

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 615:547.466.3:616.36+576.311.347

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-1-147-152

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГАМК И ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ
IN VITRO В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

Г.Х. Хусаинова, Т.А. Попова, М.В. Кустова, О.В. Островский

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Автор, ответственный за переписку: Гульнара Хамзаевна Хусаинова, Gulnarahusainova130@gmail.com

Аннотация. Целью исследования являлось изучение влияния производных ГАМК на функциональную активность интактных и поврежденных окислительным стрессом митохондрий. Изолированные митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования. Окислительное повреждение моделировали инкубированием с трет-бутилгидропероксидом (200 нмоль/мл, 10 минут). Исследуемые вещества (баклофен, мефебут, нейроглутам, соединение РГПУ-238, салифен, толибут, фенибут, фенотропил) добавляли к интактным и поврежденным митохондриям (1×10^{-5} М на 100 мкл, 10 минут инкубации), изучали функциональное состояние митохондрий полярографическим методом. Выявлено, что салифен и фенотропил оказывали выраженное защитное действие на дыхательные комплексы цепи переноса электронов.

Ключевые слова: производные ГАМК, производные глутаминовой кислоты, активные формы кислорода, дыхание митохондрий

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

**EFFECT OF GABA AND GLUTAMIC ACID DERIVATIVES
ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF LIVER CELL MITOCHONDRIA *IN VITRO*
UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS**

G.H. Khusainova, T.A. Popova, M.V. Kustova, O.V. Ostrovsky

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Corresponding author: Gulnara Kh. Khusainova, Gulnarahusainova130@gmail.com

Abstract. The aim of the study was to study the effect of GABA derivatives on the functional activity of intact and oxidative stress-damaged mitochondria. Isolated mitochondria were obtained by differential centrifugation. Oxidative damage was simulated by incubation with tert-Butylhydroperoxide (200 nmol/ml, 10 min). The studied substances (baclofen, mefebut, neuroglutam, RGPU-238 compound, salifen, tolibut, phenibut, phenotropil) were added to intact and damaged mitochondria (1×10^{-5} M per 100 μ l, 10 min of incubation), the functional state of mitochondria was studied using a polarographic method. It was revealed that salifen and phenotropil had a pronounced protective effect on the respiratory complexes of the electron transport chain.

Keywords: GABA derivatives, glutamic acid derivatives, reactive oxygen species, mitochondrial respiration

Согласно данным современных исследований в основе развития многих неинфекционных заболеваний, таких как нейродегенеративные, сердечно-сосудистые, эндокринные и другие, лежит тканевое повреждение, связанное с митохондриальной дисфункцией [1] и активацией свободно-радикальных реакций [2, 3].

В физиологических условиях свободно-радикальное окисление находится под контролем антиоксидантной системы, однако воздействие неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды способно сместить равновесие в сторону интенсификации окислительных процессов, что приводит к недостаточности антиоксидантной защиты и избыточному

производству активных форм кислорода (АФК), то есть к окислительному стрессу. Согласно литературным данным основным источником окислительного повреждения выступает митохондриальная цепь переноса электронов, при этом наибольшее количество АФК образуется в I комплексе [4].

Воздействие высоких концентраций АФК способно вызвать разобщение процессов окисления и фосфорилирования за счет уменьшения электрохимического градиента и снизить уровень синтеза АТФ в митохондриях, несмотря на ускорение движения электронов по дыхательной цепи и усиление катаболизма органических соединений [5]. Гипоэнергетическое состояние на фоне гиперметаболизма может индуцировать апоптоз или даже в некоторых случаях приводить к гибели клеток [6].

