на правах рукописи

ИВАНОВА Анна Владимировна

СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА МИТОХОНДРИЙ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ КОМЕ И РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ЕЕ КУПИРОВАНИЯ

03.01.04. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Смоленск – 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Смоленская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук, доцент **Стунжас Николай Михайлович**

Официальные оппоненты:

Аврова Наталия Федоровна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова», лаборатория молекулярной эндокринологии и нейрохимии, главный научный сотрудник.

Кириллова Надежда Васильевна, доктор биологических наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биохимии, заведующая.

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___»_____2016 года в_____часов на заседании диссертационного совета Д001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») по адресу: 1973764, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ»

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») по адресу: 1973764, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ» и на сайте http://www.iemrams.spb.ru/russian/dissov03.htm.

Автореферат разослан «___»_____2015 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук **Хныченко Людмила Константинолвна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Проблема поражения головного мозга при тяжелых гипогликемических состояниях, весьма часто встречающихся в клинической практике, остается актуальной, не смотря на огромное количество исследований.

В настоящее время нет единого подхода в понимании патогенетических основ повреждения головного мозга в результате развития тяжелой гипогликемии.

Перестройка метаболизма в ткани мозга на начальных этапах гипогликемических состояний носит, несомненно, адаптивный характер. При гипогликемии потребление мозгом кислорода не уменьшается в той же степени с какой падает потребление глюкозы, поскольку, в катаболический процесс вовлекаются другие эндогенные субстраты: метаболиты гликолиза, цикла Кребса, аминокислоты, пептиды (Телушкин П.К., 2009; Agardh C.-D. et al., 1981).

Очевидно, что исчерпание адаптивных возможностей ткани мозга по поддержанию своего энергетического статуса ведет к постепенному нарушению тонко скоординированных метаболических процессов, их извращению и, как следствие, к гибели нейронов.

Падение энергетического потенциала ткани головного мозга, вследствие снижения поступления глюкозы, рассматривается некоторыми исследователями как важный, но не основной фактор проявления гипогликемической комы и развития судорожного состояния.

Наиболее популярной в настоящее время считается гипотеза о доминирующей роли глутаматэргических структур мозга в эксайтотоксическом повреждении нейронов при гипогликемии (Auer R.N. et al., 1991; Nehlig, 1997). Одной из причин развития цитотоксических эффектов и гибели нейронов при чрезмерной активации глутаматэргических структур является Ca^{2+}-зависимое увеличение продукции оксида азота NO (Schulz J. B. et al., 1995). Сам оксид азота также может, за счет нитрозилирования, блокировать работу дыхательных ферментов, имеющих в своем составе железо-сероцентры (Chénais B. et al., 2002). Опубликованными работами последних лет подтверждается факт интенсификации при гипогликемической коме процессов окисления липидов ткани мозга (Patockova J. et al., 2003) и, конкретно липидов, мембран митохондрий (Ballesteros J.R. et al., 2003).

В таких условиях электронтранспортные системы митохондрий не могут оставаться интактными, вплоть до необратимых их повреждений. Однако, вопрос в том, на каких этапах гипогликемии начинают развиваться такие наиболее тяжелые и, притом, необратимые изменения в метаболизме ткани мозга остается открытым. Имеющиеся в литературе данные

по функциональному состоянию митохондрий, оксидантному статусу мозга касаются тяжелых степеней гипогликемии с полной и притом довольно длительной утратой его спонтанной электрической активности (Agardh et al., 1981).

Различия во временном аспекте длительности пребывания животных в тяжелом гипогликемическом состоянии, их видовые особенности, а также различная чувствительность структур мозга к гипогликемии могут быть причиной нередко противоречивых данных о состоянии липопероксидации в ткани мозга, ее антиоксидантных возможностей и выраженности митохондриальных дисфункций (Шестакова С.А., 2009). Однако, пусковым моментом развития наиболее тяжелых изменений в метаболизме мозга некоторые исследователи склонны считать все же восстановительный период выхода из гипогликемической комы после введения глюкозы (Suh S.W. et al., 2007).

Аммиачная интоксикация, развивающаяся при гипогликемическом шоке, является еще одним из факторов, играющим немаловажную роль в повреждении головного мозга. Особенно высокая концентрация аммиака в ткани мозга создается в судорожный период гипогликемической комы (Козлов Н.Б., 1960). Исследованиями автора была убедительно доказана возможность купирования судорожного состояния введением не глюкозы, а глютамата натрия с последующим вдыханием воздуха с добавлением 7-8% углекислого газа, что не приводило к подъему уровня глюкозы в крови. Предложенный способ вскоре был даже апробирован в клинической практике (Вангейм К. А., 1962), однако в дальнейшем не привлек к себе должного внимания исследователей.

В последующие годы был установлен ряд новых научных фактов, делающих актуальным углубленное изучение механизма купирующего гипогликемический шок эффекта CO_2 при его совместном применении с глютаминовой кислотой. Так, было показано, что гиперкапническое состояние, вызванное вдыханием газовой смеси с 7 – 8 % CO_2 способствуют поддержанию энергетического статуса мозга животных, находящихся в гипогликемической коме (Pellegrino D. et al., 1981). Исследованиями Когана А. Х. и соавторов (1996) убедительно проиллюстрировано, что углекислый газ обладает сильным ингибирующим влиянием на генерацию активных форм кислорода как при прямом воздействии на клетки различных органов и систем, так и при воздействии на целостный организм.

С учетом вышеизложенного очевидно, что сравнительный анализ динамики ответа электронтранспортных цепей митохондрий мозга на два принципиально отличных способа купирования гипогликемического шокового состояния представляется важным в плане углубления существующих знаний о состоянии биоэнергетических процессов в ткани мозга в условиях, как самой гипогликемии, так и возможных ее последствий.

Цель исследования: проведение сравнительного анализа метаболических изменений в работе дыхательных цепей митохондрий и их оксидантного статуса при гипогликемической коме на высоте судорожного состояния и в различные сроки восстановительного периода после купирования как глюкозой, так и глютаматом натрия в сочетании с вдыханием гиперкапнической газовой смеси.

Задачи исследования:

1. Изучить состояние окисления и фосфорилирования в митохондриях, выделенных из ткани мозга как здоровых животных (контроль), так и крыс в состоянии инсулин-индуцированной гипогликемической комы на высоте судорожного состояния.
2. Изучить состояние окисления и фосфорилирования в митохондриях, выделенных из ткани мозга животных после купирования гипогликемической комы введением глюкозы (после исчезновения симптомов коматозного состояния, и спустя сутки)
3. Изучить состояние окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга в те же сроки, но после купирования комы введением глютамата натрия в сочетание с вдыханием гиперкапнической газовой смеси (воздух + 7% CO_2)
4. Изучить интенсивность перекисных процессов в организме подопытных животных в целом (в сыворотке крови) и в мембранах митохондрий мозга.

Научная новизна исследования: В данном диссертационном исследовании впервые проведен анализ параметров дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий головного мозга крыс на ранней стадии развития гипогликемической комы (судорожное состояние) и в различные сроки после ее классического купирования глюкозой.

В работе представлены также результаты исследования дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий мозга при использовании альтернативного способа купирования гипогликемического судорожного синдрома введением глютамата натрия с одновременным вдыханием воздушной гиперкапнической газовой смеси.

Обобщенный диссертационный материал указывает на интенсификацию процессов липопероксидации в митохондриальных мембранах уже в начальные сроки восстановительного периода после купирования гипогликемического шока, дается оценка антиоксидантных возможностей этих органелл.

Практическая значимость: Полученные результаты расширяют существующие представления о этапности развития метаболических изменений в ткани мозга в условиях тяжелой гипогликемии и являются перспективными в плане выработки новых подходов к коррекции выявляемых нарушений, а возможно, и разработке превентивных мер их профилактики.

