

Влияние Гипоксии Перенесенной В Период Органогенеза На Динамику Активности Сукцинатдегидрогеназы Головного Мозга Крыс

Э.Ш. Абиева

Институт физиологии им. А.И.Гараева НАНА, ул. Шариф-заде -2, Баку AZ 1100, Азербайджан;
E-mail: elnaz.abiyeva@gmail.com

Выявлена динамика изменения активности фермента сукцинатдегидрогеназы в ткани, цитозольной и митохондриальной субфракциях различных структур головного мозга крыс в раннем постнатальном онтогенезе (17-ти и 30-ти дневные) и у половозрелых (90-дневные) особей, подвергнутых гипоксии в период органогенеза пренатального развития. Было установлено, что гипоксия приводит к повышению активности фермента.

Ключевые слова: Гипоксия, сукцинатдегидрогеназа, головной мозг, крысы

ВВЕДЕНИЕ

Кислородная недостаточность – основа патологических процессов при многих заболеваниях и критических состояниях, часто наблюдается в клинике и является одной из центральных проблем, приводящих к нарушению функционального состояния органов и систем, выраженность которых неодинакова. Головной мозг при гипоксии страдает вследствие высокой потребности в кислороде, глюкозе, высокого содержания липидов и интенсивного обмена. Гипоксия мозга влияет на организм, сопротивляемость которого к кислородной недостаточности определяется состоянием его физиологических и биохимических систем, индивидуальной чувствительностью к гипоксии. При дефиците кислорода в органах реализуется стереотипная неспецифическая перестройка метаболизма для поддержания гомеостаза, заключающаяся в уменьшении потребления кислорода клетками, снижении интенсивности окислительного фосфорилирования, торможении биосинтеза метаболитов пластического обмена, активации свободнорадикальных процессов. Изменения параметров метаболизма при гипоксии носят фазный характер. Выделяют компенсаторную стадию полной обратимости метаболических изменений, которые в последующем сменяются стадиями частично обратимых и необратимых изменений. Дефицит кислорода требует максимальной мобилизации и напряжения потенциальных адаптивных возможностей организма. Гипоксия - один из значимых повреждающих факторов, влияющих на развитие головного мозга (Кассиль и др., 2000). Развивающийся мозг человека и млекопитающих чувствителен к гипоксии. Ее воздействие в пренатальный период, по мнению клиницистов, вызывает наибольшее число отклонений в развитии нервной си-

стемы, составляющих большую гетерогенную группу нейропатологий (Семенов и др., 2012; Соколова и др., 2002). Экспериментальные исследования на животных показали, что пренатальная гипоксия, как и материнский стресс, приводит к нарушению формирования поведенческих реакций, развитию двигательной активности, ослаблению способности к обучению, снижению массы тела (Бельченко, 2001; Ватаева и др., 2001). Согласно современным представлениям, любая форма кислородной недостаточности в первую очередь сопровождается развитием так называемой биоэнергетической гипоксии, в основе которой лежат фазные изменения активности митохондриальных ферментных комплексов, что приводит к постепенно нарастающему энергодефициту и, в конечном счете, к нарушениям специфической функции клеток. В медицинской литературе в последние 10-15 лет широко обсуждается роль сукцинатоксидазного пути как срочного компенсаторного механизма, используемого клеткой на ранней стадии гипоксии. Переход на преимущественное окисление сукцината представляет собой один из механизмов повышения устойчивости клетки к гипоксии. Лимитирующими факторами при этом являются наличие достаточного количества янтарной кислоты (сукцината) и активность сукцинатдегидрогеназы. Так как одним из критериев оценки выраженности гипоксии является уровень активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), в нашей работе были представлены результаты исследования изменений активности данного фермента. Этот энзим в значительной мере определяет скорость потребления кислорода и образования АТФ в дыхательной цепи. Как известно, для поддержания энергетики животных клеток в условиях кислородного голодания при аноксии и гипоксии целесообразно использовать субстраты,

