

А. П. Черченко, І. М. Тодор

Зміни енергетичного метаболізму в тканинах мозку кролів при бемеGRIDовому кіндлінгу

Исследовали изменения энергетического метаболизма в тканях коры мозга кроликов при бемеGRIDовом кіндлінге различной продолжительности. При 14- и 30-суточном кіндлінге в неокортексе обнаружено достоверное снижение содержания АТФ, повышение содержания АМФ, снижение коэффициента АТФ/АМФ и энергетического заряда по сравнению с контролем. Снижение суммарного содержания адениновых нуклеотидов было более значительным при 14-суточном кіндлінге. Обнаружены также значительные нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях неокортекса при окислении сукцината и глутамата – достоверное снижение скорости поглощения кислорода в активном метаболическом состоянии V_3 , снижение коэффициента дыхательного контроля и признаки разобщения окислительного фосфорилирования. В серии исследований с глутаматом такие отличия от контроля были более значительны, кроме того было обнаружено достоверное снижение скорости поглощения кислорода митохондриями в состоянии покоя V_2 , снижение коэффициента энергопродукции и коэффициента АТФазной резервной активности.

ВСТУП

БемеGRID є епілептогенним агентом, який застосовують в діагностиці для уточнення локалізації епілептичного вогнища у хворих на епілепсію і в експериментальних дослідженнях на тваринах з метою тестування рівня судомної готовності мозку [3,4]. Епілептогенні впливи бемеGRIDу пов'язують з посиленням окиснювальних процесів і підвищенням вмісту супероксидних радикалів у тканинах мозку [3]. При генералізованих корчових нападах, спровокованих бемеGRIDом, у тканинах мозку дослідних тварин спостерігаються ультраструктурні зрушення, характерні для стану функціонального виснаження нейронів і метаболічного ураження мембранних структур синаптичних терміналей і мітохондрій (МХ) агресивними продуктами вільнорадикальних реакцій перекисного окиснення ліпідів [5]. Водночас у разі бемеGRIDового кіндлінгу, який моделюється щодобовими введеннями підпорогових доз бемеGRIDу протягом тривалого

терміну, в нейронах переважають ознаки функціональної активації синаптичних процесів, конформаційних і пластичних перебудов синаптичних мембран і мембран МХ, які непрямо свідчать про можливі зрушення процесів енергозабезпечення нейрональних функцій [5].

Як відомо, корчові реакції, спричинені різними епілептогенними факторами, супроводжуються значним зниженням вмісту АТФ у тканинах мозку внаслідок значних енерговитрат і за таких умов генерація епілептичної активності може здійснюватися за рахунок енергії вільнорадикальних реакцій [3], тобто дефіцит АТФ призводить до використання альтернативних джерел енергозабезпечення нейронів. Маючи підстави припустити, що при бемеGRIDовому кіндлінгу може відбуватися "розкачка" енергетичного метаболізму епілептогенного типу, в цій роботі ми поставили за мету дослідити особливості зрушень окисного фосфорилування в тканинах мозку дослідних тварин за умов форму-

вання стану судомної готовності протягом тривалого терміну (14 і 30 діб).

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 68 статевозрілих кролях-самцях масою 2,5 - 3 кг. Контрольну групу склали 20 інтактних кролів. До двох дослідних груп ввійшли кролі (48 тварин), яким моделювали бемегридовий кіндлінг (14 і 30 діб) за допомогою щодобових введень бемегриду (2,5 мг/кг, внутрішньом'язово) [5]. Вміст аденінових нуклеотидів у тканинах мозку визначали методом тонкошарової хроматографії та спектрофотометрії [1]. Після декапітації тварин виділяли тканини кори півкуль головного мозку, зразки поміщали у рідкий азот, гомогенізували, додавали 2 мл 6%-го розчину хлорної кислоти, охолоджували і центрифугували (6000 хв-1, 5 хв). Надосадну рідину (0,1 мл) наносили на хроматографічні пластинки сілуфол-УВ (Чеська Республіка), які вносили у суміш розчинників діоксан - ізопропан - вода - аміак у співвідношенні 4:2:4:1. Плями нуклеотидів детектували в ультрафіолетовому світлі. Вміст в елюаті АТФ, АДФ і АМФ визначали методом спектрофотометрії при довжині хвилі 260 нм на спектрофотометрії СФ-4. Розраховували сумарний вміст нуклеотидів, співвідношення вмісту АТФ і АМФ, а також величину енергетичного заряду [2].