Таким образом, митохондрии могут выступать специфической мишенью для поиска фармакологических субстанций, способных нормализовать энергетический обмен и ограничивать производство свободных радикалов в клетках.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

В ранее проведенных исследованиях было установлено кардио- и нейропротекторное действие производных ГАМК [7, 8, 9]. Учитывая, что ведущую роль в патогенезе заболеваний сердца и мозга играет дисфункция митохондрий и окислительный стресс, представлялось целесообразным изучение влияния производных ГАМК на функциональную активность интактных и поврежденных окислительным стрессом митохондрий.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на 16 белых нелинейных крысах массой 250–300 г. После гильотинирования у крыс извлекали печень, промывали ее ледяным физиологическим раствором, измельчали ножницами и гомогенизировали на льду в стеклянном гомогенизаторе Поттера – Эльвейема с добавлением среды выделения, содержащей 220 мМ маннита, 100 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 4 мМ KH_2PO_4 , 20 мМ HEPES , $\text{pH} = 7,3$ в соотношении 1:5. Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре 4 °С (камера холодильная «КХС-2»). Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин с охлаждением (центрифуга «К-23», Германия) при 2000 г для осаждения клеточного дебриса и неразрушенных клеток. Отбирали надосадочную жидкость и вновь центрифугировали с охлаждением 20 мин при 8000 г. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 1 мл среды выделения, переносили в эппендорфы и использовали в качестве фракции митохондрий. Суспензию митохондрий хранили на холоде до окончания работы [10].

Выделенные митохондрии сначала были разделены на две группы: 1-я – интактные, инкубировали с 0,9%-м раствором NaCl в течение 10 мин; 2-я – поврежденные, инкубировали с окислителем – трет-бутилгидропероксидом (ГПТБ) в концентрации 200 нмоль/мл в течение 10 минут. Затем каждую группу разделили на 9 частей и добавляли исследуемые соединения в концентрации 1×10^{-5} М на 100 мкл митохондриальной фракции и инкубировали еще 10 мин на холоде. Таким образом, получилось 18 групп: 1-я – интактная; 2-я – контрольная (поврежденные); 3–10 – опытные группы – интактные митохондрии, инкубированные с баклофеном, мефебутом, нейроглутамом, соединением РГПУ-238, салифеном, толибутом, фенибутом, фенотропилом; 11–18 – опытные группы – поврежденные митохондрии, инкубированные с изучаемыми соединениями в том же порядке. Скорость поглощения кислорода определяли полярографическим методом (полярограф «Hansatech», Великобритания) и выражали в нмоль O_2 /мин/мг белка. Концентрацию белка определяли методом Лоури.

Полярографическую ячейку заполняли термостатированной при 33 °С, насыщенной кислородом средой полярографии, вносили суспензию митохондрий (100 мкл), в течение 40 с – 1 мин измеряли базальное дыхание митохондрий (V1 по Чансу). С помощью автоматической микропипетки в закрытую ячейку вносили субстраты I (10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата) и II комплексов (сукцинат 10 мМ), регистрировали скорость поглощения кислорода 40 с – 1 мин. Затем в ячейку вносили 2,5 мМ АДФ (для максимального стимулирования дыхания) и регистрировали поглощение кислорода в состоянии V3 по Чансу в течение 1–1,5 мин. После исчерпания АДФ регистрировали дыхание митохондрий в состоянии V4.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критериев Манна – Уитни, Стьюдента и Ньюмена – Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что некоторые исследуемые производные ГАМК и глутаминовой кислоты оказывали влияние на дыхательную функцию интактных митохондрий печени *in vitro*. Скорость АДФ-индуцированного дыхания при одновременном окислении малат/глутамата и сукцината в митохондриях, инкубированных с салифеном и фенотропилом, была на 23 % ($p < 0,05$) и 18 % ($p < 0,05$) больше, чем у интактной группы митохондрий (табл.). Баклофен, мефебут, нейроглутам, толибут, соединение РГПУ-238 и фенибут при инкубировании с интактными митохондриями незначительно снижали V3. Скорость потребления кислорода

в дыхательной цепи после истощения АДФ в митохондриях, инкубированных с салифеном, повышалась на 27 % ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. В других исследуемых группах достоверных отличий в показателе V4 не было выявлено.

Для оценки сопряженности процессов окисления и фосфорилирования был рассчитан коэффициент дыхательного контроля (ДК) как соотношение скоростей V3/V4. Данный параметр наиболее полно характеризует функциональное состояние митохондрий и отражает их способность производить АТФ в количестве, соответствующем энергетическим потребностям клеток.