способные участвовать в анаэробном образовании сукцината, тогда как в гипоксических условиях имеет смысл использовать собственно сукцинат (Гришина, 1997; Гончаренко и др., 1999). На уровне митохондрий (МХ) состояния гипоксии и аноксии отличаются по степени восстановленности дыхательных переносчиков. При аноксии, характеризующейся отсутствием доставки кислорода к клеткам, все переносчики дыхательной цепи полностью восстановлены. При гипоксии, когда частично сохранена доставка кислорода, наиболее удаленные от кислорода пиридиннуклеотиды - НАД и НАДФ, как правило, восстановлены на 100%, тогда как часть флавопротеидов и цитохромный участок дыхательной цепи остаются в значительной мере окисленными. Такие различия в степени восстановленности пиридиннуклеотидов и флавопротеидов позволили предположить, что в условиях гипоксии имеется возможность для преимущественного окисления янтарной кислоты, поскольку, сукцинатдегидрогеназа в отличие от большинства других дегидрогеназ является флавинозависимым ферментом. При этом всегда возникал вопрос, откуда берется сукцинат, если НАД-зависимые субстраты окисляться не могут. С другой стороны, известно, что в аноксических условиях сукцинат не окисляется, а накапливается в результате образования из НАД-зависимых субстратов и аминокислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на крысах линии «Вистар». Животных подвергали гипоксии в период органогенеза 5 дней в течение 10 минут ежедневно смесью, содержащей 95% азота и 5% кислорода. Дальнейшие исследования проводились на крысятах, полученных от этих самок по достижении ими 17-ти, 30-ти дневного и 3-х месячного возраста. Ткани гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1:9, центрифугировали при 20 000g в течении 20 мин, для отделения митохондриальной фракции от цитозольной жидкости. В ткани, в цитозольной и митохондриальной фракциях определяли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в орбитальной, лимбической и сенсомоторной коре, а также в гипоталамусе и мозжечке. Статистический анализ результатов проводился с учетом критерия Стьюдента (Ллойд и Ледерман, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование активности сукцинатдегидрогеназы в структурах головного мозга крыс,

перенесших гипоксию в период органогенеза показали, что активность СДГ в большинстве структур повышается. У 17-ти дневных животных рост активности наблюдался в ткани всех исследуемых структур головного мозга, за исключением лимбической коры. Таким образом, в орбитальной коре активность повышалась на 161%, в сенсомоторной на 13%, в гипоталамусе и мозжечке на 56% и 44% соответственно, а в лимбической коре активность снижалась на 23% по сравнению с контрольными значениями (таблица 1).

В цитозоле структур головного мозга 17-ти дневных крысят также выявлен рост активности в сенсомоторной коре, гипоталамусе и мозжечке на 103%, 21% и 47%, соответственно. В цитозоле орбитальной коры активность снижается на 52%, в то время как в лимбической коре остается на уровне контроля. Анализ данных полученных в этой возрастной категории показал что, у 17-ти дневных животных наибольшее повышение активности СДГ наблюдается в сенсомоторной коре по сравнению с другими структурами. Это объясняется тем что, эта часть мозга тесно связана с органами чувств и в данный период развития идет процесс формирования зрительных анализаторов, требующий дополнительных энергетических затрат.

Вторая возрастная группа животных - это 30-ти дневные животные, перенесшие гипоксию в период органогенеза. В ткани всех исследуемых структур активность СДГ изменялась. За исключением гипоталамуса, где активность оставалась на уровне контроля, и лимбической коры, где она снижалась на 69%, в остальных структурах шел рост активности. Таким образом, в ткани орбитальной коры он составил – 23%, в сенсомоторной коре – 45,7% и в мозжечке – 77% по сравнению с контролем.

Результаты, полученные в митохондриальной фракции 30-ти дневных крыс, следующие: рост активности в орбитальной коре – на 80%, в гипоталамусе – на 68% и мозжечке – на 94%. В сенсомоторной и лимбической коре динамика активности не наблюдалась, т.е. соответствовала контрольным значениям (таблица 2).