Для дослідження окисного фосфорилування зразки тканин кори півкуль головного мозку гомогенізували в охолоджену (4 С⁰) середовищі виділення (моль/л): сахароза - 0,25, тріс-буфер - 0,01, ЕДТА - 0,001, 0,5%-й розчин бичачого сироваткового альбуміну; рН 7,4. За допомогою поетапного центрифугування виділяли МХ [16] з використанням центрифуги К-24 (фірма "Janetsky", ФРН). Швидкість поглинання кисню МХ визначали полярографічним методом [6] на полярографі LP-60 (Чеська Республіка) з використанням закритого платиного електрода Кларка. Вміст білка визначали методом Лоурі

[12]. Зразки для полярографічного вимірювання (1 мл) містили середовище інкубації (моль/л): сахароза - 0,15, КСl - 0,04, КН₂РO₄ - 0,01, тріс-НСl - 0,005, ЕДТА - 0,0002; рН 7,4, до якого додавали 3,5 мг білка МХ. Як субстрат окиснення використовували сукцинат і глутамат (0,005 моль/л). Визначали швидкість поглинання кисню МХ у стані покою при наявності субстрату окиснення (V₂), при фосфорилуванні доданого 266 нмоль/л АДФ (V₃), у стані спокою після фосфорилування АДФ (V₄), при роз'єднанні окиснення та фосфорилування (V_{dnp}) додаванням 2,4-динітрофенолу (50 мкмоль/л). Обчислювали коефіцієнт дихального контролю Чанса (КДК), коефіцієнт енергопродукції (АДФ/О) і співвідношення V₂/V₄, яке характеризує активність АТФазних реакцій [6]. Статистичний аналіз результатів проводили з використанням програми Statgraf на ПК ІВМ РС 286.

РЕЗУЛЬТАТИ

Проведено дослідження вмісту аденінових нуклеотидів і швидкості поглинання кисню МХ тканин неокортексу кролів з 14- і 30-добовим бемегридовим кіндлінгом (рис. 1 і 2).

Як видно на рис. 1, у кролів з бемегридовим кіндлінгом різної тривалості виявлено односпрямовані зрушення вмісту аденінових нуклеотидів у тканинах неокортексу порівняно з контролем, а саме, вірогідне зниження вмісту АТФ і підвищення вмісту АМФ (P<0,05), зниження енергетичного заряду (P<0,05) і коефіцієнту АТФ/АМФ (P<0,05). При 14-добовому кіндлінгу виявлено також вірогідне зниження загальної суми аденінових нуклеотидів (P<0,05). Отримані результати свідчать про істотні зрушення вмісту аденінових нуклеотидів у тканинах мозку і енергозабезпечення нервових процесів, які проявляються при метаболічній "розкачці" бемегридом через 14 діб і стабілізуються в тих самих межах у разі пролонгованого кіндлінгу.

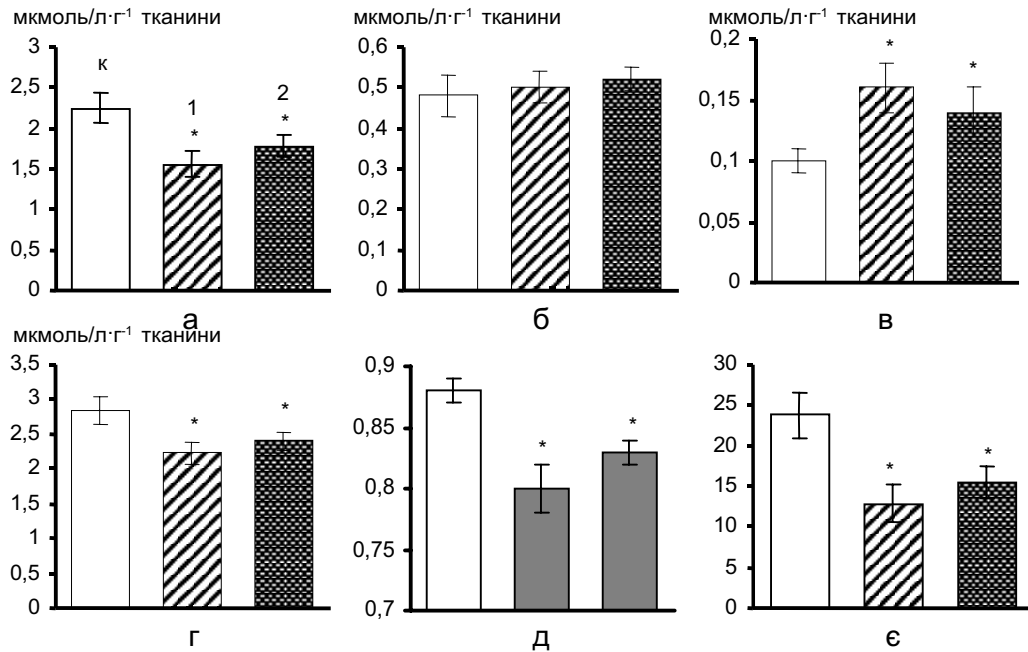


Рис. 1. Вміст аденінових нуклеотидів: АТФ (а), АДФ (б), АМФ (в), їх сума (г), енергетичний заряд (д), АТФ / АМФ (е) в тканинах мозку кролів при бемеGRIDовому кіндлінгу 14 (1) та 30 діб (2) порівняно з контролем (к).

