

ПОИСК ПУТЕЙ ОПТИМИЗАЦИИ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Мкртчян Л.Н.^{1*}, Гаспарян В.К.²

¹ ЕГМУ, Кафедра патанатомии и клинической морфологии

² НИИ Биохимии им. Г.Х. Буниатяна НАН РА

Статья получена: 14.11.2019, рецензирована: 16.01.2020, принята: 05.03.2020



Бывшему директору Национального Онкологического Центра МЗ РА им. В.А.Фанарджяна, создателю эмбрионального противоопухолевого модулятора (ЭПОМ), иностранному члену Российской Академии наук, заслуженному деятелю науки Республики Армения, профессору Ереванского государственного медицинского университета им. М.Гераци Левону Никитовичу Мкртчяну присуждена Золотая медаль Национального Онкологического Центра МЗ РА за заслуги в развитии онкологии в Армении.

Ключевые слова: нейродегенерация, переступень, меристема, физико-химические свойства.

Нейродегенеративная патология в последние десятилетия привлекает к себе пристальное внимание исследователей. Увеличение продолжительности жизни повышает риски развития таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, рассеянный склероз и т.д. [4, 5]. В этиологии этих заболеваний, наряду с генетическими факторами, важная роль приписывается металлам и окислительному стрессу [6, 10]. Заболевание характеризуется повышенной гибелью нейронов как в результате апоптоза (программируемая клеточная гибель), так и в результате некроза. Параллельно с этим происходят функциональные изменения в белках, которые сами по себе способствуют развитию патологии [3]. Так, накопление протеаза-резистентных аномально упакованных и агрегированных белков, – это общая характеристика таких заболеваний. Исходя из указанной этиологии этих заболеваний, используемая в настоящее время терапия направлена на преодоление причин, являющихся факторами риска (превентивная тера-

пия), а с другой стороны – на устранение собственно патологических процессов. В качестве превентивной меры рекомендуется использовать антиоксидантную терапию [9]. В качестве такого антиоксиданта, который оказывает превентивное действие, исследователи называют ресвератрол, который присутствует в различных растительных источниках и винах. Было показано, что он обладает протективным эффектом против сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний [12]. Однако, при развившейся патологии антиоксидантная терапия не особенно эффективна. В последнее время рассматриваются новые варианты терапии таких заболеваний с использованием антиапоптотических факторов, действие которых направлено на ингибирование апоптоза нейронов. При таком подходе используют как апоптоз ингибирующие факторы, так и активно делящиеся клетки мезенхимы. При таком подходе клетки доставляются в нужные участки посредством интрацеребральной инъекции. Эти клетки стимулируют эндогенный нейрональный рост, уменьшают апоптоз, снижают уровень свободных радикалов и восстанавливают синаптические связи [7]. Однако использование цельных клеток таит в себе определенные риски, связанные с возможными трансформациями таких клеток в опухолевые, с одной стороны, и опасностью заражения эндогенными вирусными частицами – с другой.

В этом аспекте были получены интересные дан-

* АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

Л.Н. Мкртчян

ЕГМУ, кафедра патанатомии и клинической морфологии

Адрес: Корюна 2, Ереван, Армения

Эл. почта: MLN-38@mail.ru

Тел.: (+374) 94 02 23 64

Таблица 1

Анализ степени гликозилирования белков по осаждению хлорной кислотой

Оптическое поглощение при 280 нм	
Нативный контроль 1,946	Нативная меристема $A_{280} = 2,29$
Оптическое поглощение при 280 нм супернатанта после центрифугирования и обработки хлорной кислотой (конечная концентрация 5%)	
Контроль 0,976	Меристема 0,5967

ные на моделях с индуцированной мадопаром нейродегенеративной патологии с использованием эмбрионального противоопухолевого модулятора Мкртчяна (ЭПОМ).

При этом была показана протекторная роль инъекционной формы препарата [1, 13]. При данном подходе авторы использовали не сами эмбриональные клетки, а продукты, полученные из них.

В данной статье была сделана попытка получения аналогичных антиапоптозных препаратов из корней переступня, а конкретнее, из меристемы корней. В пользу данного подхода говорил тот факт, что различные компоненты этого растения положительно зарекомендовали себя в некоторых областях клинической и параклинической практики [8].

Материал и методы

Препараты меристемы получали из корня переступня, который извлекался из почвыв конце октября. В нашем случае использовались растения, произрастающие на высоте 1350 м в экологически чистом регионе Армении, каковым является Егвард. Корни осторожно извлекались, по возможности, без нанесения повреждений самой корневой части. Отступя примерно на 5 см от основания корня, удалялись стебельки. Извлеченный корень тщательно промывался в холодной воде. Острым ножом отсекалась верхушка и по всему телу корня наносились параллельные насечки глубиной 2-3 мм через каждые 0,5 см. Данные процедуры направлены на получение меристемы-эмбриональной растительной субстанции.

Контрольные образцы корней извлекались и обрабатывались аналогичным образом (без срезания верхушки и нанесения надрезов).

