

УДК 616.831: 616.153.455.04  
©Иванова, Стунжас

## **ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОМ СУДОРОЖНОМ СИНДРОМЕ И РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ЕГО КУПИРОВАНИЯ**

*А.В. Иванова\*, Н.М. Стунжас*

Смоленская государственная медицинская академия, кафедра биоорганической  
и биологической химии, 214019, Россия, г. Смоленск, ул. Крупской, 28;  
тел.: 8(905)162-61-83; эл. почта: anna.ivanova81@gmail.com

Полярнографическим методом изучены дыхательные и фосфорилирующие характеристики митохондрий мозга животных при инсулиновом шоке и в различные сроки после его купирования глюкозой, либо введением глутамата натрия в сочетании с вдыханием гиперкапнической воздушной газовой смеси (воздух +7% CO<sub>2</sub>). Выявлены определенные различия в купирующих эффектах примененных средств. Установлено, что даже спустя сутки после обоих способов купирования судорожного состояния фосфорилирующая способность митохондрий не нормализуется и ряд параметров, характеризующих их дыхание, позволяет говорить о неблагоприятных изменениях в работе их электрон-транспортных систем преимущественно на уровне первого дыхательного комплекса.

**Ключевые слова:** гипогликемия, головной мозг, окислительное фосфорилирование.

**ВВЕДЕНИЕ.** Проблема поражения головного мозга при тяжёлых гипогликемических состояниях остается актуальной, не смотря на огромное количество исследований. Как известно, при снижении концентрации глюкозы в крови меньше 1 mM наступает состояние гипогликемической комы, которое характеризуется утратой постуральных рефлексов, исчезновением ЭЭГ активности, энергетической недостаточностью ткани и деполяризацией мембран клеток вследствие потери ими ионов калия. Все это неизбежно ведёт к повреждению нейронов.

---

\* - адресат для переписки

При гипогликемии потребление мозгом кислорода не уменьшается в той же степени, с какой падает потребление глюкозы. Это говорит о вовлечении в катаболический процесс других эндогенных субстратов: метаболитов гликолиза, цикла Кребса, аминокислот и даже таких структурных компонентов, как фосфолипиды [1]. Многочисленными работами 70–80 гг прошлого столетия доказано, что тяжелая гипогликемия приводит к снижению в ткани мозга содержания целого ряда аминокислот: глутамата, глутамина, аланина, ГАМК при параллельном возрастании в клетках уровня аспартата и аммиака.

Особенно значимым для поддержания энергетического статуса мозга в условиях дефицита глюкозы является вовлечение в катаболизм глутамина и глутаминовой кислоты, на долю которых приходится более 40% от общего содержания свободных аминокислот в нервной ткани [2]. В ходе метаболической трансформации эти аминокислоты превращаются в  $\alpha$ -кетоглутарат, который затем поступает в цикл Кребса [3]. Это позволяет достаточно длительно обеспечивать дыхательные цепи митохондрий восстановленными эквивалентами вплоть до полного, или почти полного исчерпания общего клеточного пула глутаминовой кислоты и её амида.

При решении проблемы аммиачной интоксикации развивающейся при гипогликемическом шоке, еще в 1960 г. [4] был предложен способ его купирования не глюкозой, а введением глутамата натрия в сочетании с последующим вдыханием воздуха с добавлением к нему 7–8% углекислого газа, что позволяло вывести животное из состояния шока без подъема уровня глюкозы в крови. Предложенный способ вскоре был успешно апробирован в клинической практике [5], однако в дальнейшем не привлек к себе должного внимания исследователей.

К настоящему времени установлен ряд новых научных фактов, которые делают актуальным углубленное изучение механизма купирующего гипогликемический шок эффекта  $\text{CO}_2$  при его совместном применении с глутаминовой кислотой. Так, в частности, было показано, что гиперкапническое состояние, вызванное вдыханием газовой смеси с 7–8%  $\text{CO}_2$  способствует в значительной мере поддержанию энергетического статуса мозга животных, находящихся в гипогликемической коме [6]. Исследованиями Когана и соавт. [7] было убедительно показано, что углекислый газ обладает мощным ингибирующим влиянием на генерацию активных форм кислорода как при прямом воздействии на клетки различных органов и систем, так и при воздействии на целостный организм. Предварительное вдыхание животными газовой смеси с 7–8%  $\text{CO}_2$  в течение 50 минут подавляло способность выделенных из мозга митохондрий к генерации супероксидного анион-радикала почти в 2 раза. Такие митохондрии обладали более высокой фосфорилирующей способностью, что проявлялось не только в возрастании скорости фосфорилирования добавки ADP, но и в увеличении степени сопряжения окисления и фосфорилирования.

