента печени годовалых крыс ($p < 0,05$), которое составило $11,54 \pm 2,34$ нмоль сукцината / мин, мг белка.

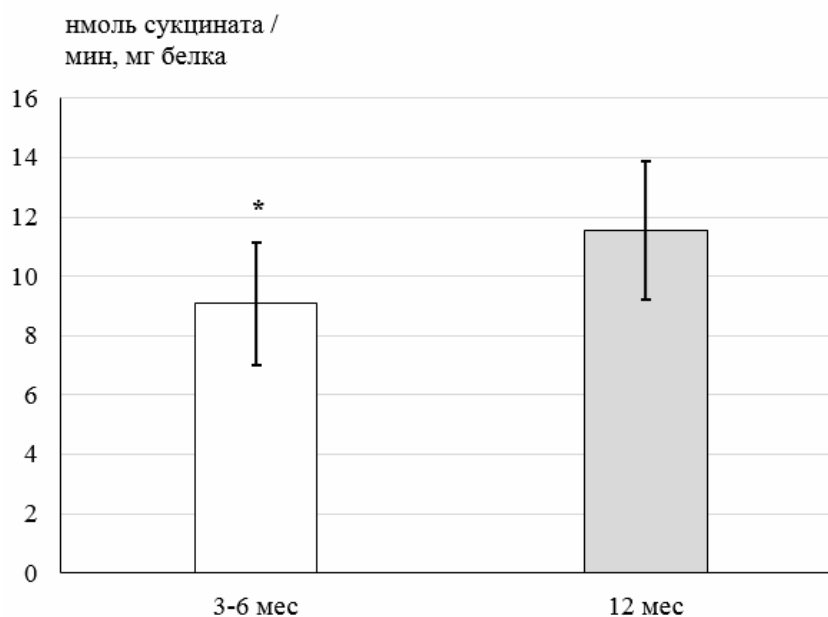


Рисунок 2 - Активность СДГ нативных митохондрий печени крыс возрастом 3-6 мес и 12 мес (* - различия значимы при $p < 0,05$).

Таким образом, показано, что на активность СДГ митохондрий печени крыс оказывает влияние возраст животного.

Влияние производных 1,3,4-тиадиазина на активность СДГ нативных митохондрий печени млекопитающих.

Соединения L-10, L-14, L-17, L-29, ТД-100 оказали ингибирующее воздействие на активность СДГ митохондрий печени млекопитающих в различной степени выраженности (рисунок 3).

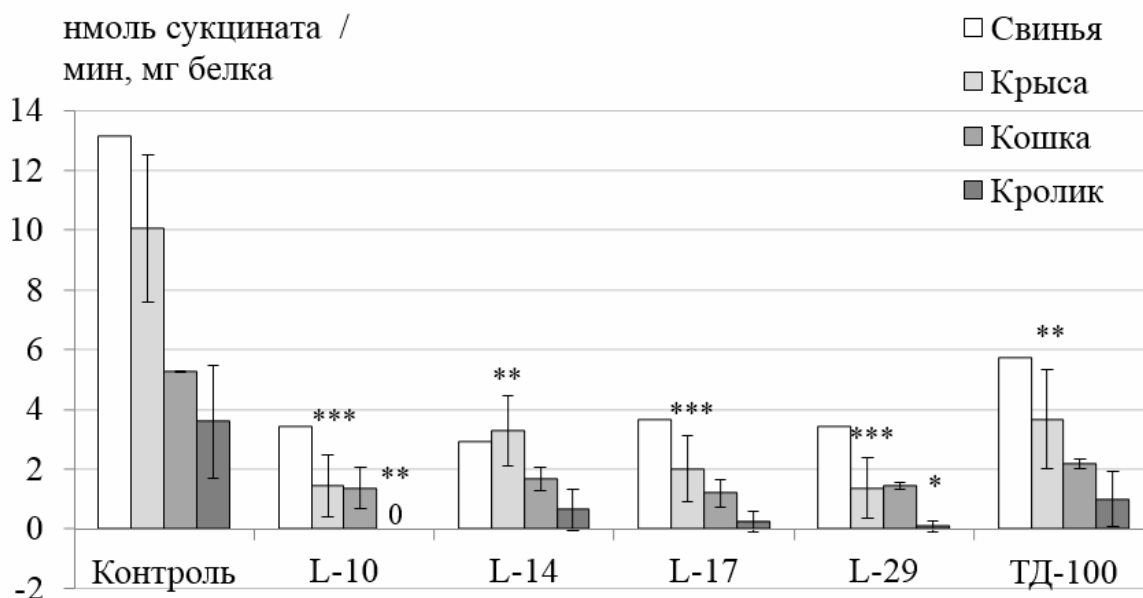


Рисунок 3 - Активность СДГ митохондрий печени млекопитающих до и после инкубации с производными 1,3,4-тиадиазина (различия значимы относительно контроля в каждой группе животных при * - $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, *** - при $p < 0,001$).

