

УДК 616. 831 – 005.4– 085: 615. 272

© Коллектив авторов, 2012.

## МИТОХОНДРИОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ СУКЦИНАТА И ТИАМИНА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

\*Н.Е. Максимович<sup>1</sup>, И. К. Дремза<sup>1,2</sup>, Э.И. Троян<sup>1</sup>, Е.Н. Максимович<sup>1</sup>*Кафедра патофизиологии УО «ГрГМУ»<sup>1</sup>, ИФБ НАНРБ<sup>2</sup>, Гродно, Беларусь.*

### MITOKHONDRIOTROPIC EFFECTS OF SUCCINATE AND THIAMINE WITH THE BRAIN ISCHEMIA- REPERFUSION

N.E. Maksimovich, I.K. Dremza, E.I. Trojan, E.N. Maksimovich

#### SUMMARY

The results of experimental researches of respiratory function of the mitochondrions at the design of ischemia- reperfusion of brain on white laboratory rats testify to the considerable oppressing aerobic respiratory activity of brain of rats and disconnect of processes of oxidization and phosphorylation in the mitochondrions at the ischemia- reperfusion of brain. During a reperfusion period free-radical processes damage develops as a result of that are activated, both enzymes of Krebs cycle and complexes of the chain of the electronic transport of the mitochondrions, that shows up in reduction of activity of oxygen dependent mechanisms of the energy-formation. The detection of the protector effect of succinate of sodium and thiamine to the parameters of the respiratory activity of mitochondria allows the use of this combination of the medicine for the purpose of correction the damage of brain, caused by its ischemia- reperfusion.

### МИТОХОНДРИОТРОПНІ ЕФЕКТИ СУКЦИНАТУ І ТІАМІНУ ПРИ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, Е.І. Троян, Е.Н. Максимович

#### РЕЗЮМЕ

Результати проведених експериментальних досліджень дихальної функції мітохондрій при моделюванні ішемії/реперфузії головного мозку на білих лабораторних щурах свідчать про значне пригнічення аеробній респіраторній активності головного мозку щурів і відокремленні процесів окислення і фосфорилювання в мітохондріях при ішемії/реперфузії головного мозку. Впродовж реперфузійного періоду активуються вільнорадикальні процеси, в результаті яких розвивається ушкодження, як ферментів циклу Кребса, так і комплексів електронтранспортного ланцюга мітохондрій, що проявляється в зменшенні активності кисневозалежних механізмів енергоутворення. Виявлення протекторного ефекту сукцинату натрію і тіаміну на параметри респіраторної активності мітохондрій дозволяє використання цього поєднання препаратів з метою корекції ушкодження головного мозку, викликаних його ішемією-реперфузією.

**Ключевые слова:** ишемия-реперфузия головного мозга, свободнорадикальное окисление, сукцинат, тиамин.

В коррекции ишемии головного мозга одним из важнейших направлений является восстановление кровотока [1]. Однако, реперфузия головного мозга после ишемии не приводит к полному устранению ее последствий вследствие пролонгирования механизмов патобиохимического каскада, имеющего место при ишемии, а также повреждения дополнительными факторами альтерации, обусловленными гипероксигенацией тканей при восстановлении кровотока [2].

Патобиохимический каскад повреждений при ишемии включает анаэробный путь расщепления глюкозы, дефицит энергии, нейротрансмиттерный дисбаланс (избыток глутамата, аспартата, дефицит ГАМК), эксайтотоксическое повреждение (активация глутамат-кальциевого каскада), окислительный стресс, нитрозативный стресс, воспаление, отек, апоптоз.

На начальных этапах энергетический дефицит приводит к ионному дисбалансу, ацидозу, способствует повреждению рецепторного аппарата клеток, нарушению генерации биопотенциалов, инактивация ферментов (антиоксидантной природы), снижению биосинтетических процессов. На поздних

стадиях реперфузии возникают структурные нарушения (дезорганизация клеточных мембран), происходит высвобождение лизосомальных ферментов, возникает избыток  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ , происходит интоксикация продуктами распада тканей.

