

administration of bCpG DNA were revealed. The present findings suggest that injections of bCpG DNA to mice with ascitic Ehrlich carcinoma increase the survival rates of tumor-bearing hosts especially after prophylactic application.

Key words: bacterial CpG DNA, delayed type hypersensitivity, anticancer effect, cytotoxic activity of blood serum.

УДК 615.21.03

С. В. Павлов

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO МИТОПРОТЕКТИВНОЙ И НЕЙРОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО 1,4 БЕНЗОДИАЗЕПИНА – ЦИНАЗЕПАМА

В связи с ростом числа церебральных патологий, поиск новых нейропротективных лекарственных средств остается актуальным [1, с. 74 – 81; 2, с. 58 – 65].

В последнее время в литературе появились сведения, о том, что ГАМК-эргическая система может влиять на улучшение когнитивных процессов, а именно памяти и обучаемости. Как известно, влияние препаратов бензодиазепиновой структуры на способность к обучению и на процессы памяти неоднозначно [3, с. 82 – 92]. Есть данные о том, что под влиянием некоторых бензодиазепиновых транквилизаторов в низких дозах происходит улучшение этих процессов. Рядом экспериментальных исследований установлено, что среди производных 1,4-бензодиазепинового ряда наиболее широкий спектр нейротропной активности обладал циназепам, который в интервале дозы 1 – 10 мг/кг проявлял выраженные противосудорожные, антидепрессивные, ноотропные эффекты [4, с. 18 – 22; 5, с. 252]. Кроме того, установлено, что в дозе 0,5 мг/кг циназепам обладал и антигипоксическими свойствами [6, с. 522 – 523]. В связи с этим дальнейшее исследование нейропротективных свойств производного 1,4 бензодиазепина – циназепам представляется интересным, что открывает перспективы дальнейшего расширения отраслей его применения и внедрения в клиническую практику.

Известно, что развитие церебральных патологий сопровождается интенсификацией процессов свободнорадикального окисления в тканях головного мозга. Под действием активных форм кислорода (АФК) (супероксидрадикал, пероксонитрит) происходит открытие митохондриальных пор, экспрессией и выходом в цитозоль проапоптических белков [7, с. 23 – 29; 8, с. 20 – 26; 9, с. 24 – 31]. Открытие митохондриальных пор происходит за счет окисления

тиольных групп цистеин-зависимого участка белка внутренней мембраны митохондрий (АТФ/АДФ-антипортере), превращая его в проницаемый неспецифический канал-пору. Открытие пор превращает митохондрии из «электростанций» в «топку» субстратов окисления без образования АТФ. Повреждение мембраны митохондрий АФК усиливает открытие пор и высвобождение апоптогенных белков из поврежденных митохондрий, происходит так называемый митоптоз, с последующим запуском апоптоза всей нейрональной клетки. Митохондриальная пора представляет собой канал, проходящий через обе митохондриальные мембраны и состоящий из трех белков: транслокатора адениновых нуклеотидов, потенциалзависимого анионного канала (порина) и регуляторного бензодиазепинового рецептора [7, с. 23 – 29; 10, с. 329 – 364]. Учитывая то обстоятельство, что митохондриальная пора включает в свою структуру регуляторный митохондриальный бензодиазепиновый рецептор (МБР), можно предположить, что путем влияния на активность МБР возможно регулировать открытие митохондриальной поры, тем самым блокируя запуск патологических изменений нейрона, связанных с развитием митохондриальной дисфункции [9, с. 24 – 31; 10, с. 329 – 364; 11, с. 1121 – 1125; 12, с. 444 – 458].

Таким образом, целью настоящего исследования явилось изучение способности 1,4 бензодиазепина – циназепамы влиять в опытах *in vitro* на показатели митохондриальной дисфункции (открытие митохондриальной поры, мембранный потенциал заряда митохондрий), а также оказывать протективное действие в суспензии выделенных нейронов в среде, содержащей токсическую дозу глутамата.

Для исследований *in vitro* нейроны выделяли из коры головного мозга неполовозрелых крыс линии Вистар (Я. Буреш, 1991). Принцип метода основан на дезинтеграции мозговой ткани путем последовательного фильтрования через нейлоновые сита различного диаметра в среде, содержащей поливинилпираллидон, бычий сывороточный альбумин и хлористый кальций, с последующим ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы и фиколла [13, с. 33 – 34].