У крыс ($n=25$) максимальное воздействие на фермент оказали соединения L-10 и L-29, после инкубации нативных митохондрий с которыми выявлено снижение активности СДГ в 7 раз по сравнению с контролем ($p < 0,001$) до значений $1,44 \pm 1,02$ и $1,36 \pm 1,02$ нмоль сукцината / мин, мг белка, соответственно (рис. 3). Несколько меньшее влияние оказало соединение L-17, после воздействия которого активность СДГ составила $2,01 \pm 1,11$ нмоль сукцината / мин, мг белка, что соответствует снижению в 5 раз относительно контроля ($p < 0,001$). Минимальный ингибирующий эффект на активность СДГ митохондрий печени крыс оказали соединения L-14 и ТД-100, снизив активность фермента в 3 раза по сравнению с контролем ($p < 0,01$) до значений $3,29 \pm 1,19$ и $3,68 \pm 1,67$ нмоль сукцината / мин, мг белка соответственно (рис. 3). При сравнительном анализе полученных результатов выявлены статистически значимые различия между ингибирующими эффектами соединений L-10 и L-14, ТД-100 ($p < 0,01$); L-29 и L-14, ТД-100 ($p < 0,001$); L-17 и ТД-100 ($p < 0,05$),

Подобные эффекты производных 1,3,4-тиадиазина на активность СДГ митохондрий печени наблюдали у кошек и свиньи (рис. 3). Среднее значение активности СДГ нативных митохондрий печени кошки (n=5) составило $5,27 \pm 0,03$ нмоль сукцината / мин, мг белка. После инкубации митохондрий с веществом L-10 и L-17 активность фермента снизилась в 4 раза, относительно контроля ($p > 0,05$), значения которой были $1,37 \pm 0,69$ и $1,21 \pm 0,46$ нмоль сукцината / мин, мг белка соответственно. Соединения L-29 и L-14 ингибировали СДГ в 3 и 3,5 раза относительно нативных митохондрий ($p > 0,05$), значения активности которой составили $1,44 \pm 0,13$ и $1,68 \pm 0,38$ нмоль сукцината / мин, мг белка, соответственно. Под влиянием вещества ТД-100 активность фермента составила $2,19 \pm 0,15$ нмоль сукцината / мин, мг белка, что в 2 раза меньше контрольного значения активности фермента митохондрий печени кошки ($p > 0,05$).

Активность СДГ нативных митохондрий печени свиньи (n=1) составила $13,13$ нмоль сукцината / мин, мг белка, которая после инкубации митохондрий с веществом L-14 снизилась в 4,5 раза ($p > 0,05$) и составила $2,93$ нмоль сукцината / мин, мг белка. Под влиянием соединений L-10 и L-29 значение активности фермента составило $3,45$ нмоль сукцината / мин, мг белка, что соответствует снижению в 4 раза по сравнению с контролем ($p > 0,05$). Значения активности СДГ митохондрий печени свиньи, инкубированных с веществами L-17 и ТД-100, составили $3,67$ и $5,72$ нмоль сукцината / мин, мг белка, что говорит о снижении активности фермента в 3,5 и 2 раза относительно контроля ($p > 0,05$).

Наиболее сильные изменения в активности СДГ после воздействий тиадиазиновых соединений среди экспериментальных животных наблюдали в митохондриях печени кролика, вероятно по причине изначально низкой активности фермента в нативных митохондриях. Под воздействием соединения L-10 митохондриальный фермент был полностью ингибирован, активность которого была равна 0 ($p < 0,01$) (рис. 3). После инкубации митохондрий печени кролика с веществом L-29 активность фермента составила $0,10 \pm 0,19$ нмоль сукцината / мин, мг белка и снизилась в 36 раз, относительно нативных митохондрий ($p < 0,05$). Под воздействием L-17 активность СДГ снизилась в 14 раз по сравнению с контролем и составила $0,25 \pm 0,33$ нмоль сукцината / мин, мг белка. В результате инкубации нативных митохондрий печени кролика с веществами L-14 и ТД-100 значения активности СДГ составили $0,64 \pm 0,67$ и $1,00 \pm 0,91$ нмоль сукцината / мин, мг белка, что характеризует снижение в 5,5 и 3,6 раз относительно контроля, соответственно (рис. 3).