*P<0,05.

Припустивши, що такі метаболічні порушення у кролів з бемеGRIDовим кіндлінгом можуть бути наслідком послаблення процесів окисного фосфорилування, ми дослідили швидкість поглинання кисню в МХ тканин неокортексу кролів дослідних і контрольних груп. У кролів з короткотривалим кіндлінгом (14 діб) не було виявлено вірогідних відмінностей показників окисного фосфорилування порівняно з контролем. Але суттєві зрушення порівняно з контролем були виявлені при 30-добовому кіндлінгу, а саме: вірогідне зниження швидкості поглинання кисню МХ в активному метаболічному стані при фосфорилуванні доданого АДФ (V_3), при роз'єднанні окисного фосфорилування 2,6-динітрофенолом (V_{dnp}), а також значне послаблення КДК при окисненні як сукцинату, так і глутамату (див.рис. 2). При цьому відмінності від контролю були більш значними у серії досліджень з глутаматом ($P<0,01$), ніж з сукцинатом ($P<0,05$). При окисненні глутамату виявлено також значне зниження

швидкості поглинання кисню МХ у метаболічному стані покою V_2 ($P<0,01$), зниження коефіцієнта енергопродукції АДФ/О ($P<0,01$) і співвідношення V_2/V_4 , ($P<0,01$), яке свідчить про достатню резервну активність АТФаз [6].

Таким чином, наші дослідження виявили суттєві зрушення вмісту аденінових нуклеотидів, тканинного дихання і окисного фосфорилування в тканинах мозку кролів у разі довготривалого бемеGRIDового кіндлінгу.

ОБГОВОРЕННЯ

Як свідчать дані експериментальних досліджень на різних епілептичних моделях, спровоковані корчові напади супроводжуються значним спустошенням пулу АТФ у тканинах мозку [3]. Проте недостатньо ясно, чи є вони наслідком значних енерговитрат при епілептичній гіперактивності нейронів, чи причиною епілептогенезу. Останнім часом значний внесок у вивченні цих питань зроби-