С целью разработки патогенетической коррекции актуальным, на наш взгляд, является изучение респираторной функции митохондрий в условиях реперфузионного синдрома, а также выяснение механизмов развития возможных нарушений [3]. В этом направлении предполагается целесообразным исследование эффектов сукцината натрия [4] и тиамин [4,5].

Сукцинат (янтарная кислота), как энергодающий субстрат цикла Кребса способен не только поддерживать высокую скорость дыхания в сравнении с НАД-зависимыми субстратами, но и сохранять функциональные способности митохондрий в стрессовых ситуациях, являясь энергорегулирующим субстратом.

Тиамин пирофосфат выполняет функцию простетической группы декарбоксилаз, играющих важную роль в межклеточном обмене углеводов.

Кофермент пируватдегидрогеназа осуществляет окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, превращающее ее в ацетил-КоА. Другая коферментная форма витамина  $V_1$  входит в состав фермента транскетолазы, участвующей в пентозофосфатном пути расщепления углеводов, одним из конечных продуктов которого является рибоза, необходимая для синтеза нуклеиновых кислот.

Цель работы – изучить динамику изменений респираторной функции митохондрий и параметров углеводного обмена в ткани головного мозга в условиях ишемии-реперфузии и введения сукцината натрия и тиамина.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведены исследования дыхательной функции митохондрий при моделировании ишемии/реперфузии головного мозга (ИРГМ). Эксперименты выполнены на белых лабораторных крысах массой 200-250 г, которые находились на стандартном рационе вивария.

Проведены три группы исследований на 30 крысах. Первую группу ( $n=10$ ) контроль составили интактные ложноперированные животные. Вторую группу составили животные опытной группы с ИРГМ,  $n=12$ . Ишемию-реперфузию головного мозга моделировали путем наложения и последующего снятия сосудистых зажимов на общие сонные артерии в условиях наркоза (в/в тиопентал натрия, 50-60 мг/кг массы тела). Исследования проведены через 1 час после восстановления кровотока. Третью группу составили животные с ИРГМ, которым за час до моделирования ишемии головного мозга внутримышечно вводили сукцинат натрия (100 мг/кг) и тиамин (25 мг/кг),  $n=8$ .

Исследования проведены на головном мозге, извлеченном из черепной коробки на холоду (0-4°С) после декапитации крыс. Изучали дыхание митохондрий головного мозга, осуществляли оценку состояния углеводного обмена (содержание лактата).

Для исследования респираторной функции митохондрий головной мозг после осушения фильтровальной бумагой и взвешивания помещали в ледяную среду выделения (0,32 М сахарозы, 10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, рН 7,4, объем 50 мл), немедленно гомогенизировали (при 0°С) в среде выделения (в соотношении 1:10), используя гомогенизатор Поттера-Эвельгейма с тефлоновым пестиком согласно модифицированному классическому методу Lai и Clark (1964) [6].

Выделенные митохондрии ресуспендировали в 1,2 мл среды выделения и хранили в короткой пробирке на льду. Инкубационная среда для дыхания митохондрий включала 0,017 М сахарозу, 40 mM KCl, 10 mM Трис-НСl, 5 mM  $KH_2PO_4$ , 8 mM  $KHCO_3$ , 0,1 mM ЭДТА, рН 7,4. Скорость митохондриального дыхания

регистрировали полярографически, используя платиново-серебряный электрод Кларка, встроенный в термостатируемую герметическую ячейку объемом 1,75 мл, при 26,5-35°С.

Регистрация изменений напряжения кислорода ( $pO_2$ ) в суспензии митохондрий осуществлялась с помощью электронного регистратора.

Калибровку электрода Кларка проводили путем последовательного продувания через ячейку воздуха ( $pO_2$  воздуха) и газообразного азота ( $pO_2 = 0$  мм рт. ст.). Активацию скорости дыхания осуществляли введением субстратов дыхания (сукцинат – 5 mM, L-малат/L-глутамат – 2/5 mM, соответственно) и АДФ (200 mM) через специальные каналы.