Кроме производных 1,3,4-тиадиазина L-10, L-14, L-17, L-29, ТД-100 были изучены эффекты тиадиазиновых соединений, таких как L-2, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8, L-9. Однако, по

причине их ограниченного количества, исследование влияния этих соединений на активность СДГ проводили только у крыс. После инкубации нативных митохондрий печени крыс с соединением L-9 активность фермента снизилась на 83%, с L-4 и L-7 – на 72%, с L-5 и L-8 – на 58%, с L-2 – на 43% относительно контрольного значения ($p < 0,05$). Среднее значение активности СДГ нативных митохондрий печени крыс составило $11,89 \pm 1,14$ нмоль сукцината / мин, мг белка, а после воздействия вещества L-6 - $11,15 \pm 1,67$ нмоль сукцината / мин, мг белка ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии ингибирующего влияния этого соединения на фермент (таблица 1).

Таблица 1 - Активность СДГ ($M \pm SD$) митохондрий печени крыс (нмоль сукцината / мин, мг белка) до и после воздействия производных 1,3,4 – тиадиазина.

Соединения	Контроль	L-2	L-4	L-5	L-6	L-7	L-8	L-9
Активность СДГ	11,89 \pm 1,14	6,77 \pm 1,13 *	3,31 \pm 1,32 **	4,85 \pm 1,7 *	11,15 \pm 1,67	3,26 \pm 1,41 **	4,98 \pm 1,33 *	2,02 \pm 0,87 ***

Примечание - различия значимы относительно контроля при *- $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, *** - при $p < 0,001$

Таким образом, среди всех производных 1,3,4 – тиадиазина, максимальным ингибирующим эффектом на функционирование СДГ митохондрий печени млекопитающих обладали соединения L-9, L-10, L-17, L-29, меньшим воздействием характеризуются соединения L-4, L-7, L-14, ТД-100, минимальное воздействие на фермент оказали вещества L-2, L-5, L-8 и вещество L-6 не оказало никакого влияния на работу СДГ.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Межвидовые различия в сукцинатдегидрогеназной активности митохондрий печени млекопитающих, очевидно, связаны с особенностями метаболических процессов у этих видов. Так известно, что показатель потребления кислорода и суммарный объем митохондрий клеток печени у кроликов на 38% ниже, относительно крыс (Каркищенко, 2007). Это свидетельствует о меньшей интенсивности энергетических процессов в тканях кролика, и, следовательно, о меньшей активности ферментов цикла Кребса, таких как

СДГ, что согласуется с полученными результатами. Кроме того, в литературных источниках существуют данные об увеличении интенсивности метаболизма с уменьшением размеров тела животных. Так, значение основного обмена (выражается показателем потребления кислорода в покое) для свиньи составляет 0,35 мл/(г*ч), для кошки – 0,45, для кролика – 0,55 и для крысы – 0,88 мл/(г*ч) (Проссер, 1977). Согласно этому нами показано, что активность СДГ митохондрий печени крыс, обладающих наименьшей массой тела среди экспериментальных животных, на 48% и 64% больше относительно активности фермента печени кролика ($p < 0,001$) и кошки ($p < 0,05$), соответственно. Исключением в нашем исследовании является значение активности нативных митохондрий печени свиньи, которое, несмотря на наибольшую массу тела животного относительно крыс, кроликов и кошек, оказалось самым высоким. Неодинаковая ферментативная активность клеток различных млекопитающих обусловлена генетическими особенностями их морфофункциональной организации.

Несмотря на то, что в литературе описаны способы взаимодействия различных химических соединений с СДГ (Miyadera et al., 2003; Landry et al., 2013), механизм ингибирующего воздействия производных 1,3,4-тиадиазина в настоящее время остается неизвестным. Возможно они взаимодействуют с активным центром СДГ или блокируют убихинон-связывающий сайт фермента, предотвращая перенос электронов дальше по ЭТЦ. Однако в результате анализа степени воздействия производных 1,3,4-тиадиазина в зависимости от химической структуры этих соединений показано, что вещества, проявляющие максимальный ингибирующий эффект на активность СДГ митохондрий печени млекопитающих (L-9, L-10, L-17, L-29) (рисунок 4) содержат производное морфолина во втором положении тиадиазинового кольца (рисунок 5).