Методология и методы исследования: Работа основана на сравнении респираторных параметров дыхательных цепей митохондрий, выделенных на высоте судорожного состояния гипогликемической комы и после ее купирования, а также оксидантного статуса этих органелл. Для проведения исследования использовали полярографический анализ, хемилюминисцентные и спектрофотометрические методики

Положения,выносимые на защиту:

1. Дыхательные цепи митохондрий вовлекаются в общую ответную реакцию нервной ткани на гипогликемический шок, повышая свою дыхательную и фосфорилирующую способность.
2. Эффект купирования судорожного состояния глютаматом натрия в сочетании с углекислым газом, в отличие от классического купирования глюкозой, нивелирует эти изменения в работе дыхательных цепей митохондрий.
3. Через сутки, вне завимости от способа купирования, ряд параметров, характеризующих дыхание митохондрий, оказывается существенно измененным.
4. Под влиянием высоких доз инсулина, не смотря на купирующее действие примененных веществ, в митохондриальных мембранах интенсифицируются процессы ПОЛ.
5. Антиоксидантные возможности этих органелл (восстановленный глютатион - GSH, антиоксидантная емкость - AOE) в указанные временные сроки остаются не исчерпанными.

Степень достоверности и апробация результатов исследования: Результаты получены современными биохимическими методами. Основные выводы работы и выносимые на защиту положения являются обоснованными и полностью соответствуют полученным результатам. Достоверность выводов подтверждается корректной статистической обработкой данных.

Материалы диссертации были представлены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), на конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск 2009), на VI научно-практической конференции с международным участием «Antioxidants and ROS» (Смоленск, 2009), на 37 конференции молодых ученых СГМА (Смоленск, 2009), на 2 международной конференции RAHMS «Recent advances in health and medical sciences» (Cyprus, 2010), на всероссийской научно-практической конференции «Основы формирования здорового образа жизни» (Смоленск, 2012)

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора в работу состоит в планировании и постановке экспериментов, статистической обработке и интерпретации результатов экспериментов.

Структура диссертации: диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, состоящего из 36 отечественных и 179 зарубежных источников. Работа изложена на 126 страницах машинописного текста и включает 13 таблиц и 2 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении к работе обоснована актуальность изучаемой темы, степень ее разработанности, сформулированы цели и задачи работы, отражена научная новизна полученных результатов, а также их практическая и теоретическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы. В данной главе рассмотрены причины и клинические проявления гипогликемических состояний. Дано подробное описание особенностей метаболизма и энергетического обмена мозга при гипогликемических состояниях. Также представлены данные, касающиеся патохимических механизмов повреждения нейронов при гипогликемической коме. Описаны возможные изменения метаболизма, развивающиеся после купирования тяжелой гипогликемии.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования были выполнены на 200 белых крысах обоего пола с массой тела 150 – 200 г. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с приказом министерства Здравоохранения №755 от 12.08.77 и положениями Хельсинской декларации. Подопытные животные содержались в условиях вивария и находились на обычной лабораторной диете. Перед проведением каждого эксперимента животные не получали пищу в течение 14 часов, но при этом имели свободный доступ к воде.

Забой животных осуществлялся путем моментальной декапитации с параллельным определением уровня глюкозы в крови с помощью портативного глюкометра (One Touch Horizon, LifeScan, Johnson & Johnson).

Все экспериментальные животные были разбиты на шесть групп.

1.Контрольная группа. Концентрация глюкозы в крови интактных животных находилась в пределах 3,3 – 5,6 ммоль/л.

2. Животные с выраженным судорожным состоянием, вызванным подкожным введением инсулина (продажный препарат Актрапид НМ, Ново Нордиск А/С, Дания) в дозе 40 ед/кг массы тела. Забой животных данной серии производился на высоте судорожного состояния. Концентрация глюкозы в крови этих животных не превышала 1 ммоль/л.

3. Животные, подвергавшиеся декапитации спустя 1 час после купирования судорожного состояния подкожным введением изотонического раствора глюкозы из расчета 2 г на 1 кг массы тела. Уровень глюкозы в крови при забое этих животных практически не отличался от нормы.

4. Животные, подвергавшиеся декапитации спустя 1 час после купирования судорожного состояния путем подкожного введения раствора глютамата натрия (0,5 г на 1 кг массы тела) с последующим их помещением в проточную газовую камеру объемом 5,5 литра, куда подавалась гиперкапническая газовая смесь (воздух + 7% CO_2). Концентрация глюкозы в крови при этом так и оставась ниже 1 ммоль/л.

К 5 и 6 серии экспериментов были отнесены животные, которые после купирования судорожного гипогликемического состояния (глюкозой – серия 5, либо глютаматом в сочетании с CO_2 – серия 6) помещались в условия вивария и при этом они имели свободный доступ к пище и воде. Забой этих животных для исследования осуществлялся спустя сутки после купирования шокового состояния.

Выделение митохондрий из ткани головного мозга (за исключением мозжечка) осуществлялось путем ее гомогенизации в ледяной среде выделения (0,25 М сахароза (хч), 0,1 мМ ЭДТА, 0,01 М трис- HCl, pH =7,2) с последующим предварительном центрифугировании гомогената в рефрижераторной центрифуге ЦЛР – 1 при 1000 g (температурный интервал от -3 до 0ºС, 10 мин) и повторном центрифугировании при 12000g. Осажденные митохондрии промывали холодной (+5ºС) средой выделения и после повторного их осаждения в таких же условиях центрифугированием ресуспендировали в среде выделения и переносили в пробирки помещенные в воду со льдом.

Определение параметров дыхания и фосфорилирующей способности митохондрий проводилось по поглощению ими кислорода, напряжение которого в среде инкубации регистрировалось полярографическим методом с применением закрытого электрода типа Кларка, изготовленного в лаборатории им. Белозерского при МГУ (Трушанов А.А, 1973).

Среда инкубации содержала 5 мМ KH_2PO_4, 10 мМ трис-HCl, 20 мМ KCl, 0,4 мМ ЭДТА, тоничность до уровня 220 мМ доводилась сахарозой, pH среды – 7,4. В качестве субстратов дыхания митохондрий применяли как глутамат, так и сукцинат калия, которые вносили микродозаторами в ячейку электрода со средой инкубации до конечной концентрации 3 мМ.

На основании каждой полярограммы рассчитывались общепринятые параметры дыхания (Ивков И.Н., Панченко Л.Ф., 1971): V_2 - скорость потребления кислорода митохондриями в исходном состоянии; V_3 - скорость потребления кислорода после добавки

АДФ; V_4 - скорость потребления кислорода митохондриями после расходования добавки АДФ; Vднф - после добавки разобщителя протонофора 2,4 – динитрофенола, т.е. скорость дыхания митохондрий в состоянии разобщения.

Как производные этих величин находили: Р/О, $ДК_{Ларди} = V_{АДФ}/V_2$ (коэффициент усиления), $ДК_{Чанс} = V_{АДФ}/V_4$ (дыхательный контроль по Чансу – Уильямсу), $V_{ДНФ}/V_4$, АДФ/Δt (скорость фосфорилирования добавки АДФ), V_2/V_4 (способность мембран митохондрий сохранять собственный энергетический потенциал).

Содержание белка в суспензии митохондрий определяли по методу Lowry O.H. et all (1951) путем инкубирования разведенной взвеси митохондрий с реактивом Фолина – Чокальтеу.

Измерение концентрации гидроперекисей липидов (ГПЛ) и общей антиоксидантной емкость (АОЕ) как сыворотки крови, так и суспензии митохондрий было выполнено на хемилюминометре ИРА-03 с использованием ФЭУ – 127 (Шерстнев М.П., 1990). Измерение содержания ГПЛ в указанных биологических образцах основывалось на инициации хемилюминисценции ионами Fe^{2+} в присутствии родамина Ж. Рассчитывались следующие основные параметры: h – высота быстрой вспышки, которая зависит от содержания в изучаемой системе гидроперикисей липидов; Н – высота медленной вспышки, которая отражает способность липидов к перекисному окислению, т.е. максимально возможную интенсивность ПОЛ после введения Fe^{2+}; τ – латентный период с момента введения Fe^{2+} до начала развития медленной вспышки, который зависит от соотношения в системе про- и антиоксидантов.

Для оценки АОЕ сравнивали хемилюминисцентные сигналы быстрой (Бст) и медленной (Мст) вспышек стандартной желточной липопротеидной системы с сигналами опытной пробы содержавшей стандартизированную по содержанию белка взвесь митохондрий – Боп и Моп.