Выделение митохондрий из нейронов проводили по методу Прохоровой (1982). Для этого суспензию выделенных нейронов центрифугировали 7 мин при 700 g (4 °C). Затем супернатант центрифугировали повторно 15 мин при 11000 g (4 °C). Митохондрии суспендировали в небольшом объеме среды выделения, не содержащей ЭДТА, и хранили на льду. Образование вызванное набуханием митохондрий поры регистрировали спектрофотометрически при 540 нм (A₅₄₀). Открытие митохондриальной поры инициировали путем добавления в суспензию митохондрий избытка глутамата и кальция.

Параллельно делали серию с введением в инкубационную среду глутамата и циназепама (0,1 мл) [7, с. 23 – 29; 14, с. 48 – 51].

Для оценки нейропротективного действия *in vitro* исследуемого производного 1,4-бензодиазепина – циназепама проводили дифференцированное окрашивание суспензии выделенных нейронов аммиачным серебром. Метод основан на избирательном окрашивании аммиачного серебра дегенерирующих нейронов в темно-коричневый цвет. В суспензию добавляли токсическую дозу глутамата, циназепама (0,1 мл) [3, с. 82 – 92] и устанавливали его способность влиять на процессы клеточной гибели, для чего в видимом поле подсчитывали количество дегенерирующих нейронов [13, с. 33 – 34]. Далее проводили сравнительный анализ между серией с добавлением глутамата и циназепама и серией с добавлением только глутамата.

Отличия между группами оценивали статистически с использованием параметрического t-критерия Стьюдента с помощью программ Biostat и MS Excel. Достоверность отличий относительных величин оценивалась с применением критерия χ^2 . Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ($p \leq 0,05$).

Проведенные нами исследования *in vitro* показали, что введение в инкубационную среду циназепама (0,1 мл) приводило к торможению открытия митохондриальной поры, а также способствовало сохранению мембранного потенциала заряда митохондрий (рис. 1, 2).

Подобное митопротективное действие, по нашему мнению, объясняется тем, что митохондриальная пора включает в свою структуру, как упоминалось выше, регуляторный МБР. Можно предположить, что путем влияния на активность МБР можно регулировать открытие митохондриальной поры, тем самым блокируя запуск патологических изменений нейрона, связанных с развитием митохондриальной дисфункции. Известно, что помимо функции поддержания жизнедеятельности клетки МБР также непосредственно участвует в процессах деградации и гибели клетки и, по-видимому, является одним из важных участников апоптоза [9, с. 24 – 31; 10, с. 329 – 364]. Было показано, что нарушение активности МБР повышает чувствительность клеток к стимулам, индуцирующим клеточную гибель (апоптоз), включая нарушения структуры ДНК, сопряжение глюкокортикоидного рецептора и церамида, а также может препятствовать супрессии апоптоза под действием белка Bcl2 (белки, относящиеся к семейству Bcl2, ингибируют выход цитохрома C из митохондрии). Кроме того, нарушение функции МБР в условиях оксидативного стресса приводило к индукции коллапса трансмембранного потенциала, деградации митохондрий в лейкемических клетках HL60 и снижению уровня митохондриальной ДНК. Ряд экспериментальных исследований показал, что лиганды МБР способны регулировать активность митохондриальной поры за счет модуляции МБР в процессе апоптоза, блокируя его

инициацию, и напротив, блокада МБР его антагонистом РК 11195 приводила к снижению мембранного потенциала митохондрии, активизации каспазы 3 и, наконец, индуцировала фрагментацию ДНК. Помимо этого, блокаторы МБР индуцировали остановку клеточного цикла в фазе G1/G0 [11, с. 1121 – 1125; 12, с. 444 – 458].

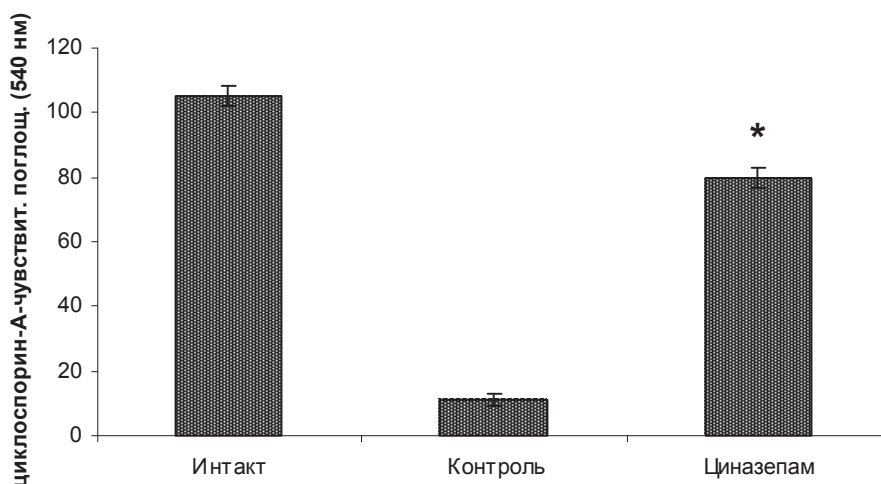


Рис. 1. Влияние Циназепама на открытие митохондриальной поры *in vitro*

Примечания: контроль – суспензия митохондрий + Ca^{2+} + глутамат; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю