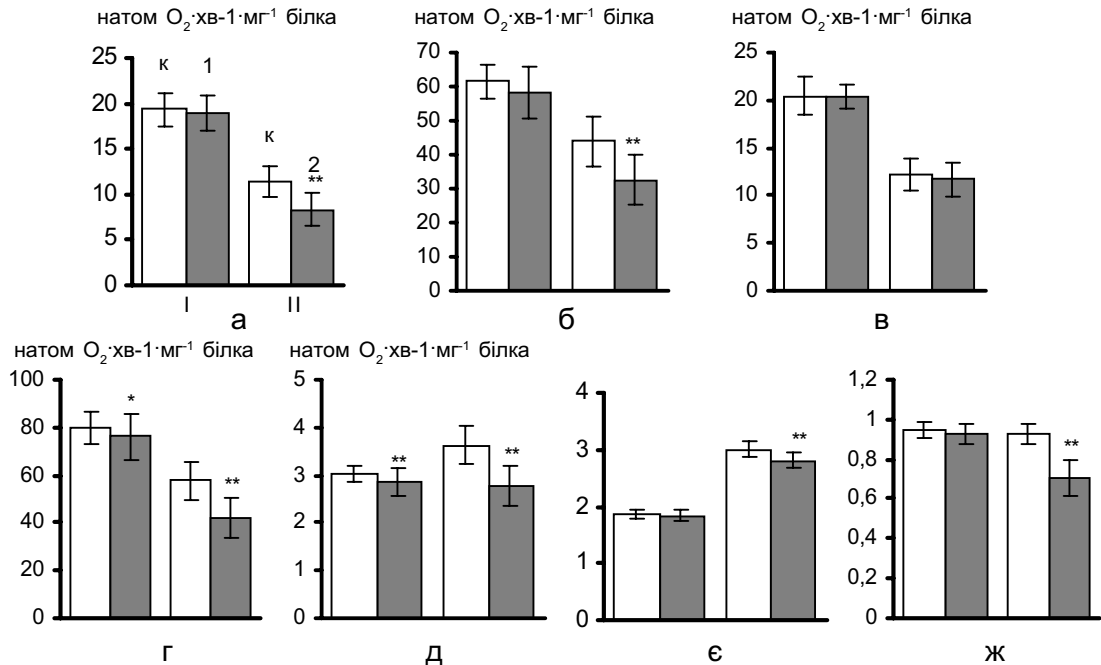


Рис. 2. Швидкість поглинання кисню мітохондріями тканин кори півкулі головного мозку кролів при 30-добовому бемегридовому кіндлінгу (1,2): V_1 (а), V_2 (б), V_4 (в), V_{dnp} (г), КДК (д), АДФ/О (е), V_2/V_4 (ж); сукцинат (I), глутамат (II).

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

ли генетичні дослідження МХ. Встановлено, що синтез більшості ферментативних і транспортних білків МХ, які регулюють процеси окиснення, фосфорилування і синтезу АТФ, знаходиться під контролем автономного генетичного апарату МХ [8,19]. Нині прискіпливо досліджуються молекулярні механізми регуляції енергозабезпечення життєздатності та функціонування нервових клітин і генетичні порушення в МХ у разі різних неврологічних захворювань, у тому числі при епілепсії [13,15,17].

Наші дослідження на моделі бемегридового кіндлінгу виявили характерні і загальні для різних епілептичних моделей ознаки порушень енергетичного метаболізму в тканинах кори головного мозку – зниження вмісту АТФ, послаблення процесів окисного фосфорилування [3,10]. При цьому зрушення пулу АТФ, АДФ і АМФ у тканинах мозку в ранні терміни кіндлінгу свідчать про енергетичний дисбаланс, який може бути наслідком активації вільнорадикальних реак-

цій. Водночас у разі пролонгованого кіндлінгу виявляються ознаки перебудови метаболічної системи МХ епілептогенного типу. Зрушення окисного фосфорилування при окисненні сукцинату, найбільш енергоємного субстрату циклу трикарбонових кислот (ЦТК), вказує на порушення окиснення у швидкому кластері ЦТК і на роз'єднання окиснення і фосфорилування в початкових пунктах дихального ланцюга МХ. Значні зрушення, які виявлено в дослідженнях з глутаматом, говорять про послаблення використання його як субстрата окиснення, порушення переносу електронів у НАД-залежному пункті дихального ланцюга МХ і роз'єднання процесів окисного фосфорилування. Можна припустити, що такі зрушення зумовлені дефіцитом АТФ, оскільки процеси переамінування глутамату і функціонування аспартат-малатного човникового механізму оборотного транспорту глутамату в МХ є енергозалежними.

Відомо, що глутамат, який є попередником α -кетоглутарату і посередником енергетичного й амінокислотного метаболізму, в тканинах мозку відіграє суто специфічну роль нейротрансмітера [14]. Менше використання глутамату в нервових клітинах як енергетичного субстрату може призвести до накопичення його клітинного і позаклітинного "надлишкового" пулу, до ураження нервових тканин нейротоксичними продуктами його метаболізму і/або до посилення виведення з нервових клітин надлишків глутамату специфічним синаптичним екзоцитозом. Таким чином, зрушення динамічно збалансованих процесів енергетичного й амінокислотного метаболізму можуть спричинити посилення глутаматергічної активації нейронів, що, як відомо, є епілептогенним фактором [7]. Таке припущення узгоджується з нещодавно отриманими даними про накопичення надлишкового позаклітинного пулу глутамату в тканинах мозку при моделюванні кіндлінгу [11,18].

Як відомо, функціонування мітохондріальних систем енергозабезпечення нервових клітин відбувається за умов динамічно врівноважених процесів окисного фосфорилування, вільнорадикальних реакцій і активності антиоксидантних систем МХ. Порушення цього динамічного балансу може призвести до підвищення вмісту агресивних радикалів кисню, що є одним із визначальних факторів ураження мембран і мембранопов'язаних ферментних комплексів МХ. Такі зрушення визнані одним із механізмів ураження мітохондріальної РНК і генетично зумовленої патології систем окисного фосфорилування [9]. Наші результати свідчать про те, що довготривалі впливи бемегриду призводять до стійких зрушень окисного фосфорилування в тканинах мозку. Такі зрушення енергетичного метаболізму можуть бути спричинені порушеннями компартменталізації і функціонування мембранопов'язаних ферментних комплексів внаслідок ураження мембран МХ агресивними продуктами вільнорадикальних реакцій за умов їх тривалої активації бемегридом.