Определение содержания диеновых конъюгатов в суспензии митохондриальных мембран осуществлялось по методу Волчегорского И.А. (1991) путем получения гептан-изопропанольных экстрактов липидной фазы митохондрий с последующим их спектрофотометрированием при 220, 232, 278 нм. Рассчитывали содержание продуктов ПОЛ по отношению Е232/Е220 и Е278/Е220 пересчитанное на 1 мг белка суспензии митохондриальных мембран, принимая во внимание, что при тяжелой гипогликемии общее содержание липидов в митохондриях остается неизменным (Agardh C-D. et all, 1981).

Определение содержания малонового диальдегида (ТБК – активных продуктов в митохондриальной фракции головного мозга) основывалось на способности тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в кислой среде взаимодействовать с низкомолекулярными

диальдегидами (главным образом, малоновым) с образованием окрашенного комплекса, имеющего максимум светопоглощения при длине волны 535 нм.

Определение содержания восстановленного глютатиона в митохондриальной и цитозольной фракции головного мозга основывалось на способности кислоторастворимых тиоловых группировок (тиоловых групп низкомолекулярных соединений) при взаимодействии с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) образовывать окрашенное соединение – 2-нитро-6-меркаптобензойную кислоту, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм. Молярно-экстинкционный коэффициент цветных продуктов реакции при 412 нм, который был получен со стандартным раствором восстановленного глютатиона оказался равным 13450 м-1 см-1, что оказалось близко к величине 13600 м-1 см-1, которое приведено в работе J.L. Ellman (1958).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica 6.1 (StatSoft, USA) путем использования дисперсионного анализа с последующим применением критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для сравнения трех и более экспериментальных групп. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилкса. В случае невыполнения закона нормального распределения вместо t-критерия Стьюдента использовался знаковый критерий Вилкоксона. Достоверными считали различия при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга интактных животных. Митохондрии мозга контрольных животных при введении в инкубационную среду в качестве субстратов дыхания глютамата или сукцината поглощали кислород со скоростью соответственно 11.3 и 27.2 нг атомов O_2 на мг белка суспензии этих органелл (рис. 1 и 2).

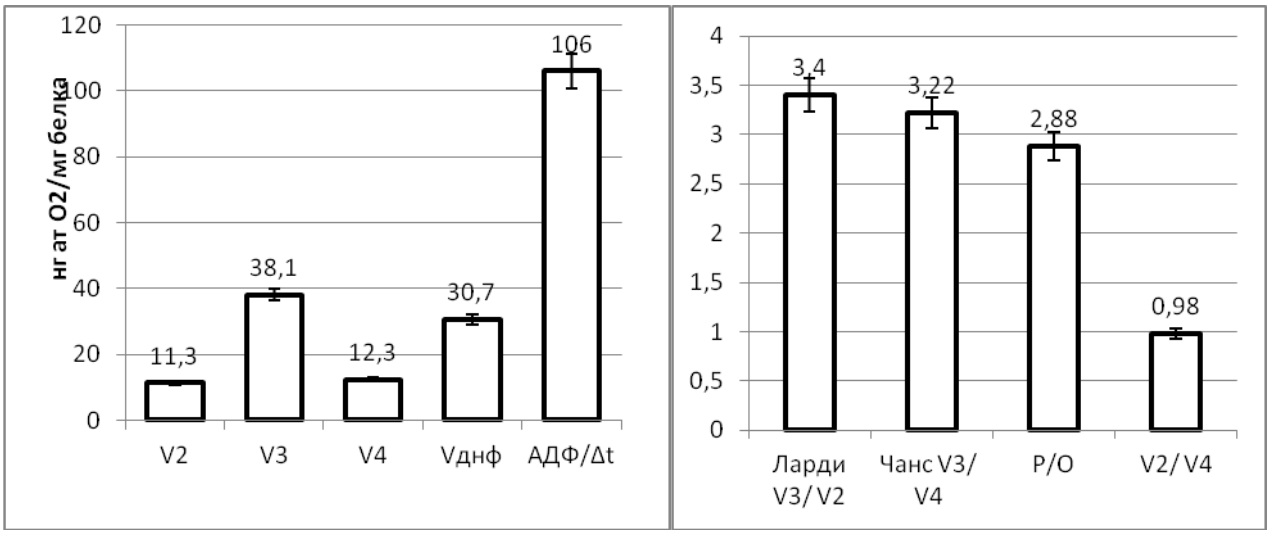

Рис.1. Респираторные характеристики митохондрий головного мозга контрольной группы крыс (субстрат дыхания - глютамат).

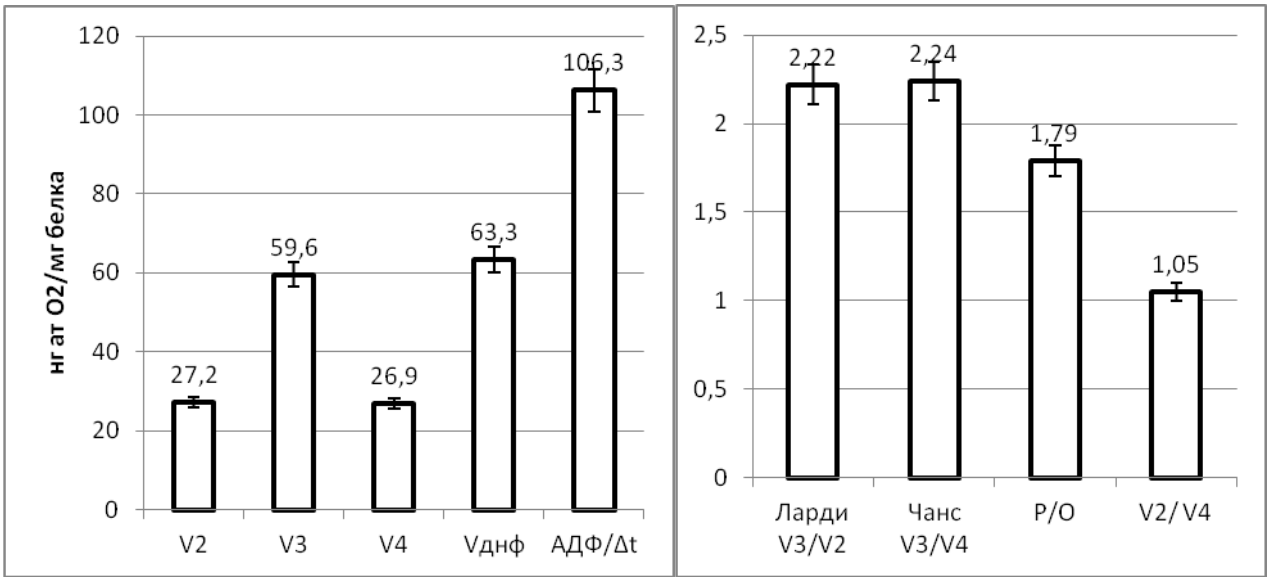

Рис.2. Респираторные характеристики митохондрий головного мозга контрольной группы крыс (субстрат дыхания - сукцинат).

При добавлении АДФ скорость потребления кислорода митохондриями резко возрастала: при глютаматзависимом дыхании в 3.4 раза (коэффициент усиления по Ларди), а при сукцинатзависимом дыхании в 2.2 раза. После исчерпания АДФ, интенсивность дыхания митохондрий (состояние V_4) возвращалось практически к исходному уровню, в результате чего отношение коэффициентов дыхательного контроля (по Чансу) и Ларди в обоих случаях оказалось близким к единице. Это свидетельствуют о подключении в момент добавления АДФ реакций фосфорилирующего окисления и полного их прекращения после исчерпания введенной добавки АДФ. То есть, митохондрии контрольной группы животных характеризовались высокой способностью сохранять нарабатываемый ими свой собственный потенциал, что подтверждается и отношением V_2/V_4, которое в обоих случаях близко к единице. Коэффициент Р/О, показывающий эффективность окисления субстратов митохондриями контрольных животных, оказался равным 2.88 в случае глютаматзависимого дыхания и 1.79 при применении сукцината.

Представленные данные позволяют полагать, что примененная процедура выделения митохондрий, как и подобранный состав инкубационной среды, позволяли получить митохондриальную фракцию ткани мозга с достаточно интактной и вполне функционально способной структурой этих органелл.

Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга при гипогликемическом судорожном синдроме. Митохондрии, выделенные из мозга животных, находящихся в гипогликемическом судорожном состоянии более активно поглощали кислород в исходном состоянии, особенно при глютаматзависимом дыхании, обладали более мощным ответом на стимулирующую их дыхание добавку АДФ (V_3 при глютаматзависимом 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% (рис. 3 и 4). Отмечалось существенное возрастание коэффициента дыхательного контроля по Чансу (V_3/V_4) и его явное превалирование над коэффициентом усиления по Ларди, особенно при сукцинатзависимом дыхании. Это говорит о том, что у животных данной серии в митохондриях мозга скорость синтеза АТФ значительно преобладала над скоростью гидролиза и дыхательные цепи при этом сохраняли высокую чувствительность к нарабатываем макроэргам.

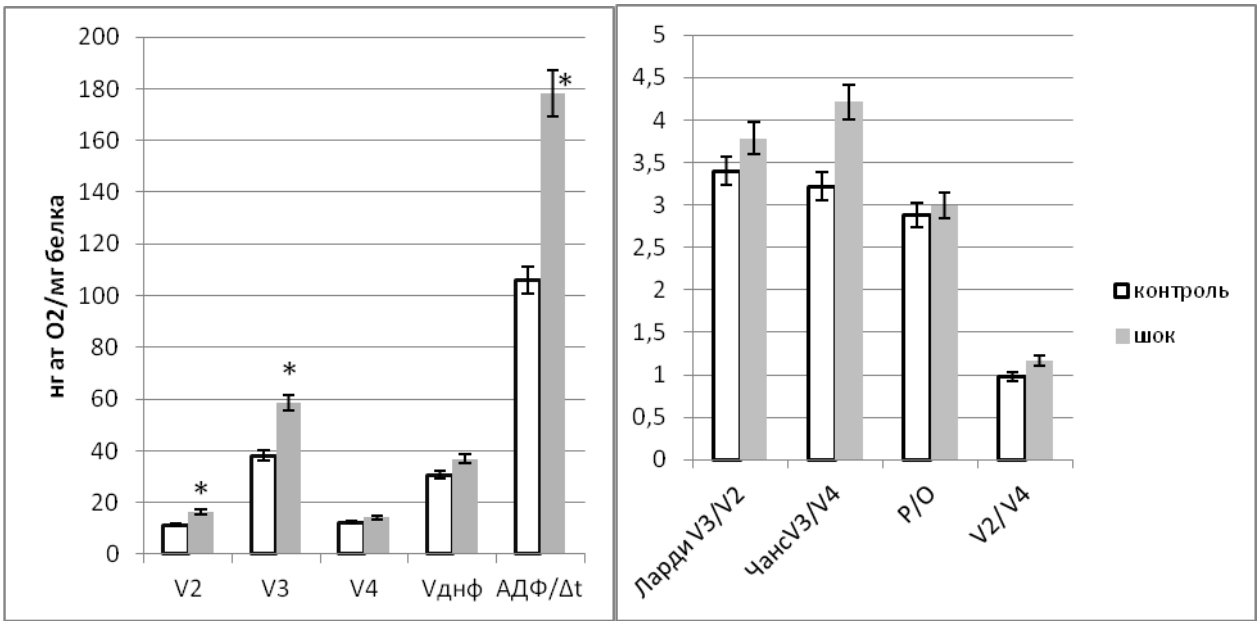

Рис.3. Дыхательная и фосфорилирующая способность митохондрий при инсулиновом шоке (субстрат дыхания – глютамат).

На данной и последующих диаграммах «*» отмечены достоверные отклонения по отношению к контролю

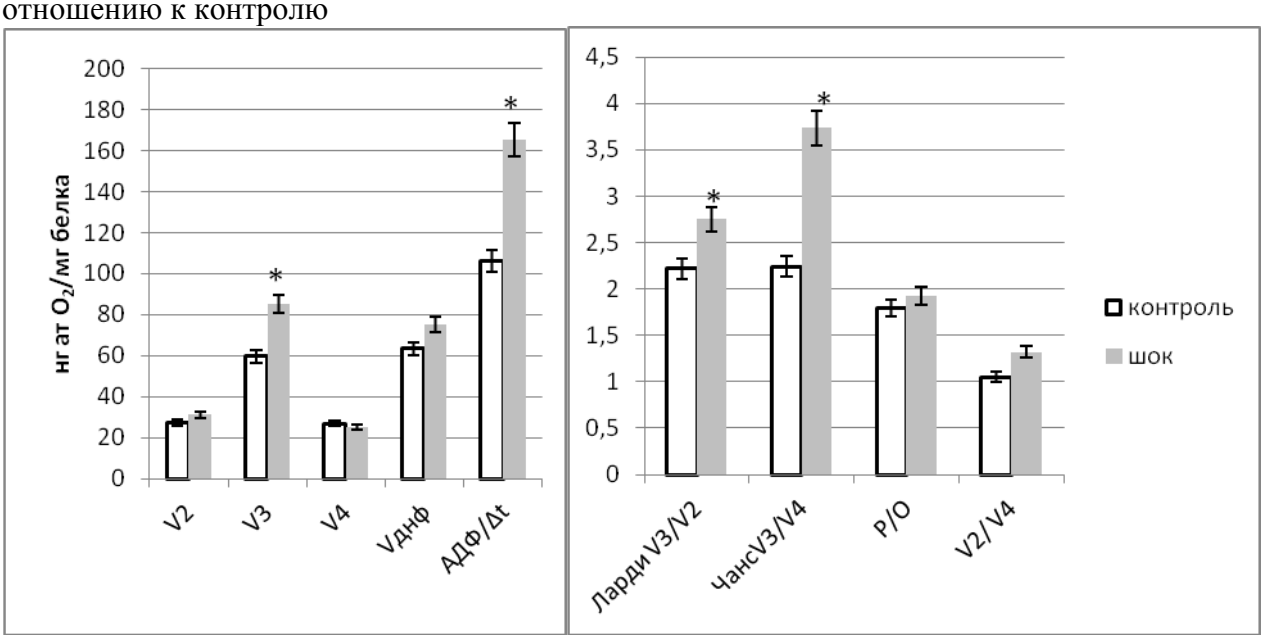

Рис.4. Дыхательная и фосфорилирующая способность митохондрий при инсулиновом шоке (субстрат дыхания – сукцинат).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют том, что у животных, находящихся на судорожном этапе гипогликемической комы, в электронтранспортных цепях митохондрий мозга происходят определенные изменения, результатом которых является повышение их дыхательной способности, а также увеличение чувствительности митохондрий к стимулирующему их дыхание действию АДФ и скорости его утилизации при практически не измененной энергоэффективности их работы.

Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга после купирования гипогликемического судорожного состояния введением глюкозы. Спустя 1 час после купирования гипогликемических судорог глюкозой, митохондрии мозга таких животных, по-прежнему, более активно, чем митохондрии контрольных животных поглощали кислород в состоянии V_3 (АДФ-стимуляция), обладали весьма высоким показателем АДФ/Δt. Следовательно, восстановление исходного уровня глюкозы в крови, ведущее к улучшению энергетического статуса мозга, за одночасовой период не приводит к снятию тех эффектов в дыхательных цепях митохондрий, которые были индуцированы инсулином (рис. 5 и 6).