Наиболее высокие показатели роста активности фермента сукцинатдегидрогеназы у 30-ти дневных крыс наблюдались в цитозольной фракции гипоталамуса и мозжечка – 314% и 163%, соответственно. Аналогичная тенденция роста активности характерна и для лимбической коры и составила 157% по сравнению с контролем.

Очередная возрастная группа, в которой были проведены эксперименты – это трехмесячные животные. Анализируя результаты, полу-

ченные в этой группе опытных крыс, мы можем сказать, что в большинстве исследуемых структур идет рост активности СДГ. В ткани лимбической коры она повысилась на 50%, в гипоталамусе – на 28%, в мозжечке – на 108%. В орбитальной и сенсомоторной коре изменения не наблюдались (таблица 3).

В митохондриальной фракции 3-х месячных животных динамика роста активности СДГ имела следующий характер: в лимбической коре – 36%, сенсомоторной коре – 60%, мозжечке – 40% и гипоталамусе – 11%. Максимальное повышение активности наблюдалось в

цитозольной фракции мозжечка – 311%, а в лимбической коре, гипоталамусе и орбитальной коре имело следующие значения – 57%, 37%, 36%, соответственно. В сенсомоторной коре активность понизилась на 59%.

Анализируя данные, полученные в результате экспериментов, проведенных в трех возрастных группах животных, мы пришли к выводу, что наиболее ярко выраженные показатели роста активности СДГ были получены у 30-ти дневных животных в гипоталамусе и мозжечке по сравнению с другими структурами. Объясняется это тем, что именно период 2-й-4-й

Таблица 1. Активность сукцинатдегидрогеназы в структурах головного мозга 17-ти дневных крыс (ммоль СДГ/1 мин/1 г ткани).

Структуры	Показатели	Ткань	Митохондрии	Цитозоль
Орбитальная кора	Контроль	6,5±0,6	17,5±1,5	45±4,2
	Гипоксия	17,5±1,5	20±2,03	23,5±2,7
	%	261	114	52
	P	<0,001	>0,05	<0,01
Сенсомоторная кора	Контроль	14,5±1,2	30±2,9	16±1,5
	Гипоксия	16,5±1,3	29,8±2,5	32,5±2,4
	%	113	100	203
	P	>0,05	>0,05	<0,001
Лимбическая кора	Контроль	9,00±0,82	25,5±2,5	30±2,9
	Гипоксия	7,0±0,6	17±1,8	29,9±2,9
	%	77	66	100
	P	<0,05	<0,05	>0,05
Гипоталамус	Контроль	8±0,9	2,8±0,2	16,5±0,82
	Гипоксия	12,5 ±1,2	3±0,3	20±1,7
	%	156	100	121
	P	<0,05	>0,05	>0,05
Мозжечок	Контроль	4,5±0,4	4±0,37	20±1,9
	Гипоксия	6,5±0,6	7,5±0,6	29,5±2,8
	%	144	187	147
	P	<0,05	<0,01	<0,05

Таблица 2. Активность сукцинатдегидрогеназы в структурах головного мозга 30-ти дневных крыс (ммоль СДГ/1 мин/1 г ткани).

Структуры	Показатели	Ткань	Митохондрии	Цитозоль
Орбитальная кора	Контроль	32,5±3,2	155±14,5	6,5±0,6
	Гипоксия	40±3,5	28±2,8	4,5±0,3
	%	123	180	69
	P	<0,01	<0,001	<0,05
Сенсомоторная кора	Контроль	17,5±1,5	15±1,2	35±3,2
	Гипоксия	8±0,7	15±1,2	31,5±2,8
	%	45,7	100	90
	P	<0,01	>0,05	0,05
Лимбическая кора	Контроль	21±2,2	18±1,6	7±0,6
	Гипоксия	14,5±1,5	18±1,6	18±1,6
	%	69	100	257
	P	<0,05	>0,05	<0,001
Гипоталамус	Контроль	17±1,5	14,5±1,2	7±0,7
	Гипоксия	17±1,5	24,5±2,5	29±2,5
	%	100	168	414
	P	>0,05	<0,05	<0,001
Мозжечок	Контроль	4,5±0,4	9±0,82	9,5±0,9
	Гипоксия	8±0,7	17,5±1,5	25±2,4
	%	177	194	263
	P	<0,01	<0,01	<0,001

Таблица 3. Активность сукцинатдегидрогеназы в структурах головного мозга 3-хмесячных крыс (ммоль СДГ/1 мин/1 г ткани).