Было установлено, что кратковременное воздействие фенотропила на интактные митохондрии клеток печени приводит к повышению ДК на 12 % ($p < 0,05$), салифен не влияет на данный показатель (табл.). При инкубировании митохондрий с остальными изучаемыми препаратами, наоборот, наблюдалось разобщение между дыханием и фосфорилированием. Под влиянием соединения РГПУ-238 и баклофена дыхательный контроль снижался на 26 % ($p < 0,05$) и на 20 % ($p < 0,05$) соответственно, в остальных исследуемых группах наблюдалось недостоверное снижение по сравнению с интактной группой.

Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на функциональную активность интактных митохондрий печени крыс

№	Группы	V3 нмоль O ₂ /мин/мг белка	V4 нмоль O ₂ /мин/мг белка	ДК (V3/V4)
1	Интактная	85,04 ± 7,13	28,43 ± 3,86	3,04 ± 0,43
2	Интактная + баклофен (%)	66,07 ± 10,8* (-22)	26,92 ± 3,49 (-5)	2,44 ± 0,16* (-20)
3	Интактная + мефебут (%)	79,43 ± 13,96 (-7)	29,50 ± 7,35 (± 4)	2,77 ± 0,52 (-9)
4	Интактная + нейроглутам (%)	76,48 ± 5,01* (-10)	29,99 ± 6,48 (± 6)	2,65 ± 0,58 (-13)
5	Интактная + РГПУ-238 (%)	64,17 ± 11,8* (-25)	28,83 ± 5,80 (± 2)	2,25 ± 0,32* (-26)
6	Интактная + салифен (%)	104,87 ± 26,60 (± 23)	36,02 ± 13,0* (± 27)	3,09 ± 0,70 (± 2)
7	Интактная + толибут (%)	76,07 ± 11,37 (-11)	28,39 ± 4,38 (-1)	2,72 ± 0,49 (-11)
8	Интактная + фенибут (%)	79,98 ± 9,04 (-6)	31,45 ± 4,63 (± 11)	2,58 ± 0,22 (-15)
9	Интактная + фенотропил (%)	100,38 ± 9,6* (± 18)	30,76 ± 7,98 (± 8)	3,41 ± 0,2* (± 12)

*Изменения статистически значимы относительно аналогичных показателей интактной группы (критерий Манна – Уитни, $p < 0,05$).

Кратковременное воздействие ГПТБ на митохондрии приводило к снижению скорости АДФ-индуцированного потребления кислорода на 28 % ($p < 0,05$) по сравнению с показателями интактной группы (рис. 1). Салифен повышал V3 поврежденных митохондрий на 54 % ($p < 0,05$), фенотропил – на 43 % ($p < 0,05$), мефебут – на 29 % ($p < 0,05$), нейроглутам на 26 % ($p < 0,05$), толибут – на 22 % ($p < 0,05$), фенибут – на 21 % ($p < 0,05$) относительно митохондрий клеток печени животных контрольной группы. Соединение РГПУ-238 и баклофен не оказывали значительного влияния на данный показатель.

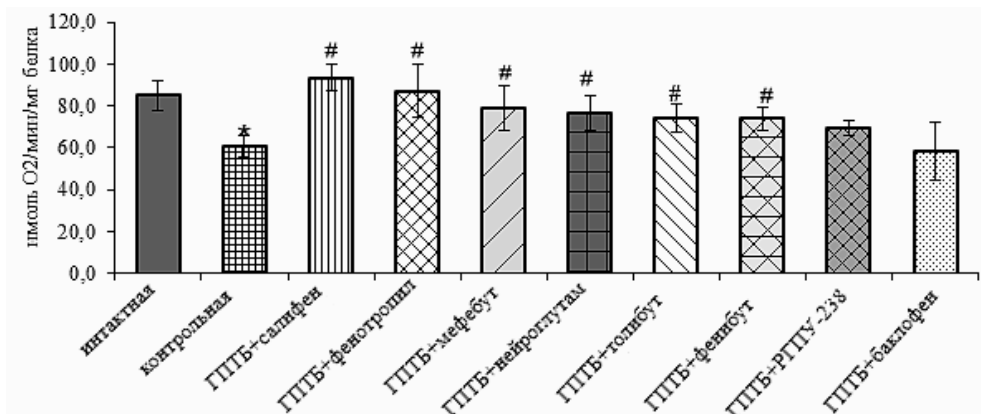
Скорость потребления кислорода в контрольной группе, поврежденной ГПТБ, в состоянии V4 была