Подвергшиеся первичной обработке оба образца корней отдельно устилались на влажной почве, недоступной солнечным лучам, и покрывались широкогорлым сосудом (экспозиция – 2 недели). По истечении указанного срока образцы корней вновь промывались в холодной проточной воде, отсепаивался корковый слой обоих образцов, кусочки помещались в про-

нумерованные стеклянные тары с притертой пробкой и заливались до полного покрытия медицинским 96° спиртом.

Экстракция и гомогенизация физиологически активной гуморальной субстанции из искусственно индуцированной меристемной ткани проводилась 0,2 М фосфатным буфером (pH 7,2), в течение 3 часов в холодильнике с периодическим взбалтыванием.

Далее экстракт обрабатывался этиловым спиртом в конечной концентрации 84% и центрифугировался в охлаждаемой центрифуге при 6000 xg в течение 20 минут, осадок собирался и суспендировался в воде, затем диализировался против 1 мМ раствора фосфатного буфера (pH 7,2). Нерастворившаяся часть удалялась центрифугированием, а супернатант лиофилизировался. Беловато-желтоватый пушистый стерильный лиофилизат сохраняет свои свойства в течение 3-х лет при хранении при 4-8° С.

Белок в пробах определялся по связыванию с красителем Кумасси синий G-250 по методу [2].

Общие углеводы определяли по реакции с антроном по методу [11], используя в качестве стандарта глюкозу.

Низкомолекулярные пептидные субстанции определяли по поглощению при оптической длине волны 280 нм после удаления белков 10% раствором трихлоруксусной кислоты.

Для физико-химического анализа препаратов лиофилизат меристемного экстракта растворялся в 0,1 М растворе фосфатного буфера (pH 7,2) в конечной концентрации 10 мг/мл.

Результаты и обсуждение

Первоначально оценивались оптические спектры контроля и меристемного препарата.

Анализ проводился при длине волны 280 нм. Поглощение при такой длине волны – показатель наличия белков или ароматических аминокислот и такой подход позволяет оценить содержание этих компонентов в биологическом материале.

1) контроль $A_{280} = 1,946$

Таблица 2

Определение белка по связыванию с красителем Кумасси голубой G-250

Используемые пробы	Анализ	Оптическое поглощение при 595 нм	Концентрация белка мг/мл
Контрольная проба	1,5 мл реагент + 50 л воды	0	0
Нативный контроль	1,5 мл реагент + 50 л контроль	0,02	0,05
Меристема	1,5 мл реагент + 50 л меристема	0,02	0,05
Белковый стандарт БСА	1,5 мл реагент + 50 л стандарт БСА	0,344	0,9

Таблица 3

Определение общих сахаров по реакции с антроном

Используемые пробы	Анализ	Оптическое поглощение при 630 нм	Концентрация, мг/мл
Контроль	0,05 мл контроль+0,45 мл вода+2,5 мл реагент	6,6	4,47
Меристема	0,05 мл меристема+0,45 мл вода+2,5 мл реагент	4,95	3,98
Стандарт глюкозы 1	0,5 мл+ 2,5 мл реагент	0,445	0,14
Стандарт глюкозы 2	0,5 мл+ 2,5 мл реагент	0,880	0,28

2) меристема $A_{280} = 2,29$

Далее проводилась обработка проб трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 10%). Такая обработка позволяет осаждать высокомолекулярные белки, оставляя в супернатанте пептиды и прочие низкомолекулярные соединения. В данном случае это позволяет понять какая часть поглощения при 280 нм характерна для белков, а какая – для низкомолекулярных пептидов и свободных ароматических аминокислот.

1) контроль (супернатант) $A_{280} = 0,9186$ и 2) меристема (супернатант) $A_{280} = 0,8269$.

Результаты демонстрируют, что меристема содержит значительно больше высокомолекулярных компонентов по сравнению с контролем.

В дальнейших исследованиях проводилось осаждение нативных препаратов хлорной кислотой в конечной концентрации 5% для выявления гликозилирования. Как известно, высокий уровень гликозилирования белков препятствует их осаждению хлорной кислотой.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в контроле значительная часть препарата остается в супернатанте, что говорит в пользу того, что здесь много гликозилированных компонентов, тогда как в меристемном препарате значительно уменьшается степень гликозилирования, и основная часть белка осаждается.

Анализ содержания белка в контрольном и меристемном препаратах представлен в таблице 2.

Установлено очень низкое количество белка как в контроле, так и в меристеме, что может быть связано с полной маскировкой белковых групп, необходимых для связывания красителя.

Анализ общих сахаров проводился по реакции с антроном в концентрированной серной кислоте. Результаты данных представлены в таблице 3.

Пробы кипятили 15 минут, охлаждали и фотометрировали при 630 нм.