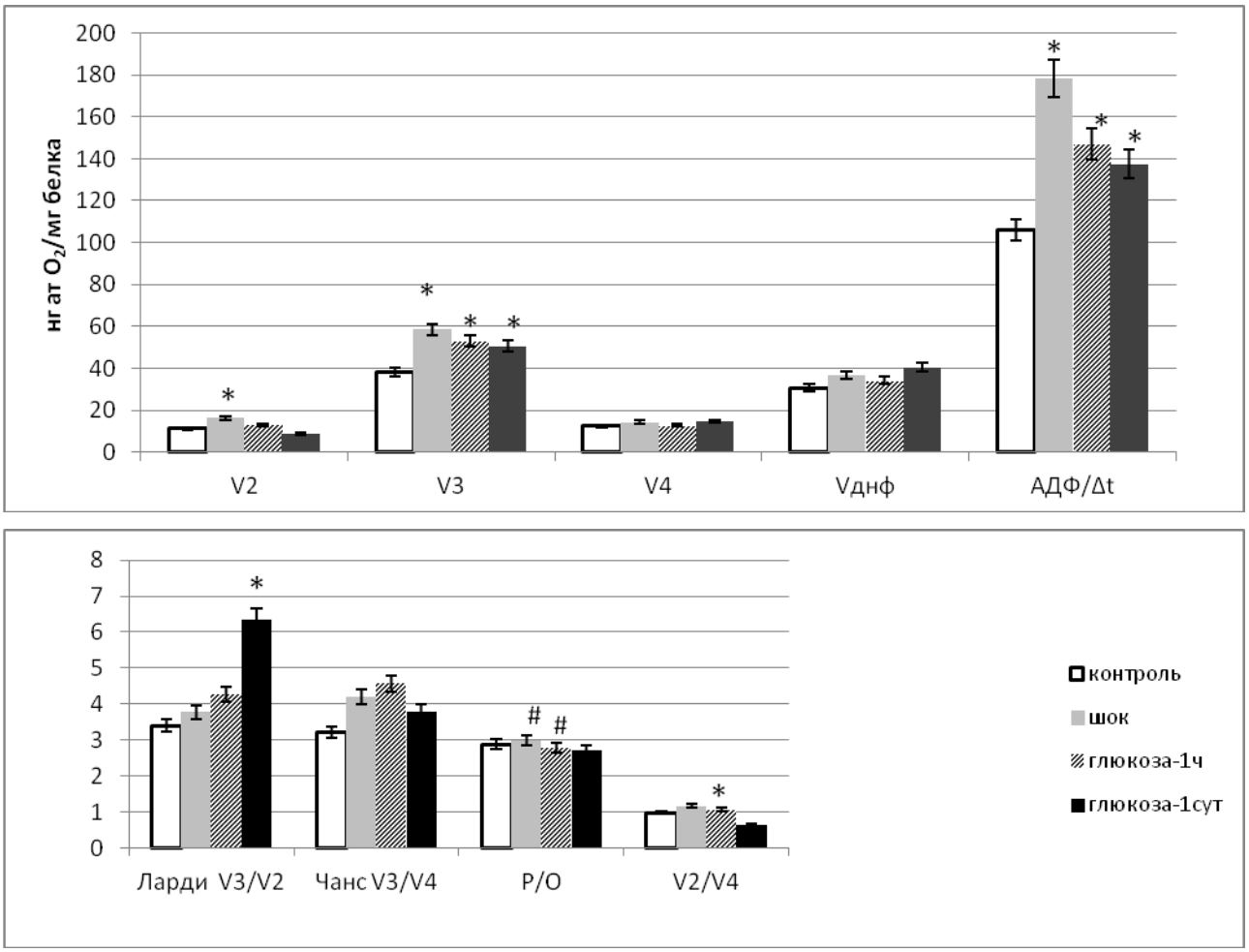

Рис.5. Функциональные параметры митохондрий мозга после купирования судорожного состояния введением глюкозы (субстрат дыхания – глютамат).

- достоверно по отношению к состоянию инсулинового шока, до его купирования

Вместе с тем, глютаматзависимое дыхание митохондрий данной серии опытов в отличие от сукцинатзависимого характеризовалось более низкой эффективностью использования высвобождающейся энергии (достоверное снижение коэффициента Р/О по отношению к судорожному состоянию).

Еще в большей степени указанные различия в глютамат и сукцинатзависимом дыхании проявлялись спустя сутки после купирования судорог введением глюкозы. Так если при использовании сукцината дыхательные цепи митохондрий сохраняли свои основные респираторные параметры, то при применении глютамата наблюдалось с одной стороны уменьшение исходной скорости дыхания (V_2), а с другой – увеличение скорости потребления кислорода после исчерпания добавки АДФ (V_4). Результатом этого явилось высоко достоверное снижение (по сравнению с контролем) коэффициента V_2/V_4. Коэффициент усиления Ларди, в отличие от сукцинат зависимого дыхания, более чем в полтора раза превышал величину дыхательного контроля по Чансу. Отмечалось также повышение чувствительности дыхательных цепей к разобщающему действию динитрофенола.

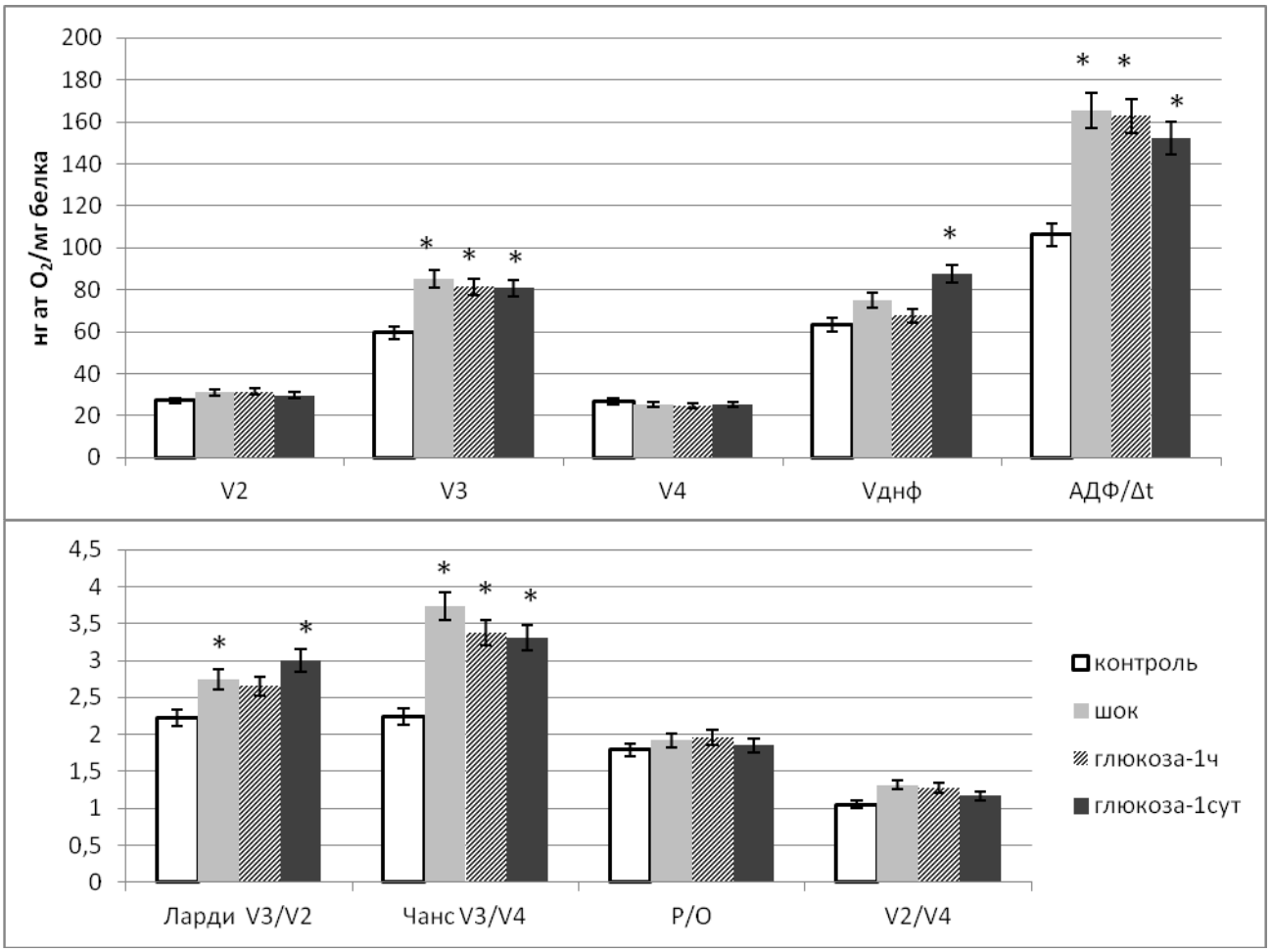

Рис.6. Функциональные параметры митохондрий мозга после купирования судорожного состояния введением глюкозы (субстрат дыхания – сукцинат).

Таким образом, результаты данных серий показывают, что купирование гипогликемических судорог введением глюкозы в ближайшей одночасовой перспективе в малой степени отражается на тех изменениях в функциональном состоянии митохондрий мозга, которые были характерны для судорожного состояния. Выявляемые же спустя сутки после купирования судорог негативные изменения в глютаматзависимом дыхании митохондрий по сравнению с сукцинатзависимым, позволяют говорить о вероятности структурно-функциональных нарушений, постепенно развивающихся в электронтранспортных цепях на уровне первого дыхательного комплекса.

Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга крыс после купирования гипогликемического судорожного состояния введением глютамата натрия в сочетании с вдыханием воздуха в смеси с углекислым газом. Введение глютамата натрия, в сочетании с вдыханием гиперкапнической газовой смеси возвращало практически к исходным значениям измененные под влиянием гипогликемии параметры дыхания митохондрий - V_2 и V_3 (рис. 7,8).

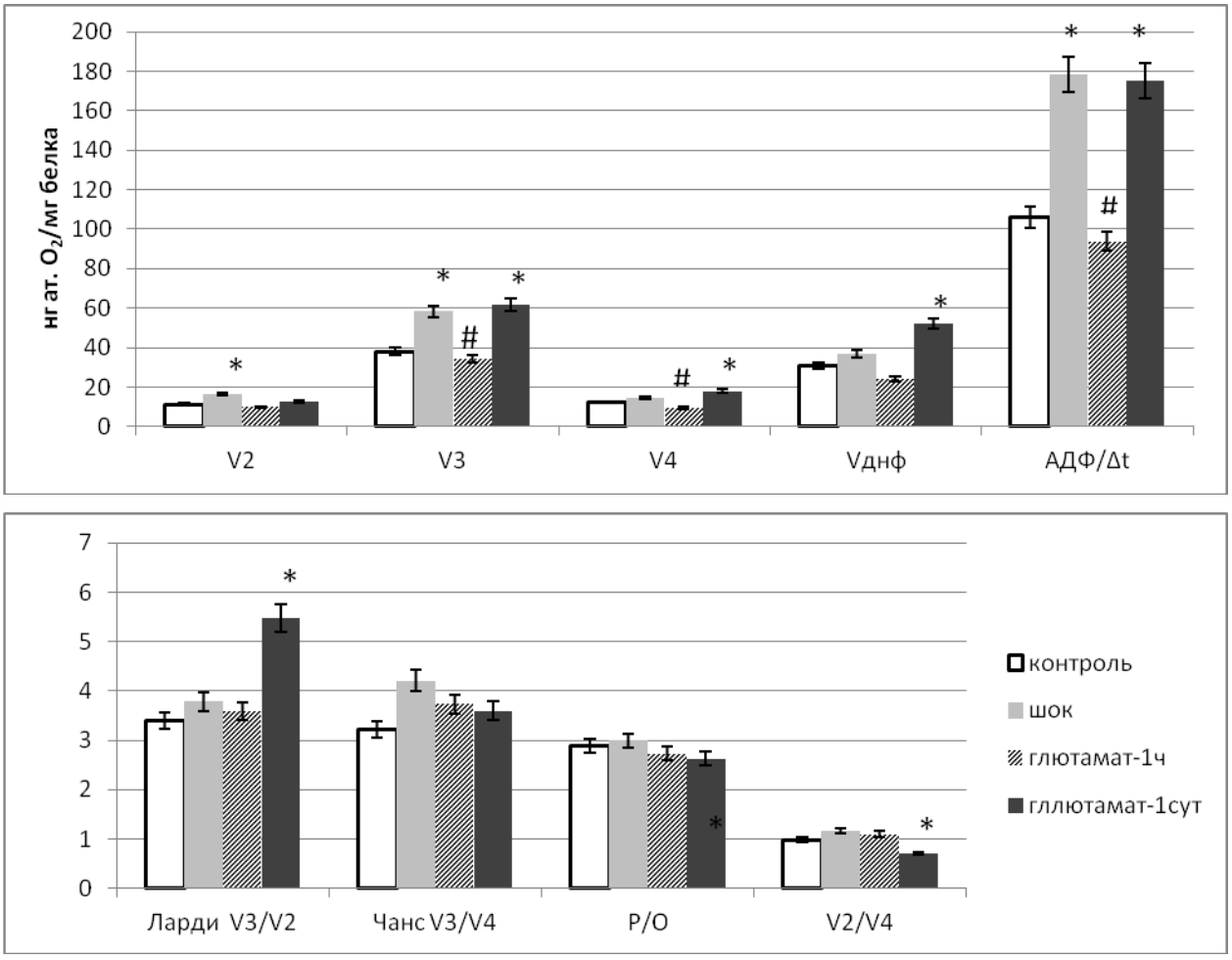

Рис.7.Функциональные параметры митохондрий головного мозга крыс после купирования судорожного состояния глютаматом в сочетание с CO_2 (субстрат дыхания – глютамат)

Скорость же дыхания после исчерпания добавки АДФ - V_4 опускалась даже несколько ниже контрольных значений. Дыхательный коэффициент по Чансу превалировал над коэффициентом усиления по Ларди, что свидетельствует о высоком сродстве митохондрий к нарабатываемому ими АТФ. При этом они обладали столь же выраженной способностью к сохранению своего энергетического потенциала. Скорость утилизации АДФ (АДФ/Δt) при применении обоих субстратов дыхания возвращалась к контрольным значениям.

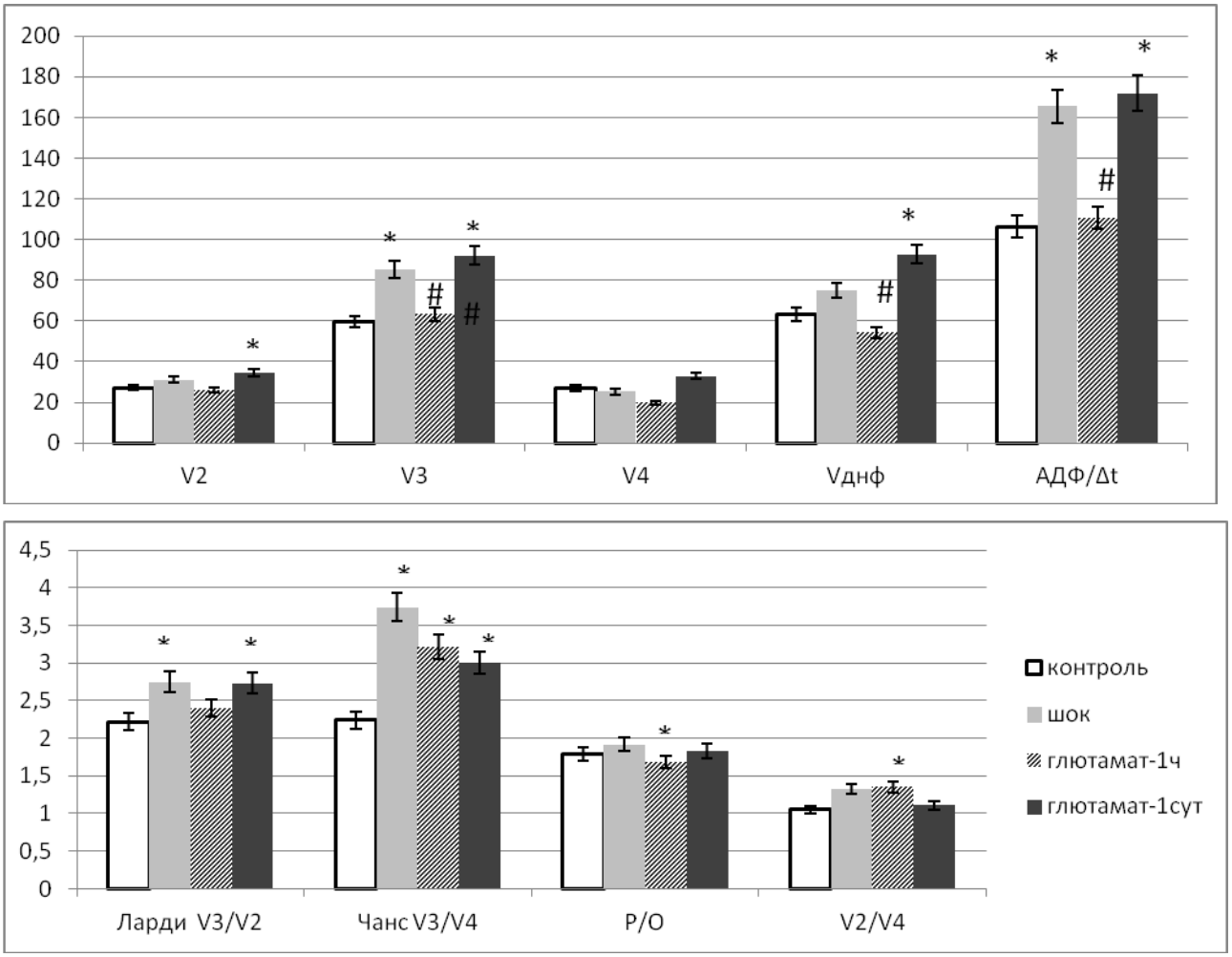

Рис.8.Функциональные параметры митохондрий головного мозга крыс после купирования судорожного состояния глютаматом в сочетание с CO_2 (субстрат дыхания – сукцинат)

Через 24 часа после купирования скорость дыхания митохондрий V_3, как и скорость фосфорилирования, т.е. АДФ/Δt вновь оказались на уровне близком к судорожному состоянию. Данный эффект был однотипен как для глютамат, так и сукцинатзависимого дыхания митохондрий.