Считается, что митохондрии мозга относительно резистентны к гипогликемии [8]. Однако, ухудшение энергетического статуса мозга при сохранении достаточно высокого уровня потребления кислорода позволяют говорить о возможных нарушениях в механизме окислительного фосфорилирования. Тем более, что имеются данные об интенсификации свободно-радикальных процессов в условиях гипогликемии [9].

В связи с вышеизложенным целью исследования было изучение дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий ткани мозга при гипогликемическом судорожном состоянии, а также в различные сроки восстановительного периода после его купирования как введением глюкозы, так и глутаматом натрия с последующим вдыханием воздуха в смеси с углекислым газом.

**МЕТОДИКА.** Исследования проведены на 48 белых беспородных крысах обоего пола массой 150–220 г. Все экспериментальные животные, содержавшиеся в обычных условиях вивария, были разделены на 6 групп: 1 группа – интактные

животные (контроль); 2 группа животные с выраженным судорожным состоянием, вызванным подкожным введением инсулина (40 ед/ кг массы тела, после 14 часового голодания); 3 группа – животные через 1 час после купирования шока подкожным введением глюкозы в дозе 2 г/кг массы тела, либо спустя сутки (4 группа); 5 группа – животные спустя 1 час после купирования шока подкожным введением глутамата натрия (0,5 г/кг массы тела) в сочетании с одночасовым вдыханием гиперкапнической газовой смеси (воздух + 7% CO<sub>2</sub>), либо спустя сутки после такого купирующего эффекта (6 группа животных). Выведенные из шокового состояния животные 4 и 6 групп в течение суток имели свободный доступ к воде и пище.

Забой всех животных проводили путём одномоментной декапитации с параллельным определением уровня глюкозы в крови. Было отмечено, что на высоте судорожного состояния уровень глюкозы в крови крыс составлял менее 1 ммоль/л. При купировании шока введением глюкозы ее уровень в крови при забое животных не отличался от нормы в отличие от купирующего эффекта глутамата и углекислого газа, при котором уровень глюкозы так и оставался ниже 1 ммоль/л вплоть до кормления.

Экспериментальная часть работы была выполнена по стандартной методике [10]. Митохондрии выделяли дифференциальным центрифугированием из гомогената ткани головного мозга (за исключением мозжечка). Гомогенат мозга подвергали дополнительному центрифугированию в рефрижераторной центрифуге ЦПП-1 при 800 g (температурный интервал от –3 до 0°C, 10 мин). Супернатант подвергали центрифугированию в течении 10 мин при 12000 g. Осаждённые митохондрии промывали средой выделения и после повторного их осаждения центрифугированием (10 мин при 12000 g) ресуспендировали в среде выделения. Среда выделения содержала 0,25 М сахарозу, 0,01 М трис-HCl, 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,4. Дыхание митохондрий регистрировали полярографически с помощью закрытого электрода Кларка в среде, содержащей 178 мМ сахарозу, 0,4 мМ ЭДТА, 5 мМ KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> 0,01 М трис-HCl и 20 мМ KCl (pH 7,4). Субстратами дыхания служили сукцинат и глутамат, концентрация глутамата и сукцината 3 мМ (конечная концентрация в ячейке электрода объёмом 1,2 мл).

Были изучены следующие характеристики: исходное дыхание митохондрий в присутствие субстрата ( $V_0$ ), скорость дыхания, стимулируемая ADP ( $V_3$ ), скорость дыхания после истощения введенного ADP ( $V_4$ ), скорость дыхания под разобщающим действием ионофора – динитрофенола ( $V_{\text{ai0}}$ ). Скорости дыхания выражали в нг/атомах O<sub>2</sub> за 1 минуту дыхания митохондрий. Рассчитывали такие параметры как скорость фосфорилирования добавки ADP/ $\Delta t$ , дыхательные контроли по Ларди и Чансу (ДКл и ДКч), и степень сопряжения дыхания и фосфорилирования P/O. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Митохондрии, выделенные из мозга животных, находящихся в гипогликемическом судорожном состоянии существенно отличались по ряду параметров, характеризующих их дыхание от митохондрий контрольных животных. Они более активно поглощали кислород в исходном состоянии, особенно при глутаматзависимом дыхании, обладали более мощным ответом на стимулирующую их дыхание добавку ADP ( $V_3$  при глутаматзависимом дыхании превышала ответ митохондрий контрольных животных на 53%, при сукцинатзависимом на 42%), более высокой у них была и скорость фосфорилирования, соответственно субстрату дыхания на 68 и 55%. Такие митохондрии характеризовались и несколько более высокими значениями коэффициента P/O. Изменение всех этих показателей относительного контроля следует рассматривать, по-видимому, как проявление определенных адаптивных сдвигов в работе дыхательной цепи этих органелл в условиях клеточного энергетического голода, вызванного гипогликемическим состоянием (табл. 1).