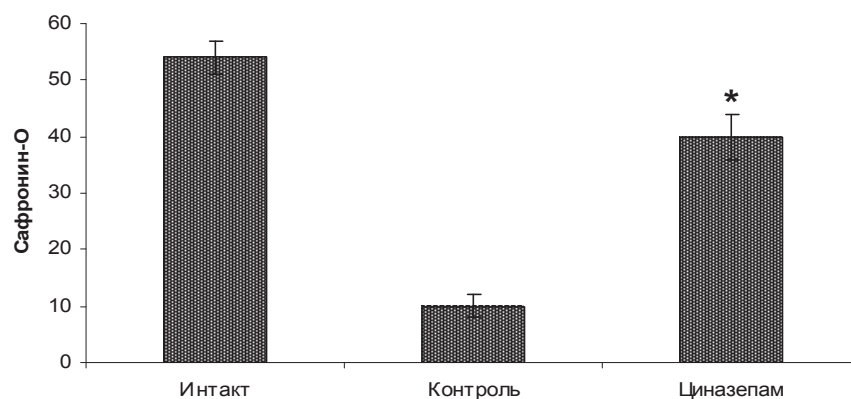


Рис. 2. Влияние циназепама на изменение мембранного потенциала заряда ($\Delta\Psi$) митохондрий *in vitro*

Примечания: контроль – суспензия митохондрий + Ca^{2+} + глутамат; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю

Высокая митопротективная активность циназепама объясняет и его нейропротективное действие. Установлено, что внесение в

инкубационную среду циназепама в дозе 0,1 мл уменьшает количество дегенерирующих нейронов в суспензии с добавлением избытка глутамата (табл. 1).

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования *in vitro* показали значительную митопротективную, а также нейропротективную активность производного 1,4-бензодиазепаина – циназепама, что обуславливает перспективность дальнейшего изучения его мито- и нейропротективных свойств на различных моделях церебральных патологий.

Таблица 1

Влияние Циназепама на количество дегенерирующих нейронов в суспензии с добавлением глутамата

Серии	Количество исследований в серии	Количество дегенерирующих нейронов в видимом поле, М ± m
Интакт	n = 10	5 ± 2
Контроль	n = 10	76 ± 6
Циназепам	n = 10	42 ± 5*

Примечания: контроль – суспензия нейронов + глутамат; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю

Литература

- 1. Скворцова В. И.** Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и нейропротекция / В. И. Скворцова // Вестн. РАМН. – 2003. – № 11. – С.74 – 81.
- 2. Григорова И. А.** Патогенетические механизмы ишемического церебрального инсульта / И. А. Григорова // Лік. справа. – 1998. – № 1. – С. 58 – 65.
- 3. Фармакологічні властивості 1,3,4-бензотриазепинів з різними замісниками** / Л. В. Попова, С. В. Власюк, В. І. Павловський та ін. // Фармац. журн. – 2002. – № 2. – С. 82 – 92.
- 4. Андронати С. А.** ГАМК-ергические снотворные средства / С. А. Андронати, Т. Л. Карасева, Л. В. Попова // Фармацевт. Україна. – 2004. – № 2. – С. 18 – 22.
- 5. Karaseva T. L.** Study of the influence of 1,4-benzodiazepine anxiolytics on memory processes in rats / T. L. Karaseva, L. V. Popova, V. I. Pavlovsky // Abstracts International conference chemistry of nitrogen containing heterocycles. – Kharkiv, 2003. – С. 252.
- 6. Карасьева Т. Л.** Вплив ГАМК-ергічних снодійних засобів циназепаму і зопіклону на пам'ять у дослідях на щурах / Т. Л. Карасьева, Л. В. Попова, С. А. Андронати // VI Нац. з'їзд фармацевтів України. – Х., 2005. – С. 522 – 523.
- 7. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином** / И. Ф. Беленичев, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов и др. // Международный невролог. журн. – 2008. – № 4 (20). – С. 23 – 29.
- 8. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных**