По полученным полярограммам рассчитывали скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях:  $V_1$  – скорость эндогенного (базального) дыхания,  $V_2$  – скорость субстрат-зависимого дыхания,  $V_3$  – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием (после внесения АДФ),  $V_4$  – скорость дыхания после расходования внесенного АДФ. Определяли показатели, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: коэффициент акцепторного контроля ( $AK=V_3/V_2$ ), коэффициент дыхательного контроля ( $DK=V_3/V_4$ ) и коэффициент фосфорилирования АДФ/О.

Исследование концентрации лактата и пирувата осуществляли в 20%-х хлорнокислых гомогенатах головного мозга по образованию восстановленной или окисленной формы НАД спектрофотометрически при длине волны 340 нм на спектрофотометре «Specord UV-VIS».

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы «Statistica 6,0» после проверки на нормальность непараметрическими методами с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В группе животных, подвергнутых ИРГМ, отмечено значительное снижение многих параметров дыхания митохондрий относительно показателей группы ложноперированных крыс. При внесении в качестве субстрата дыхания сукцината, отмечено снижение скорости АДФ-стимулированного дыхания ( $V_2$ ) на 24,6 % ( $p < 0,05$ ), коэффициента акцепторного контроля ( $V_3/V_2$ ) – на 21,8% ( $p < 0,01$ ), коэффициента дыхательного контроля – на 29,1% ( $p < 0,01$ ), коэффициента фосфорилирования – в 5 раз. Не было отмечено изменений скорости субстрат-индуцированного дыхания ( $V_2$ ) и скорости дыхания в условиях потребления экзогенного АДФ ( $V_4$ ) ( $p > 0,05$ ).

Аналогичные закономерности в изменении параметров респираторной активности наблюдались

в случае использования в качестве НАД-зависимых субстратов смеси малат/глутамат:  $V_3$  снизилась на 16% ( $p < 0,05$ ), коэффициенты  $V_3/V_2$  – на 15,8% ( $p < 0,01$ ),  $V_3/V_4$  – на 19,1% ( $p < 0,01$ ), АДФ/О – в 3,2 раза относительно группы ложноперирированных животных. Полученные результаты свидетельствуют о значительном угнетении аэробной респираторной активности головного мозга крыс и разобщении процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях при ИРГМ в условиях использования в качестве стимуляторов обоих субстратов.

В течение 1-часовой ишемии головном мозге и последующего реперфузионного периода развиваются существенные нарушения тканевого дыхания, проявляющиеся в уменьшении активности кислородзависимых механизмов и компенсаторной активации анаэробных механизмов энергообразования. Нарушение функционирования комплекса I в условиях недостатка кислорода приводит к снижению окисления НАДН, торможению цикла Кребса и накоплению в этих условиях глутамата, повышению активности глутамат-кальциевого каскада и развитию глутаматной эксайтотоксичности как одного из центральных патогенетических механизмов ишемического повреждения мозга.

Предварительное однократное введение сукцината натрия и тиамин животным за 1 час до моделирования ИРГМ, выявило менее выраженное снижение АДФ/О, а  $V_3$  и коэффициенты  $V_3/V_2$  и  $V_3/V_4$  практически приближались или несколько превышали уровень контрольных животных при использовании сукцината в качестве субстрата.

С помощью ферментативных методов установлены средние концентрации лактата в мозге интактных животных ( $1,25 \pm 0,15$  мМ на 1 г сырой массы ткани). Об активации анаэробных гликолитических процессов в условиях ИРГМ свидетельствовало резкое возрастание содержания лактата (почти в 2,3 раза) в гомогенатах мозга ( $p < 0,001$ ) спустя 1 час реперфузии. В условиях гипоксии, вероятно, повышается скорость поглощения пирувата и превращения его в молочную кислоту, что подтверждается полученными данными. Очевидно, что в течение реперфузионного периода развивается повреждение как ферментов цикла Кребса, так и комплексов электронтранспортной цепи митохондрий, что в конечном итоге приводит к снижению включения пирувата в аэробный энергообмен митохондриями и активации его превращения в лактат.