Коэффициент Р/О при этом в случае глютаматзависимого дыхания понижался, достоверно опускаясь ниже контрольных цифр. При сукцинатзависимом дыхании данный коэффициент не отличался от исходного контрольного значения.

Спустя сутки после купирования шока у 100% животных данной серии экспериментов коэффициент усиления при глютаматзависимом дыхании митохондрий превалировал над показателем контроля по Чансу, что указывает на высокую скорость гидролиза образующегося АТФ и снижение сродства дыхательных цепей к данному макроэргу. Об этом говорит и факт статистически достоверного снижения показателя V_2/V_4. При сукцинатзависимом дыхании митохондрий данный эффект в такой степени не проявлялся.

Таким образом, результаты проведенных исследований, показывают, что дыхательные цепи митохондрий вовлекаются в общую ответную реакцию нервной ткани на гипогликемический шок, повышая свою дыхательную и фосфорилирующую способность. Эффект купирования судорожного состояния глютаматом натрия в сочетании с углекислым газом, в отличие от классического купирования глюкозой, нивелирует эти изменения в работе дыхательных цепей митохондрий. Однако, не смотря на принципиальные различия в способах купирования судорожного состояния, спустя сутки функциональное состояние митохондрий оказывается существенно негативно измененным.

Состояние липопероксидации в митохондриях головного мозга при гипогликемическом судорожном синдроме и после различных способов его купирования. Как видно из приведенных данных (таблица 1), в ходе исследования была выявлена лишь незначительная тенденция к росту концентрации гидроперекисей в липидной фазе митохондрий в условиях гипогликемии. Купирование судорожного состояния введением глюкозы не приводило, к нормализации содержания гидроперекисей. Применение альтернативного способа купирования спустя 1 час приводило к резкому подъему содержания гидроперекисей липидов в митохондриальных мембранах. Спустя сутки уровень ГПЛ превышал контрольные значения на 78 и 70% соответственно способу купирования.

Таблица 1. Содержание ГПЛ взвеси митохондрий мозга при гипогликемическом судорожном синдроме и после его купирования (отн.ед.).

	Контроль n=8	Шок n=8	Купирование глюкозой		Купирование глютаматом	
			1 час(n=8)	1 сут(n=8)	1 час(n=8)	1сут(n=8)
ГПЛ	37,4±6,5	44,8± 6,2	51,8±3,5	66,6±9,1 P<0,02	99,8±9,7 P<0,001	64,4±7,4 P<0,02

Столь высокий подъем уровня гидроперекисей липидов после купирования судорожного состояния глютаматом натрия и CO_2, на фоне объективного улучшения состояния животных (исчезновения судорог, восстановление рефлексов), побудил нас исследовать в аналогичной серии экспериментов содержание в липидных экстрактах мембран митохондрий других начальных продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов. По методу Н. А. Волчегорского из взвеси митохондрий получали гептан-изопропанольные экстракты липидов и измеряли их светопоглощение в УФ-части спектра при 220, 232 и 278 нм. Из приведенных данных (таблица 2) видно, что средние значения экстинкций изопропанольной фазы липидов при 220 нм (поглощают изолированные двойные связи), в обеих группах животных были практически идентичными.

Таблица 2. Содержание продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидных экстрактов из митохондрий мозга спустя 1 час после купирования гипогликемических судорог глютаматом натрия в сочетании с CO_2.

	E220,нм	E232/ E220	E278/ E220
Контроль (n=9)	0,36±0,046	0,30±0,03	0,09±0,01
Купирование 1 час (n=8)	0,37±0,07	0,40±0,05	0,26±0,05 P<0,02

P – статистически достоверные отличия

Это говорит о том, что по общему содержанию липидов и степени их ненасыщенности митохондриальные мембраны как контрольной, так и опытной групп животных практически не отличались друг от друга.

Параметры же отношения поглощения экстрактами лучей с длинной волны 278 нм к поглощению при 220 нм, которое зависит от содержания кетодиенов и сопряженных триенов, статистически достоверно и более чем в 2 раза превышали контрольные значения.

Полученные данные, согласуясь с результатами люминисцентного анализа, говорят о существенном превышении содержания по сравнению с контролем начальных продуктов ПОЛ в митохондриальных мембранах в ближайшей перспективе восстановительного периода после купирования гипогликемического судорожного состояния глютаматом натрия в сочетании с углекислым газом.

Для того, что бы уточнить влияние тяжелой гипогликемии на процессы ПОЛ в митохондриальных мембранах нами было предпринято собственное исследование по определению концентрации МДА (маркера оксидативного стресса) в указанных органеллах в наших условиях эксперимента.

Как видно из данных (таблица 3), практически во всех экспериментальных сериях содержание МДА в митохондриях животных статистически не отличалось от контрольных значений.

Таблица 3. Содержание малонового диальдегида в митохондриях мозга при гипогликемическом судорожном состоянии и после его купирования. (нмоль/мг митохондриального белка)

	Контроль n=8	Шок n=8	Купирование глюкозой		Купирование глютаматом	
			1 час n=8	1 сутки n=8	1 час n=8	1 сутки n=8
МДА	1,9±0,386	2,5± 0,35	1,6±0,16	1,6±0,19	1,5±0,16	0,9±0,09 P<0.05

И лишь через сутки после купирования судорожного состояния глютаматом и CO_2 уровень МДА оказался достоверно более низким по сравнению с уровнем, характерным для начального восстановительного периода.

Отсутствие факта накопления конечных продуктов ПОЛ на фоне достаточно высокого уровня образования первичных продуктов перекисного окисления позволяет говорить о сохранении достаточно высокой емкости системы антиоксидантной защиты.

Данное предположение согласуется с результатами проведенного исследования общей антиоксидантной активности взвеси митохондрий ткани мозга, в ходе которого ни в одной из серий опытов не было выявлено статистически достоверных отклонений в антиоксидантной способности митохондрий по сравнению с контрольной группой животных (таблица 4).

Таблица 4. Антиоксидантная емкость митохондриальных мембран мозга при гипогликемическом судорожном синдроме и после его купирования. (отн. ед.)

	Контроль n=8	Шок n=8	Купирование глюкозой		Купирование глютаматом	
			1 час(n=8)	1 сут(n=8)	1 час(n=8)	1 сут(n=8)
АОЕ	38,1±7,23	30,9±5,91	39,0±7,78	38,9±5,97	19.75±7.52	41,8±5,43

Известно, что важнейшим компонентом системы антиоксидантной защиты является восстановленный глютатион. Поэтому, представлялось важным исследовать содержание восстановленного глютатиона в тех сериях опытов, где нами был зарегистрирован достоверно высокий уровень гидроперекисей липидов после обоих способов купирования судорожного состояния – т.е. через сутки после выхода из гипогликемической комы (таблица 5).

Таблица 5. Содержание восстановленного глютатиона в митохондриях ткани головного мозга спустя сутки после купирования гипогликемического судорожного состояния. (нмоль/мг митохондриального белка)

	Контроль	Купирование глюкозой(1сут)	Купирование глютаматом (1сут)
GSH	15,5±3,69	14,73±2,13	15,7±3,85

Как видно из таблицы 5, содержание восстановленного глютатиона в митохондриях спустя сутки после купирования обоими способами сохранялась на уровне контрольных значений.

Для оценки состояния общего биорадикального статуса в тех же условиях экспериментов нами было предпринято хемилюминисцентное исследование сыворотки крови животных с целью определения содержания в ней гидроперекисей липидов и состояния ее общей антиоксидантной емкости (таблица 6).