Структуры	Показатели	Ткань	Митохондрии	Цитозоль
Орбитальная кора	Контроль	17,8±1,5	4±0,3	1,1±0,1
	Гипоксия	18±1,5	4±0,3	1,5±0,2
	%	100	100	136
	P	>0,05	>0,05	>0,05
Сенсомоторная кора	Контроль	0,5±0,03	10±0,8	13,5±1,3
	Гипоксия	0,5±0,03	16±1,2	8±0,7
	%	100	160	59
	P	>0,05	<0,01	<0,01
Лимбическая кора	Контроль	10±1,2	12,5±1,3	9,5±0,82
	Гипоксия	15±1,5	17±1,5	15±1,3
	%	150	136	157
	P	<0,05	<0,05	<0,001
Гипоталамус	Контроль	12,5±1,5	9±0,8	12±1,2
	Гипоксия	16±1,2	10±1,2	16,5±1,5
	%	128	111	137
	P	>0,05	>0,05	>0,05
Мозжечок	Контроль	6±0,4	5±0,32	8,5±0,7
	Гипоксия	12,5±1,2	7±0,5	35±3,2
	%	208	140	411
	P	<0,01	<0,05	<0,001

недели развития для крыс связан с интенсивной миелинизацией, завершением развития нейронов, появлением электрической активности коры больших полушарий и двигательных реакций при электростимуляции мозга. Т.е. именно в это время наблюдается активация биосинтетических реакций мозга (Балан и др., 1998; Белова и др., 2008).

Наряду с увеличением количества митохондрий в головном мозге с возрастом примерно вдвое повышается содержание основных компонентов дыхательной цепи митохондрий: цитохромов и флавопротеидов. Накопление компонентов дыхательной цепи митохондрий мозга идет неравномерно: показано медленное нарастание уровня цитохромов в первые 15 дней постнатального развития и более интенсивное в интервале между 15-м и 30-м днями; к концу последнего периода содержание основных переносчиков дыхательной цепи митохондрий близко к уровню, характерному для взрослых животных (Кондрашова и др., 1973; Лузинов, 1980).

Повышенная активность сукцинатдегидрогеназы у 3-х месячных животных во всех исследуемых структурах головного мозга крыс и в особенности в мозжечке и гипоталамусе по сравнению с другими структурами, связана с тем, что это период полового созревания животных, характеризующийся увеличением энергетических затрат организма и активацией биохимических процессов. Следует отметить что, разнонаправленность изменения активности СДГ в некоторых структурах головного мозга крыс

может быть связана со структурной организацией данного участка на данном этапе развития.

Как видно из результатов, гипоксия, перенесенная в период органогенеза, приводит к росту активности СДГ. Реакция со стороны СДГ клеток возможна при возникновении затруднения в переносе электронов на участке дыхательной цепи НАДН - КоQ и начала роста в клетке восстановленного НАДН, что имеет место при снижении концентрации кислорода в клетке <30 мкМ. ЕД50 гипоксии по сдвигу соотношения НАДН/НАД⁺ соответствует 12.6 мкМ, по изменению отношения АТФ/АДФ - 7 мкМ. Известно, что при снижении концентрации кислорода в среде до 10 мкМ наступают затруднения НАДН-оксидазного пути окисления в цикле Кребса при переносе электронов на участке НАДН-КоQ с увеличением восстановленных эквивалентов НАДН/НАД⁺. В ответ в клетке активизируются компенсаторные метаболические потоки с интенсификацией сукцинатоксидазного окисления, минуя данный участок и сокращающего транспорт электронов к цитохромоксидазе, тем самым поддерживая окислительное фосфорилирование, синтез АТФ и в целом клеточное дыхание в условиях развития I фазы тканевой гипоксии. Впервые адаптивная роль перехода на преимущественное использование янтарной кислоты как субстрата окисления в митохондриях при гипоксических состояниях и рост в этих условиях активности сукцинатдегидрогеназы была обнаружена М.Н.Кондрашовой (Кондрашова, 1978).