# МИТОХОНДРИИ МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОГЛИКЕМИИ

Таблица 1. Респираторные характеристики митохондрий головного мозга крыс при инсулиновом шоке и различных способах его купирования (субстрат дыхания - глутамат).

Серия опытов	1. Контроль n = 9	2. Шока n = 9	3. Купирование: глюкозой n = 9	4. Купирование: глутаматом + CO <sub>2</sub> n = 9	5. Купирование: глюкозой, спустя сутки n = 9	6. Купирование: глутаматом +CO <sub>2</sub> спустя сутки n = 9
V <sub>0</sub>	11,3±0,88	16,3±1,44 P <sub>2-1</sub> <0,02	12,9±0,86	9,8±0,82	8,6±0,96	12,9±1,69
V <sub>3</sub>	38,1±2,97	58,4±4,46 P <sub>2-1</sub> <0,01	52,8±4,14 P <sub>3-1</sub> <0,02	34,3±3,14	50,6±2,15 P <sub>5-1</sub> <0,01	61,9±3,98 P <sub>6-1</sub> <0,001
V <sub>4</sub>	12,3±1,25	14,3±1,06	12,8±1,13	9,5±0,86 P <sub>4-2</sub> <0,01	14,5±1,94	17,9±1,32 P <sub>6-1</sub> <0,01
V <sub>max</sub>	30,7±2,84	36,9±2,86	34,2±1,94	24,2±1,99 P <sub>4-2</sub> <0,01	40,5±4,67	51,9±3,11 P <sub>6-1</sub> <0,001
Ларин V <sub>3</sub> /V <sub>0</sub>	3,40±0,26	3,78±0,208	4,27±0,449	3,59±0,339	6,35±0,665 P <sub>5-1</sub> <0,001	5,48±0,749 P <sub>6-1</sub> <0,02
Ч <sub>мис</sub> V <sub>4</sub> /V <sub>3</sub>	3,22±0,27	4,21±0,347	4,56±0,695	3,73±0,356	3,8±0,334	3,60±0,342
V <sub>max</sub> /V <sub>4</sub>	2,57±0,22	2,67±0,229	2,84±0,314	2,65±0,206	2,90±0,241	2,94±0,155
P/O	2,88±0,078	2,99±0,063	2,77±0,066 P <sub>3-1</sub> <0,05	2,73±0,087 P <sub>4-2</sub> <0,02	2,71±0,062 P <sub>5-1</sub> <0,001	2,63±0,82 P <sub>6-1</sub> <0,05 P <sub>6-5</sub> <0,01
ADP/Δt	106,0±9,68	178,3±4,85 P <sub>2-1</sub> <0,001	147,1±3,67 P <sub>3-1</sub> <0,05	93,8±9,95 P <sub>4-2</sub> <0,001 P <sub>4-5</sub> <0,01	137,4±8,62 P <sub>5-1</sub> <0,05	175,2±5,27 P <sub>6-1</sub> <0,01 P <sub>6-5</sub> <0,05
V <sub>0</sub> /V <sub>4</sub>	0,98±0,045	1,17±0,072	1,06±0,108	1,11±0,121	0,63±0,074 P <sub>5-1</sub> <0,01	0,71±0,058 P <sub>6-1</sub> <0,01

При купировании шокового состояния глюкозой, уже спустя 1 час после её введения, перечисленные выше параметры дыхания несколько понижались, но при этом (за исключением V<sub>0</sub>) оставались по сравнению с контролем на достоверно более высоком уровне в течение последующих суток. Коэффициент P/O при глутаматзависимом дыхании также достоверно снижался.