Значительное нарастание концентраций лактата вызывает снижение рН, оказывая непосредственное цитотоксическое действие, вызывая «разрыхление» клеточных мембран, изменяя их физико-химические свойства, способствуя повышению проницаемости нейронов и эндотелия сосудов, и, кроме того,

усугубляя энергетические нарушения, глутаматную «эксайтотоксичность», изменяя регуляторные свойства вторичных мессенджеров и т. д. Комплексное повреждающее действие ацидоза является важным компонентом разворачивающихся процессов острой церебральной ишемии и развития инфаркта мозга.

Концентрация лактата в мозге крыс, получавших вводимые вещества, снизилась на 34%, по сравнению с животными с ИРГМ, его не получавшими, оставаясь повышенной, по сравнению с таковым у ложноперирированных животных контрольной группы.

Итак, полученные результаты свидетельствуют о значительном угнетении аэробной респираторной активности головного мозга крыс и разобщении процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях при ИРГМ. Возникающий энергетический дефицит на начальных этапах приводит к ионному дисбалансу, ацидозу, способствует повреждению рецепторного аппарата клеток, нарушению генерации биопотенциалов, инактивации ферментов антиоксидантной природы, способствует снижению биосинтетических процессов. В последующем возникают структурные нарушения (дезорганизация клеточных мембран), происходит высвобождение лизосомальных ферментов, возникает избыток  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ , интоксикация продуктами распада тканей.

#### ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о значительном угнетении аэробной респираторной активности головного мозга крыс и разобщении процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях при ИРГМ. В течение реперфузионного периода активируются свободнорадикальные процессы, в результате которых развивается повреждение, как ферментов цикла Кребса, так и комплексов электронтранспортной цепи митохондрий, что проявляется в уменьшении активности кислородзависимых механизмов энергообразования.

Анализ полученных результатов по исследованию эффектов сукцината и тиамин у крыс с ИРГМ выявил наличие корригирующих митохондриотропных эффектов в головном мозге.

Выявление протекторного эффекта сукцината натрия и тиамин на параметры респираторной активности митохондрий позволяет использование данного сочетания препаратов с целью коррекции повреждения головного мозга, вызванных его ишемией-реперфузией.

*Работа выполнена при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) № Б11ОБ-122 от 15 апреля 2011.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Виленский, Б.С. Современная тактика борьбы с инсультом / Б.С. Виленский. - спб.: ООО "Издательство ФОЛИАНТ". – 2005. – 288 с.
2. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М.В. Биленко. – М.: Медицина, 1989. - 368 с.
3. Дремза И.К., Лапшина Е.А., Чешевик В.Т., Заводник И.Б. Некоторые методические подходы к исследованию митохондрий / Современные проблемы биохимии: учебное пособие; под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина. – Витебск, Изд-во «УО ВГУ им. П.М. Машерова». – 2010. – С. 123-135.
4. Бородинский А.Н., Дремза И.К., Коноваленко О.В., Бородинская В.В. Влияние композиции L-аргинина, L-глутамина и сукцината на метаболизм углеводов в динамике алкогольного абстинентного синдрома. Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии: материалы респ. Конф. С междунар. Участием, Гродно, 14 мая 2010 г. / Гродн. Гос. Мед. Ун-т: Изд-во гррму, отв. Ред. Н.Е. Максимович. – 2010. – С. 272 – 277.
5. Бородинский А.Н., Дремза И.К. Антиоксидантные эффекты тиамин в печени крыс при низкоинтенсивном лазерном воздействии. Весці НАН Беларусі, серыя медыцынскіх навук. – 2010. – № 2, С. 36 – 39.
6. Lai, J. C. K., Clark J. B. Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain // Methods in Enzymology. – 1974. – Vol. 60. – P. 51–64.