патологических состояниях (обзор литературы) / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов и др. // Совр. пробл. токсикол. – 2005. – № 3. – С. 20 – 26. **9. Антиоксидантна система захисту організму (огляд літератури) / І. Ф. Беленічев, Ю. І. Губський, Є. Л. Левицький та інші. // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 3. – С. 24 – 31. 10. Елисеев А. А.** Регуляция биосинтеза тетрапироллов и изопреноидов интегральными мембранными рецепторами семейства МБР/TspO / А. А. Елисеев // Успехи биол. химии. – 2003. – Т. 43. – С. 329 – 364. **11. Castedo M.** Mitochondrial apoptosis and the peripheral benzodiazepine receptor: a novel target for viral and pharmacological manipulation / M. Castedo, J. -L. Perfettini, G. Kroemer // J. Exp. Med. – 2002. – No. 196. – P. 1121 – 1125. **12. Diazepam** binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms / M. Garnier, N. Boujrad, B. O. Oke et al. // Endocrinol. – 1993. – No. 132. – P. 444 – 458. **13. Буреш Я.** Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М. : Высш. шк., 1991. – 527 с. **14. Прохорова М. И.** Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М. И. Прохорова. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та., 1982. – 272 с.

Павлов С. В. Дослідження *in vitro* мітопротективної та нейропротективної активності похідного 1,4 бензодіазепіну – циназепаму

У статті автором показана роль бензодіазепінових рецепторів в регуляції відкриття мітохондріальної пори та пов'язаних з нею процесів клітинної гибелі. Власними експериментальними дослідженнями *in vitro* на видалених мітохондріях показано, що внесення до інкубаційної середовища з надлишком Ca^{2+} та глутамату циназепаму (0,1 мл) призводило до гальмування відкриття мітохондріальної пори, а також сприяло збереженню мембранного потенціалу заряду. Висока мітопротективна активність циназепаму пояснює його нейропротективну ефективність, що відображалось в здатності зменшувати кількість нейронів, що дегенерують у суспензії з надлишком глутамату.

Ключові слова: бензодіазепінові рецептори, циназепам, мітохондріальна дисфункція, нейропротективний ефект.

Павлов С. В. Исследование *in vitro* митопротективной и нейропротективной активности производного 1,4 бензодиазепина – циназепам

В статье автором показана роль бензодіазепінових рецепторів в регуляції відкриття мітохондріальної пори та пов'язаних з нею процесів клітинної гибелі. Собственными експериментальными исследованиями *in vitro* на выделенных митохондриях показано, что

внесение в инкубационную среду, содержащую избыток Ca^{2+} и глутамата циназепама (0,1 мл) приводило к торможению открытия митохондриальной поры, а также способствовало сохранности мембранного потенциала заряда. Высокая митопротективная активность циназепама объясняет его нейропротективную эффективность, выражающуюся в способности уменьшать количество дегенирирующих нейронов в суспензии с избытком глутамата.

Ключевые слова: бензодиазепиновые рецепторы, циназепам, митохондриальная дисфункция, нейропротективный эффект.

Pavlov S. V. Research *in vitro* mitoprotektiv and neuroprotektiv activity of derivate 1,4 benzodiazepin – cinazepam

In the article an author is rotin the role of benzodiazepins receptors in adjusting of opening of mitohondrials pore and processes of cellular death related to it. On selected experimental researches *in vitro* it is rotined by us, that bringing in an incubation environment, containing surplus of Ca^{2+} and glutamat of cinazepam(0,1 ml) resulted in braking of opening of mitohondrials pore, and also safe diaphragm potential of charge. High mitoprotectiv activity of cinazepam explains him neuroprotectiv efficiency, expressed in ability to diminish the amount of degenerativ neurons in a suspensoids in plenty of glutamat.

Key words: benzodiazepine receptors, cinazepam, mitochondrial dysfunction, neuroprotective action.

УДК 612.1.062:612.8.067

В. М. Раздайбедін

**ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ ПРИСТОСУВАЛЬНИХ РЕАКЦІЙ
СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ В ОНТОГЕНЕЗІ ЛЮДИНИ
ПІД ВПЛИВОМ ТРИВАЛИХ ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ
(літературний аспект проблеми)**

Для досягнення високих спортивних результатів, поряд з характером спортивних тренувань, велике значення мають індивідуальні властивості морфологічної структури й функціональних особливостей організму. Оскільки індивідуальні особливості організму визначаються перш за все нервовою системою, то ні в кого не виникає сумніву в необхідності дослідження можливої кореляції між будовою тіла людини, його вегетативними функціями та індивідуальними особливостями нервової системи.