В отличие от эффекта глюкозы, купирование судорожного состояния введением глутамата в сочетании с вдыханием углекислого газа приводило к нормализации всех изменённых при шоке параметров дыхания митохондрий, т.е. их возврату к контрольным значениям. Коэффициент P/O также снижался несколько ниже контрольных цифр. Однако через сутки после такого способа купирования гипогликемического шока скорость дыхания митохондрий под стимулирующим влиянием ADP, как и скорость фосфорилирования, т.е. ADP/Δt вновь оказались на достоверно более высоком уровне и при том близком к судорожному состоянию. Данный эффект был однотипен как для глутамат, так и сукцинатзависимого дыхания митохондрий. Коэффициент P/O при этом в случае глутаматзависимого дыхания еще больше понижался, достоверно опускаясь ниже контрольных цифр. При сукцинатзависимом дыхании данный коэффициент, напротив, возрастал, и не отличался от исходного контрольного значения (табл. 2).

Таблица 2. Респираторные характеристики митохондрий головного мозга крыс при инсулиновом шоке и различных способах его купирования (субстрат дыхания - сукцинат).

Серия опытов	1. Контроль n = 9	2. Шок n = 9	3. Купирование глюкозой n = 9	4. Купирование глутаматом + CO <sub>2</sub> n = 9	5. Купирование глюкозой, спустя сутки n = 9	6. Купирование глутаматом + CO <sub>2</sub> , спустя сутки n = 9
V <sub>0</sub>	27,2±2,23	31,2±2,01	31,4±3,19	26,0±1,79	29,7±4,22	34,4±1,32 P <sub>1-1</sub> <0,02
V <sub>3</sub>	59,6±5,82	85,1±5,61 P <sub>2-1</sub> <0,01	81,2±8,42 P <sub>3-1</sub> <0,05	63,3±8,02 P <sub>4-1</sub> <0,05	80,7±8,35 P <sub>5-1</sub> <0,05	92,2±3,86 P <sub>6-1</sub> <0,001
V <sub>4</sub>	26,9±2,90	25,2±2,68	24,7±1,76	19,7±1,85	25,5±3,03	32,9±3,29 P <sub>6-1</sub> <0,01
V <sub>max</sub>	63,3±5,99	74,9±3,40	67,7±4,34	54,4±4,22 P <sub>4-1</sub> <0,01	87,6±5,65 P <sub>5-1</sub> <0,02	92,7±5,27 P <sub>6-1</sub> <0,001
ДК <sub>3</sub> V <sub>3</sub> /V <sub>0</sub>	2,22±0,169	2,75±0,183 P <sub>2-1</sub> <0,05	2,65±0,185	2,40±0,168	3,00±0,319 P <sub>5-1</sub> <0,05	2,73±0,178 P <sub>6-1</sub> <0,05
ДК <sub>4</sub> V <sub>4</sub> /V <sub>3</sub>	2,24±0,118	3,74±0,606 P <sub>2-1</sub> <0,05	3,37±0,355 P <sub>3-1</sub> <0,01	3,21±0,211 P <sub>4-1</sub> <0,001	3,31±0,267 P <sub>5-1</sub> <0,01	3,00±0,259 P <sub>6-1</sub> <0,02
V <sub>max</sub> /V <sub>4</sub>	2,40±0,148	3,21±0,343 P <sub>2-1</sub> <0,05	2,82±0,227	2,84±0,130	3,61±0,242 P <sub>5-1</sub> <0,001	3,01±0,281
P/O	1,79±0,095	1,92±0,038	1,96±0,057	1,68±0,097 P <sub>4-1</sub> <0,05 P <sub>4-3</sub> <0,05	1,85±0,059	1,83±0,061
ADP/Δt	106,3±7,73	165,4±9,71 P <sub>2-1</sub> <0,001	162,9±18,48 P <sub>3-1</sub> <0,02	110,5±15,12 P <sub>4-1</sub> <0,01	152,2±18,34 P <sub>5-1</sub> <0,05	171,9±7,23 P <sub>6-1</sub> <0,001
V <sub>0</sub> /V <sub>4</sub>	1,05±0,068	1,32±0,124	1,28±0,102	1,35±0,068 P <sub>4-1</sub> <0,01	1,17±0,114	1,11±0,088

Через сутки после купирования шока отмечено также повышение чувствительности митохондрий к разобщающему действию протонофора – динитрофенола, о чем свидетельствует увеличение таких параметров как V<sub>DNP</sub> и отношения V<sub>DNP</sub>/V<sub>4</sub>. Этот эффект характерен для обоих способов купирования шока. Следует отметить, что в ближайший час после купирования шока глутаматом, в отличие от купирования его глюкозой, чувствительность мембран митохондрий к разобщающему действию динитрофенола не повышалась, а напротив, падала.