на 35 % ($p < 0,05$) выше, чем у интактной, что может указывать на утечку электронов в дыхательной цепи (рис. 2). При этом под влиянием изучаемых соединений наблюдалось снижение данного показателя, наиболее выраженное для фенотропила.

Показатель ДК в митохондриях контрольной группы был на 48 % ($p < 0,05$) ниже, чем в интактных митохондриях, что подтверждает повреждающее действие ГПТБ (рис. 3). Инкубирование митохондрий, поврежденных трет-бутилгидропероксидом, с исследуемыми соединениями способствовало усилению сопряжения процессов окисления и фосфорилирования, что выражалось увеличением коэффициента ДК относительно контрольной группы. Так, фенотропил

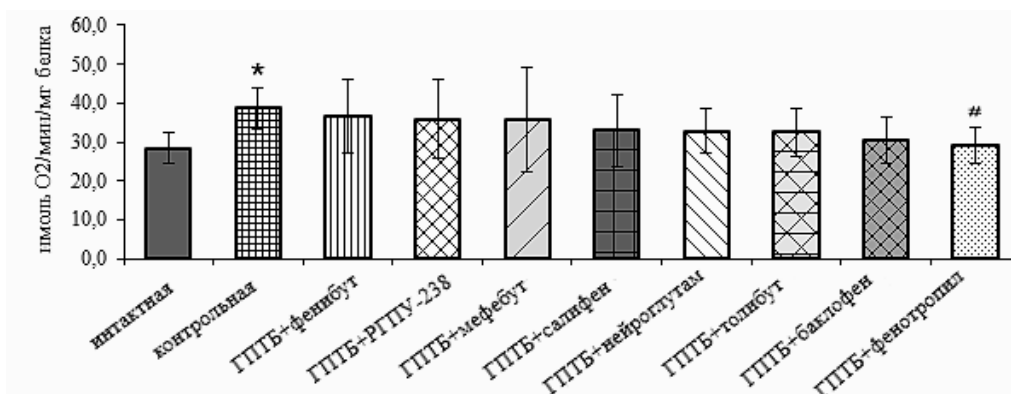
повышал ДК на 90 % ($p < 0,05$), салифен – на 86 % ($p < 0,05$), мефебут – на 48 % ($p < 0,05$), толибут – на 47 % ($p < 0,05$), нейроглутам – на 47 % ($p < 0,05$),

фенибут – на 33 % ($p < 0,05$), соединение РГПУ-238 – на 26 % ($p < 0,05$), баклофен – на 23 % ($p < 0,05$) относительно показателей контрольной группы (рис. 3).



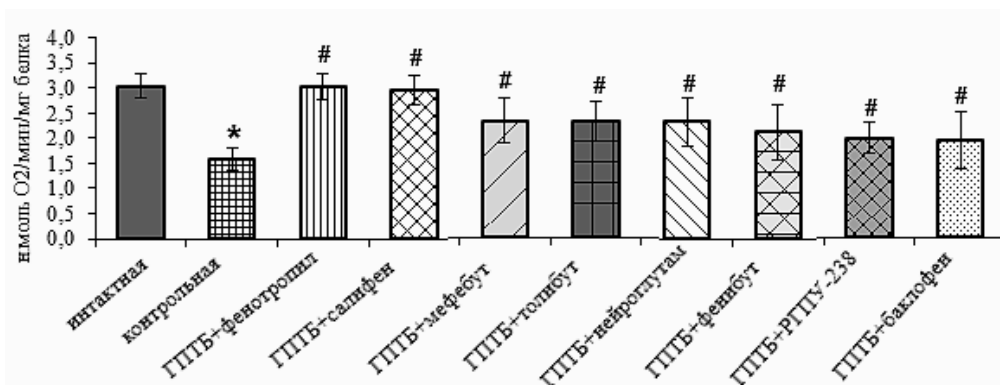
Изменения статистически значимы относительно аналогичных показателей: *интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #контрольной группы (критерий Ньюмена – Кейлса, $p < 0,05$).