Меристема – это ткани растений, состоящие из активно делящихся клеток, которые обеспечивают нарастание общей массы растений. Если провести аналогию с животными тканями, то можно сказать, что это резерв стволовых клеток, и в этом плане было разумно ожидать, что такие ткани будут содержать факторы, которые стимулируют пролиферацию, с одной стороны, а с другой – факторы, подавляющие апоптоз. Нами была использована аналогичная методика, которая была применена для получения ЭПОМ-а, который хорошо себя зарекомендовал на модели мадопариндуцированной нейродегенерации. Мы ожидаем, что здесь также будут получены аналогичные результаты, поскольку проведенный физико-химический анализ по выявлению некоторых компонентов препарата выявил высокое содержание сахаров. Гликозилирование, как известно, характерно как для эмбриональных, так и опухолевых тканей и способствует активной пролиферации и ингибированию апоптоза. Возможно, что препараты, содержащие такой высокий уровень сахаров, могут выступать в качестве их доноров, способствуя гликозилированию мембран и подавлению процессов апоптоза в нейродегенеративных тканях, что будет тестируемо в последующих экспериментах.

Заклучение

Проведены некоторые физико-химические исследования спиртового экстракта корня переступня. В частности, определены белковые и углеводные составы данного экстракта. Кроме того, по осаждению хлор-

ной кислотой была оценена степень гликозилирования как в контрольных, так и меристемных препаратах. Во всех системах показано очень низкое содержание белка при высоком уровне углеводов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мкртчян Л.Н., Каралян Н.Ю., Казарян Г.С., Манукян А.Г. Гистопатология индуцированной мадопаром нейродегенерации и ее экспериментальная терапия. // Medicine science and education, 2017, October N23, pp. 3-11
2. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochemistry, 1976, V.72, N 1-2, 248-254
3. Ciechanover A., Kwon Y.T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. Experimental & Molecular Medicine, 2015 Mar 13; 47:e147
4. Dawson T.M., Dawson V.L. Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. Science, 2003, 302, 819-822
5. Forman M.S., Trojanowsij.Q., Lee V.M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. Nature Med., 2004, 10, pp. 1055-1063
6. Glass C.S., Saijo K., Winner B., Marchetto M.C., Gage F.H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. Cell, 2010, 140, 918-934
7. Joyce N., Annett G., Wirthlin L., Olson S., Bauer G., Nolte A. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. Regen. Med., 2010, 5, 933-946
8. Patel S., Santani D., Shah M., Patel V. Anti-hyperglycemic and Anti-hyperlipidemic effects of BryoniaLaeniosa Seed Extract and its Saponin Fraction in Streptozotocin-induced Diabetes in Rats. J. Young Pharm., 2012, 4, pp. 176
9. PrilorR.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. //Amer.S., Clin. Nutr., 2003, 78, pp. 5705-5785
10. SkovronskyD.M., Lee V.M., Trojanowsij.Q. Neurodegenerative Diseases: New Concepts of Pathogenesis and Their Therapeutic Implications. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2006, 1:151-70
11. Spiro R.G. Analysis of sugars found in glycoproteins. Meth.Enzymol., 1966, V. 8, 3-26
12. Sun A.Y. Resveratrol as a Therapeutic Agent for Neurodegenerative Diseases. Mol. Neurobiol., 2010, 41, 375-383
13. Yenkyan K., Aghajyanov M., Mkrtychyan L. The preventive action of embryonal proteoglycans in amyloid induced neurodegeneration. //Neurochemical Research, 2008, 33, p. 1157

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

ՆԵՅՐՈՂԵԳԵՆԵՐԱՑԻԱԶԻ ԲՈՒԺՄԱԸ ՕՊՏԻՄԱԼԱՑՄԱԸ ՈՂԴԻՆԵՐԻ ՈՐՈՆՈՒՄԸ

Մկրտչյան Լ.Ն.¹, Գասպարյան Վ.Կ.²

¹ ԵՊԲՀ, ախտաբանական ատոմիայի և մորֆոլոգիայի ամբիոն
² ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Բանալի բառեր` նեյրոդեգեներացիա, լոշտակ, մերիստեմա, ֆիզիկաքիմիական հատկություններ:

Սաղմնային հակաուռուցքային մոդուլատորի (ՍՀՈՒՄ) ստացման եղանակը կիրառվել է լոշտակի մերիստեմայից նմանատիպ պրեպարատ ստանալու համար: Ուսումնասիրվել

են պրեպարատի ֆիզիկաքիմիական որոշ հատկություններ, մասնավորապես սպիտակուցների և շաքարների բանակները, ինչպես նաև գլիկոզիլացման աստիճանը: Պրեպարատը պարունակում է մեծաքանակ շաքարներ սպիտակուցի քիչ բանակի դեպքում:

RESUME

SEARCH OF PATHWAYS OF OPTIMIZATION FOR THERAPY OF NEURODEGENERATION IN EXPERIMENTS

Mkrtychyan L.N.¹, Gasparyan V.K.²

¹ YSMU, Department of Pathological Anatomy and Morphology

² Institute of Biochemistry after H. Buniatyanyan, National Academy of Science, RA

Keywords: neurodegeneration, shingle, meristem, physic-chemical properties.

Methods applied for preparation of embryonic anti-tumor modulator (EATM) was used for preparation of similar prepa-

ration from meristem of bryony's root. Some physical-chemical properties in particular protein and carbohydrate content, rate of glycosylation were studied. The preparation contains significant amounts of carbohydrates and low amounts of protein.