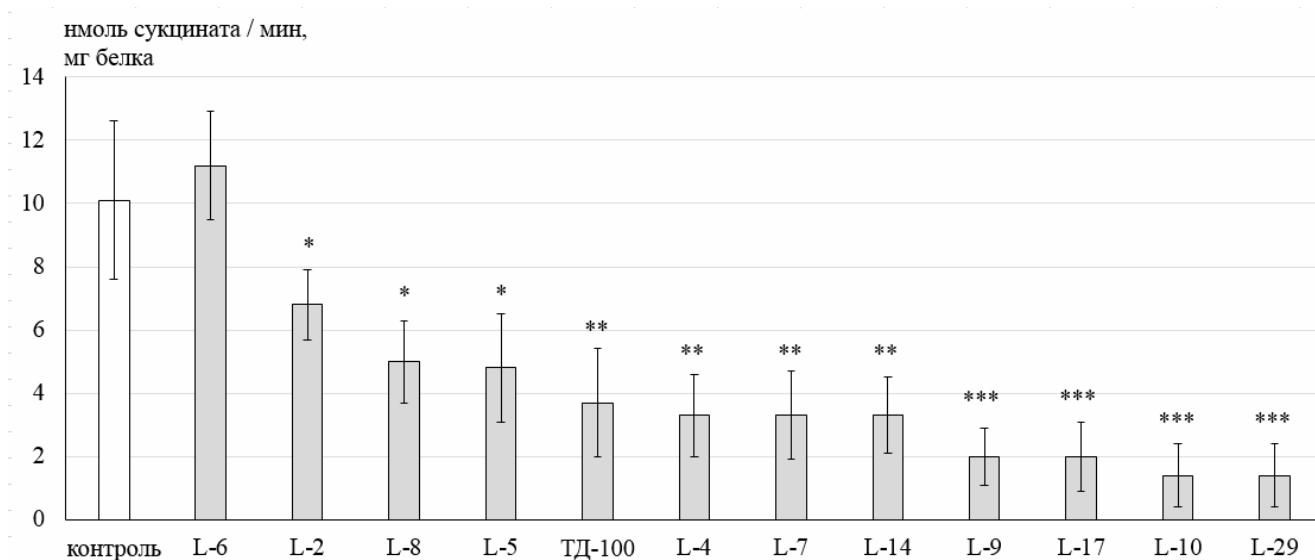


Рисунок 4 - Активность СДГ митохондрий печени крыс до и после воздействия производных 1,3,4 – тиadiaзина (различия значимы относительно контроля при * - $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$, *** - при $p < 0,001$.)

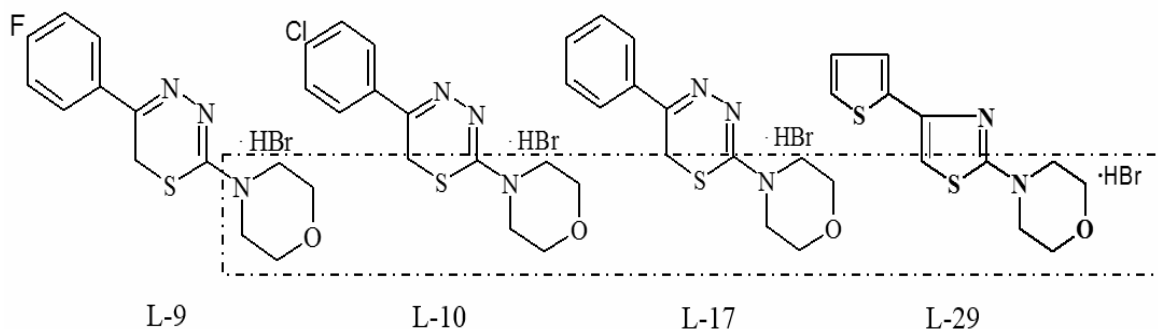


Рисунок 5 - Химическое строение соединений L-9, L-10, L-17 и L-29 (выделен общий морфолиновый фрагмент во втором положении тиadiaзинового кольца)

Замена морфолина на другие функциональные группы во втором положении тиadiaзинового кольца приводит к снижению физиологического воздействия тиadiaзиновых соединений на митохондриальный фермент (рис. 4). Кроме того, на степень ингибирующего воздействия производных 1,3,4-тиadiaзина оказывает влияние характер заместителя в пятом положении тиadiaзинового кольца.