Рис. 1. Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость стимулированного дыхания (V_3 по Чансу) митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ



Изменения статистически значимы относительно аналогичных показателей: *интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #контрольной группы (критерий Ньюмена – Кейлса, $p < 0,05$).

Рис. 2. Влияние производных ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость дыхания (V_4 по Чансу) митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ, после исчерпания добавленной АДФ



Изменения статистически значимы относительно аналогичных показателей: *интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); #контрольной группы (критерий Ньюмена – Кейлса, $p < 0,05$).

Рис. 3. Показатель ДК митохондрий клеток печени, инкубированных с ГПТБ и производными ГАМК и глутаминовой кислоты

В настоящее время терапевтические эффекты препаратов, созданных на основе ГАМК и глутаминовой кислоты, объясняют рядом механизмов, а именно – ограничением образования АФК, ингибированием митохондриального пути апоптоза, повышением энергопродукции, изменением транспорта ионов, влиянием на продукцию NO и на активность антиоксидантных ферментов [9].

На основании данных проведенного нами исследования о влиянии препаратов ГАМК и глутаминовой кислоты на скорость поглощения кислорода митохондриями в различных состояниях по Чансу можем сделать следующие предположения о воздействии изученных препаратов на митохондрии.

Фенибут(4-амино-3-фенил-бутановая кислота) оказывал небольшое разобщающее влияние на интактные митохондрии, наиболее выраженное для I комплекса ЦПЭ. При инкубировании с поврежденными митохондриями он увеличивал V3 и, как следствие, показатель ДК по сравнению с таковым контрольной группы. Таким образом, действие фенибута можно связать с ограничением повреждающего действия АФК на структуру дыхательной цепи. Его аналоги мефебут (метилвый эфир фенибута) и толибут (4-амино-3-метилфенил-бутановая кислота) практически не оказывали влияния на интактные митохондрии. Воздействие их на поврежденные митохондрии способствовало увеличению скорости стимулированного дыхания и ДК, что свидетельствует об ограничении повреждающего действия ГПТБ.

Еще одно производное фенибута – баклофен (4-амино-3-(парахлорфенил)-бутановая кислота) – оказывал существенное разобщающее действие на интактные митохондрии, при этом инкубация данного препарата с поврежденными митохондриями ограничивала разобщение за счет работы 2-го комплекса дыхательной цепи. Возможно, изучаемый препарат сам вызывает небольшой оксидантный эффект или повреждение 1-го комплекса, в результате вклад 2-го комплекса в передачу электронов увеличивается, что в целом позволяет митохондриям поддерживать нормальную энергопродукцию.

Добавление нейроглутама (гидрохлорида бета-фенилглутаминовой кислоты) к интактным митохондриям приводило к небольшому снижению скорости потребления кислорода и ДК, однако инкубирование с поврежденными митохондриями вызывало противоположный эффект. Можно предположить, что нейроглутам способен перехватывать электроны в дыхательной цепи, что при окислительном повреждении ограничивает их «утечку». Соединение РГПУ-238