Спустя сутки после обоих способов купирования шока у 100% животных данных серий экспериментов дыхательный контроль по Ларди при глутаматзависимом дыхании митохондрий превалировал над показателем контроля по Чансу. Это указывает на высокую скорость гидролиза образующегося АТФ и снижение сродства дыхательной цепи к данному макроэргу. Об этом говорит и факт статистически достоверного снижения в этих сериях опытов по отношению к контролю показателя V<sub>0</sub>/V<sub>4</sub>, параметра, который характеризует способность митохондрий удерживать свой энергетический потенциал. При сукцинатзависимом дыхании митохондрий данный эффект в такой степени не проявлялся.



**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты проведенных экспериментов показывают, что дыхательная цепь митохондрий участвует в общей ответной реакции нервной ткани на гипогликемический шок, повышая свою дыхательную активность, что может носить адаптивный характер. Эффект купирования судорожного состояния глутаматом натрия в сочетании с углекислым газом, в отличие от классического купирования глюкозой, как бы нивелирует эти изменения в работе дыхательных цепей митохондрий. Однако, даже спустя сутки после обоих способов купирования шока, дыхание митохондрий остается существенно измененным. Ряд параметров, характеризующих это дыхание (повышение чувствительности к разобщающему действию динитрофенола, снижение коэффициента Р/О и показателя  $V_0/V_4$ , существенное превалирование дыхательного контроля по Ларди над значениями дыхательного контроля по Чансу) позволяют говорить о постепенно наступающих неблагоприятных изменениях в митохондриальных мембранах и в большей степени, отражающихся на функционировании первого дыхательного комплекса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Agardh C.-D., Chapman A.G., Nilson D., Siesjo B.K.* (1981) *J. Neurochem.*, **36**, 490-500.
2. *Knauff H.G., Mayer G., Mark D.* (1961) *Zeitschrift fur Physiolog. Chemie.*, **326**, 78-88.
3. *Sutherland G.R., Tyson R.L., Auer R.N.* (2008) *Med. Chem.* **4**, 379-385.
4. *Козлов Н.Б.* (1960) *Вопр. мед. химии*, **6**(4), 396-401.
5. *Вангейм К.А., Двалидзе Ю.Ф., Пуленкова Г.А., Удинцев Н.А.* (1962) *Сов. Мед-на*, **11**, 89-94.
6. *Pellegrino D., Siesjo B.K.* (1981) *J. Cerebral Bl. Flow*, **1**, 85-96.
7. *Коган А.Х., Грачев С.В., Елисеева С.В., Болевич С.* (1996) *Вопр. мед. химии*, №3, 193-202.
8. *Телушкин П.К., Ноздрачев А.Д.* (1999) *Успехи физиол. наук*, **30**(4), 14-27.
9. *Patockove J., Marholl P., Tumove E., Krliak M., Rokyta R., Lterek S.* (2003) *Physiol. Res.*, **52**, 131-135.
10. *Кондрашева М.Н.* (1991) *Биохимия*, **56**, 388-402.

Поступила: 19. 05. 2009.

#### FUNCTIONAL STATE OF RAT BRAIN MITOCHONDRIA AT HYPOGLYCEMIA CONVULSIVE SYNDROME AND DIFFERENT WAYS OF ITS ARRESTING

*A.V. Ivanova, N.M. Stunzhas*

Smolensk State Medical Academy, Department of Bioorganic and Biological chemistry,  
ul. Krupskoy, 28, Smolensk, 214019 Russia; tel.: 8(905)162-61-83; e-mail: anna.ivanova81@gmail.com

Respiratory and phosphorylation functions of rat brain mitochondria was studied under conditions insulin shock and after its treatment with glucose or glutamate (in combination with inhalation of hypercapnic gas mixture – air enriched with 7% CO<sub>2</sub>). Certain differences in the effects of the applied agents were found. Phosphorylation ability of mitochondria did not reach the normal level even one day after both ways of convulsive state treatment. Some respiratory parameters suggest that unfavorable changes in the respiratory chain functioning mainly occur at the respiratory chain complex I.

**Key words:** hypoglycemia, brain, oxidative phosphorylation.