Таким образом, нами показаны межвидовые различия в активности СДГ митохондрий печени крысы, кролика, кошки и свиньи, межвозрастные особенности функционирования фермента у крыс, обусловленные метаболическими потребностями организма в связи с адаптацией к различным условиям существования. Кроме того, нами выявлен ингибирующий эффект производных 1,3,4-тиadiaзина на активность СДГ митохондрий печени млекопитающих, степень которого зависит от химической структуры этих соединений. По итогам анализа полученных данных мы осуществили скрининг среди тиadiaзиновых веществ по степени влияния на фермент и определили соединения с максимальным и минимальным ингибирующими эффектами на активность СДГ митохондрий печени млекопитающих.

ВЫВОДЫ

1. Активность сукцинатдегидрогеназы нативных митохондрий печени млекопитающих зависит от видовой принадлежности. Среднее значение активности фермента митохондрий печени свиньи составило 13,13 нмоль сукцината / в мин, мг белка, крысы - $10,07 \pm 2,47$, кошки - $5,27 \pm 0,03$, кролика - $3,59 \pm 1,90$ нмоль сукцината / в мин, мг белка.

2. С возрастом наблюдается изменение активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени крыс. Активность фермента в группе крыс 3-6 месяцев составила $9,09 \pm 2,07$ нмоль сукцината / мин, мг белка, что на 21% ниже по сравнению со значением активности фермента печени годовалых крыс ($p < 0,05$), которое составило $11,54 \pm 2,34$ нмоль сукцината / мин, мг белка.

3. Производные 1,3,4-тиадиазина, за исключением соединения L-6, оказали ингибирующий эффект в разной степени на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени во всех группах экспериментальных животных. Максимальное воздействие на фермент проявили соединения L-10, L-29, L-9, L-17, снизив активность сукцинатдегидрогеназы у крыс – в 5-7 раз, у кроликов – в 14-36 раз, у кошки и свиньи - в 4 раза относительно нативных митохондрий ($p < 0,05$).

4. Присутствие в структуре тиadiaзиновых соединений производного морфолина обуславливает максимальное ингибирующее действие на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени млекопитающих.

5. На степень ингибирующего эффекта производных 1,3,4-тиадиазина по отношению к ферменту печени экспериментальных животных оказывает влияние характер заместителя в 5-м положении тиadiaзинового кольца.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах из списка ВАК РФ:

1. Вахнина Н.А., Алисултанова Н.Ж., Шадрина В.Д., Бойко Е.Р., Сидорова Л.П., Чупахин О.Н. Влияние производных 1,3,4-тиадиазинов на активность сукцинатдегидрогеназы печени крыс // В мире научных открытий. 2014. № 2 (50). С. 44-55.

2. Алисултанова Н.Ж., Вахнина Н.А., Шадрина В.Д., Сидорова Л.П., Бойко Е.Р., Чупахин О.Н. Изменение активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени крыс под воздействием соединений класса 1,3,4-тиадиазина в условиях *in vitro*// Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т 16. № 5(4). С. 1205-1208.

Тезисы и материалы конференций:

1. Вахнина Н.А., Алисултанова Н.Ж., Шадрина В.Д., Сидорова Л.П., Бойко Е.Р., Чупахин О.Н. Влияние производных 1,3,4-тиадиазина на активность сукцинатдегидрогеназы печени крыс // Материалы докл. Уральского научного форума «Современные проблемы органической химии». 8-12 июня, 2014. – Екатеринбург, 2014. – С.110
2. Алисултанова Н.Ж., Вахнина Н.А. Влияние производных 1,3,4-тиадиазина на активность сукцинатдегидрогеназы печени крыс // Мат. докл. XIII Всероссийской молодежной научной конференции «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике». Сыктывкар, 2014. С.5-8.

Выражаю искреннюю благодарность академику Чупахину Олегу Николаевичу из Института органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН России (г. Екатеринбург), кандидату химических наук, доценту Сидоровой Ларисе Петровне из ФГАОУ ВПО «УрФУ» имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» (г. Екатеринбург) за предоставление производных 1,3,4-тиадиазина; научному руководителю доктору медицинских наук, профессору Евгению Рафаиловичу Бойко, а также коллективу сотрудников отдела экологической и медицинской физиологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН за ценные советы и замечания, помощь и поддержку во время выполнения и написания диссертационной работы.