A.P.Cherchenko, I.N.Todor

THE BRAIN ENERGETIC METABOLISM DISORDERS IN BEMEGRIDE-KINDLED RABBITS

Changes in the energetic metabolism in the cortex were examined in bemegride-kindled rabbits. A reliable decrease in the ATP and an increase in the AMP contents in the cortical tissues as well as low ATP/AMP and energetic charge coefficients have been found after kindling the rabbits for 14 and 30-days as compared to the control groups of animals. Considerable disorders in the oxidative phosphorylation in the mitochondria of the cortical tissues have been determined after the succinate and glutamate oxidation: a decrease in the oxygen utilization rate at V_3 active metabolic state, lowering the respiratory control coefficient and the dissociation between phosphorylation and oxidation. Those disorders were more expressed after glutamate oxidation as compared to a succinate one. In addition, it has been determined that oxygen utilization at V_2 state was reliably decreased; both coefficient of energetic production and ATP-ase reserve activity lowered.

Institute of Neurosurgery A.P.Romodanov AMSU, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Захарова Н.Б., Рубин В.И. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках силуфол // Лаб. дело. - 1980. - № 12. - С.735-758.
2. Каминский Ю.Г. Суточные ритмы в метаболизме. - Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1987. - 193 с.
3. Погодаев К.И. Эпилептология и патохимия мозга. - М.: Медицина, 1986. - 285 с.
4. Черченко А.П., Шамаев М.И., Нагорный С.А. та ін. Вплив хронічного внутрішнього опромінення малими дозами цезію-137 на функціональний стан ЦНС лабораторних тварин та їх нащадків. - В кн.: Хронічний вплив малих доз опромінення на нервову систему. - К.: Чорнобильінтерінформ, 1998. - С.208-224.
5. Черченко А.П., Шмельова Г.А., Ритікова Л.С. Ультраструктурні зміни в гіпокампі і сенсомоторній корі кроликів при епілептогенних впливах // Вісн. Київ.ун-ту Проблеми регуляції фізіол. функцій. - 1994. - Вип.1. - С.93-99.
6. Франк Г.М., Кондрашова Е.И. Мохова Е.И. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. - М.: Наука, 1973 - 221 с.

7. Chapman A.G. Glutamate and epilepsy // J. Nutr. – 2000. – 130, N 4. – P. 1043-1045.
8. Graeber M.B., Muller U. Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders // J. Neurol. Sci. – 1998. – 153, №2. – P.251-263.
9. Kristal B.S., Chen J.J. Sensitivity of mitochondrial transcription to different free radical species // Free Radical Biol. – 1994. – 16. – P. 323-329.
10. Kunz W.S., Goussakov I.V., Beck H., Elger C.E. Altered mitochondrial oxidative phosphorylation in hippocampal slice of kainate-treated rats // Brain Res. – 1999. – 826, №2. – P.236-242.
11. Li Z., Yamamoto T., Ono J. et al. The effect of pentilene-tetrazole-kindling on the extracellular glutamate and taurine levels in the frontal cortex of rats // Neurosci. Lett. – 2000. – 282, N 1-2. – P.117-119.
12. Lowry O.H., Rosebough N.I., Farr A.L., Rantall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1. – P.265-275.
13. Mc Namara J.O. Identification of Genetic Defect of an Epilepsy: Strategies for Therapeutic Advances // Epilepsia. – 1994. – Suppl. 1. – P.51-57.
14. Riedel G., Wetzel W., Reymann K.G. Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in long-term potentiation, learning and memory // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. – 1996. – 20. – P.761-787.
15. Schuelke M., Bakker M., Stoltenburg G. et al. Epilepsia partialis continua associated with a homoplasmic mitochondrial tRNA (Ser)YCN mutation // Ann. Neurol. – 1998. – 44, №4. – P.700-704.
16. Todor I.N., Chekhun V.F. The respiration of mitochondria from the liver of rats treated with cisplatinum and millimeter range electromagnetic radiation // Exp. Oncol. – 1995. – 17, № 4. – P.137-140.
17. Torbersen T., Mathiesen E., Aasly J. Epilepsy in a mitochondrial disorder // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. – 1991. – 54, №12. – P.1073-1076.
18. Ueda Y., Doi T., Tokumaru J. et al. Kindling phenomena induced by repeated short-term high potassium stimuli in the ventral hippocampus of rats: on-line monitoring of extracellular glutamate overflow // Exp. Brain Res. – 2000. – 135, N 2. – P.199-203.
19. Wallace D.C. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases // Science. – 1992. – 256. – P.628-632.

*Ін-т нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова
АМН України*

*Матеріал надійшов
до редакції 6.09.2001*