Таблица 6. Содержание гидроперекисей липидов (ГЛП) общая антиоксидантная емкость сыворотки крови (АОЕ) различных групп экспериментальных животных (отн.ед.).

	Контроль n=8	Шок n=8	Купирование глюкозой		Купирование глютаматом	
			1 час(n=8)	1 сут.(n=8)	1 час(n=8)	1сут.(n=8)
ГПЛ	88,6±8,2	85,2±4,6	81±4,5	87±4,2	78±5,4	86±2,5
АОЕ	12,7±3,32	18,1±4,28	15,6±2,9	18,2±2,9	17,2±3,49	17,8±3,03

Проведенное исследование показало, что тяжелая гипогликемия не приводит к увеличению содержания гидроперекисей липидов и АОЕ сыворотки крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Проведенными исследованиями было установлено, что в митохондриях ткани мозга животных уже на этапе судорожного состояния инсулин-индуцированной комы выявляются изменения, свидетельствующие о повышении их дыхательной и энергопреобразующей способности. Спустя 1 час после купирования гипогликемических судорог введением глюкозы и нормализации уровня глюкозы в крови функциональные показатели митохондрий мозга почти не изменялись, особенно при сукцинатзависимом дыхании.

Купирование судорог глютаматом с CO_2 уже через 1 час характеризовалось подавлением повышенной дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий и возвратом их параметров практически к контрольным значениям.

Спустя сутки после купирования судорожного состояния, независимо от способа, дыхание митохондрий оставалось существенно измененным. Помимо повышенной дыхательной активности, митохондрии характеризовались высокой чувствительностью к разобщающему действию динитрофенола, снижением энергоэффективности окисления субстратов, падением способности органелл к удержанию своего энергетического потенциала, явным превалировании коэффициента усиления над дыхательным контролем.

Известными причинами изменений в функциональной активности этих органелл могут быть изменение проницаемости их мембран для протонов и других заряженных частиц, перегруппировка структурных мембранных липопротеидов. Такого рода изменения во многом могут зависеть от состояния перекисных процессов в этих субклеточных структурах.

Хемилюмисцентное исследование сыворотки крови показало, что однократная гипогликемическая кома как до, так и после ее купирования не отражается на общем биорадикальном статусе организма в целом.

Исследование же суспензии митохондриальных мембран и их липидных экстрактов, выделенных из ткани мозга экспериментальных животных выявило увеличение концентрации таких первичных продуктов ПОЛ как гидроперекисей, кетодиенов и кетотриенов позволяет говорить об интенсификации процессов липопероксидации уже в начале восстановительного периода, особенно при купировании судорожного состояния глютаматом в сочетании с CO_2.

Вместе с тем, хемилюминисцентное исследование показало, что митохондрии мозга сохраняли свои антиоксидантные возможности при инсулин-индуцированном гипогликемическом состояние в указанные временные сроки. Подтверждением этому является и факт сохранения исходного уровня восстановленного глютатиона, как важнейшего компонента антиоксидантной системы.

ВЫВОДЫ.

1. Судорожный этап инсулининдуцированной гипогликемической комы характеризуется повышением дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий ткани головного мозга.
2. Купирование судорожного состояния животных введением глюкозы даже спустя сутки не приводит к возврату показателей дыхательной и фосфорилирующей активности митохондрий мозга к нормальным значениям, при этом глютаматзависимое дыхание митохондрий, в отличие от сукцинатзависимого, энергетически становится менее эффективным.
3. Эффект купирования судорожного состояния глютаматом натрия в сочетание с углекислым газом, в отличие от классического купирования глюкозой, в одночасовой перспективе, нивелирует изменения в дыхательных цепях митохондрий мозга, индуцированные инсулином, что сочетается со снижением энергоэффективности их работы.
4. Не смотря на принципиальные различия в способах купирования судорожного состояния, в обоих случаях спустя сутки функциональное состояние митохондрий оказывается существенно измененным. Повышение чувствительности их дыхательных цепей к разобщающему действию динитрофенола, снижение энергоэффективности их работы, превалирование коэффициента усиления над дыхательным контролем, снижение способности к удержанию своего энергетического потенциала свидетельствует о постепенно наступающих неблагоприятных изменениях в митохондриальных мембранах.
5. Уже с начала восстановительного периода в митохондриальных мембранах интенсифицируются процессы липопероксидации, о чем свидетельствует увеличение содержания в них таких начальных продуктов ПОЛ, как предобразованных гидроперекисей, кетодиенов, кетотриенов, особенно при купировании судорог глютаматом в сочетании с CO_2.
6. Антиоксидантные возможности митохондрий мозга, если судить по их антиоксидантной емкости, уровню восстановленного глютатиона на фоне удержания исходных концентраций малонового диальдегида, остаются не исчерпанными, что позволяет им терминировать ПОЛ на уровне первичных продуктов.

Список основных работ по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. **Иванова, А.В.** Функциональное состояние митохондрий мозга крыс при гипогликемическом судорожном синдроме и различных способах его купирования / **А.В. Иванова**, Н.М. Стунжас //Биомедицинская химия. – 2010. – т.56 – вып.5. – С.570-575

2. **Иванова, А.В.** Состояние липопероксидации в митохондриях мозга при гипогликемическом судорожном синдроме и различных способах его купирования / А.В. Иванова // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2014. - № 1(11). – С. 39 - 47

Прочие работы, опубликованные по теме диссертации

1. **Иванова, А.В.,** Стунжас Н.М. Дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий головного мозга крыс при инсулиновой коме и различных способах ее купирования / **А.В. Иванова**, Н.М. Стунжас //(4 съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. - Новосибирск - 2008. – С.452)

2. **Иванова, А.В.** Влияние тяжелой гипогликемии на функцию митохондрий мозга крыс / **А.В. Иванова**, Н.М. Стунжас // Вестник Смоленской Медицинской Академии. – Смоленск - 2008. - №3. - С. 39-43

3. **Иванова, А.В.** Состояние липопероксидации в митохондриальных мембранах при инсулиновом шоке и его купировании глюкозой и глютаматом / А.В. Иванова // Вестник Смоленской Медицинской Академии. – Смоленск - 2009. - №2. - С. 24-26

4. **Иванова, А.В.** Содержание гидроперекисей в липидах митохондрий мозга и их антиоксидантные свойства при гипогликемическом судорожном синдроме и после его купирования / А.В. Иванова // Вестник Смоленской Медицинской Академии. – Смоленск - 2009. - №3. - С. 17-19

5. **Ivanova, A.V.** Lipid hydroperoxides content at rat brain mitochondria and their antioxidant capacity under insulin shock and after its arresting / A.V. Ivanova // Материалы шестой научно-практической конференции с международным участием “Antioxidants and ROS”. - Смоленск, 2009 – С.52

6. **Иванова, А.В.** Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга крыс при инсулиновом шоке и после его купирования глютаматом с углекислым газом / А.В. Иванова // Российская конференция посвященная 80-летию со дня рождения Р.И. Лифшица «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии». – Челябинск, 2009. – С.42-45

7. **Иванова, А**.В. Липопероксидное состояние мембран митохондрий головного мозга крыс при гипогликемическом судорожном синдроме / А.В. Иванова // Вестник

Смоленской Медицинской Академии. – Смоленск - 2010. - №3. - С. 23-26

8. **Ivanova, A.V.** Lipid peroxidation state of rat brain mitochondria membranes in case of insulin-induced hypoglycemic convulsions / **A.V. Ivanova,** V.G. Podoprigorova // 2nd International Conference RAHMS "Recent advances in health and medical sciences". – Parphos, Cyprus, 2010. – p.28

9. **Иванова, А.В.** Содержание первичных продуктов липопероксидации в мембранах митохондрий мозга после купирования гипогликемического судорожного синдрома глютаматом натрия в сочетании с CO_2 / **А.В. Иванова**, Е.С. Гончарова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Основы формирования здорового образа жизни». – Смоленск – 2012 – С. 59-60

Список сокращений

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АОЕ – антиоксидантная емкость

АФК – активные формы кислорода

ГЛП – гидроперекиси липидов

ЖЛП – желточные липопротеиды

МДА – малоновый диальдегид

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СРО – свободно радикальное окисление

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

GSH – восстановленный глютатион