(гидрохлорид диметил-3-фенилглутаминовой кислоты) оказывало незначительное влияние на митохондрии *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наибольшие значения показателя ДК наблюдались при добавлении салифена (композиция фенибута с салициловой кислотой) и фенотропила (N-карбамоилметил-4-фенил-2-пирролидон) как к интактным, так и к поврежденным митохондриям. Происходило увеличение скорости поглощения кислорода в состоянии V3 и снижение в состоянии V4, что свидетельствует о повышении сопряжения в дыхательной цепи. Таким образом, салифен и фенотропил оказывали выраженное защитное действие на дыхательные комплексы ЦПЭ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases // *Molecules*. 2019. No. 8 (24). P. 1583.
2. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release // *Physiological reviews*. 2014. No. 3 (94). P. 909–950.
3. Коррекция дисфункции митохондрий ГАМК-ергическими средствами / В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков, О.В. Островский [и др.] // *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2010. № 3 (27) С. 21–23.
4. Lanza I.R., Nair K.S. Functional assessment of isolated mitochondria *in vitro* // *Methods in enzymology*. 2009. Vol. 457. P. 349–372.
5. Ngo D.H., Vo T.S. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid // *Molecules*. 2019. No. 15 (24). P. 2678.
6. Mitochondria and reactive oxygen species in aging and age-related diseases / C. Giorgi, S. Marchi, I.C. Simoes [et al.] // *International review of cell and molecular biology*. 2018. Vol. 340. P. 209–344.
7. In vivo real-time dynamics of ATP and ROS production in axonal mitochondria show decoupling in mouse models of peripheral neuropathies / G. van Hameren, G. Campbell, M. Deck [et al.] // *Actaneuropathologica communications*. 2019. No. 1 (7). P. 1–16.
8. Lindblom R., Higgins G., Coughlan M., de Haan J.B. Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy // *The review of diabetic studies: RDS*. 2015. No. 1-2 (12). P. 134–156.
9. Fernández-Moriano C., González-Burgos E., Gómez-Serranillos M.P. Mitochondria-targeted protective compounds in Parkinson's and Alzheimer's diseases // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015. Vol. 2015. P. 30.
10. Oxidative Stress-Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives / E.A. Ermakov, E.M. Dmitrieva, D.A. Parshukova [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021. Vol. 2021. P. 37.

REFERENCES

1. Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2019;8(24):1583.
2. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*. 2014;3(94):909–950.
3. Perfilova V.N., Tyurenkov I.N., Ostrovsky O.V., Popova T.A., Mokrousov I.S., Shubnikova E.V. Mitochondrial dysfunction correction with GABAagents. *Volgogradskij nauchno-medicinskij zhurnal = Volgograd Journal of Medical Research*. 2010;3(27):21–23.(InRuss.).
4. Lanza I.R., Nair K.S. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods in enzymology*. 2009;457:349–372.
5. Ngo D.H., Vo T.S. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid. *Molecules*. 2019; 15(24):2678.
6. Giorgi C., Marchi S., Simoes I.C. et al. Mitochondria and reactive oxygen species in aging and age-related diseases. *International review of cell and molecular biology*. 2018; 340:209–344.
7. van Hameren G., Campbell G., Deck M. et al. In vivo real-time dynamics of ATP and ROS production in axonal mitochondria show decoupling in mouse models of peripheral neuropathies. *Actaneuropathologica communications*. 2019; 1(7):1–16.
8. Lindblom R., Higgins G., Coughlan M., de Haan J.B. Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy. *The review of diabetic studies: RDS*. 2015;1-2(12):134–156.
9. Fernández-Moriano C., González-Burgos E., Gómez-Serranillos M.P. Mitochondria-targeted protective compounds in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015:30.
10. Ermakov E.A., Dmitrieva E.M., Parshukova D.A. et al. Oxidative Stress-Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:37.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

Гульнара Хамзаевна Хусаинова – аспирант кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия;

Тамара Александровна Попова – кандидат биологических наук, доцент кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, томаропова457@gmail.com

Мargarita Валерьевна Кустова – ассистент кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, kustova13@gmail.com

Олег Владимирович Островский – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, ol.ostr@gmail.com

Статья поступила в редакцию 09.09.2021; одобрена после рецензирования 30.09.2021; принята к публикации 11.10.2021.

The authors declare no conflicts of interests.

Information about the authors

Gulnara Kh. Khusainova – Postgraduate student of the Department of Theoretical Biochemistry with a course in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia;

Tamara A. Popova – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Theoretical Biochemistry with a course in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, томаропова457@gmail.com

Margarita V. Kustova – Assistant of the Department of Theoretical Biochemistry with a course in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, kustova13@gmail.com

Oleg V. Ostrovsky – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Theoretical Biochemistry with a course in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, ol.ostr@gmail.com

The article was submitted 09.09.2021; approved after reviewing 30.09.2021; accepted for publication 11.10.2021.