ЛИТЕРАТУРА

- Балан П.В., Маклакова А.С., Крушинская Я.В. и др.** (1998) Сравнительный анализ устойчивости при острой гипобарической гипоксии новорожденных и взрослых экспериментальных животных. *Акушерство и гинекология*, №3: 20-23
- Белова Н.Г. Желев В.А. Агаркова Л.А. Колесникова И.А. Габитова Н.А.** (2008) Особенности энергетического обмена клеток в системе мать-плод-новорожденный при беременности, осложненной гестозом. *Сибирский медицинский журнал*, Т.23 (4-1): 7-10.
- Бельченко Л.А.** (2001) Адаптация человека и животных к гипоксии разного происхождения. *Соросовский образовательный журнал, сер. биология*, 7: 33-38
- Ватаева Л.А., Косткин В.Б., Макухина Г.В. и др.** (2001) Поведение в "открытом поле" у самок и самцов крыс, подвергавшихся действию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития. *Докл. РАН*, 380(1): 125-127.
- Гришина Е.В.** (1997) Энергетическая эффективность различных путей анаэробного образования сукцината в митохондриях животных. *Автореф. дис. ... канд. биол. наук*. Пушино, 17 с.
- Гончаренко Е.Н., Антонова С.В., Шестакова С.В. и др.** (1999) Функциональные и биохимические характеристики острой гипобарической гипоксии у новорожденных и взрослых крыс. *Акуш. и гинекология*, №3: 51-53.
- Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Матвеев Е.Л., Капанадзе Г.Д.** (2012) Влияние острой гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей. *Биомедицина*, №3: 73-78.
- Соколова А., Маслова М.В., Маклакова А.С., Ашмарин И.П.** (2002) Пренатальный гипоксический стресс: физиологические и биохимические последствия, коррекция регуляторными пептидами. *Успехи физиологических наук*, 33(2): 56-57.
- Кассиль В.Г., Отеллин В.А., Хожай Л.И., Косткин В.Б.** (2000) Критические периоды развития головного мозга. *Российский физиол. Журн.*, 86(11):1418-1425.
- Кондрашова М.Н., Маевский Е.И.** (1973) Митохондрии. Биохимия и ультраструктура. М.: Наука: 112-129.
- Кондрашова М.Н., Маевский Е.И.** (1978) Митохондриальные процессы во временной жизнедеятельности. *Материалы Всесоюзного семинара*. Пушино. М.: Наука: 6-12.
- Ллойд Э., Ледерман У.** (1990) Справочник по прикладной статистике. *Финансы и статистика*. В 2-х томах. Т. 2: 526 с.
- Лузиков В.Н.** (1980) Регуляция формирования митохондрий. М.: Наука, 316 с.

Orqanogenez Dövründə Siçovulların Baş Beynində Suksinatdehidrogenaza Fermentinin Fəallığının Dinamikasına Hipoksiyanın Təsiri

Е.Ş.Абиева

AMEA A.İ.Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu

Prenatal ontogenezin orqanogenez dövründə hipoksiyaya məruz qalmış aq siçovulların postnatal ontogenezin erkən (17- və 30-günlük) və cinsi yetkinlik (90-günlük) dövrlərində baş beyin müxtəlif strukturlarının toxuma, sitozol və mitoxondri subhüceyrə fraksiyalarında suksinatdehidrogenaza fermentinin fəallığının dəyişmə dinamikası aşkar olunmuşdur. Təyin olunub ki, hipoksiyanın təsiri nəticəsində fermentin fəallığı artır.

Açar sözlər: Hipoksiya, suksinatdehidrogenaza, baş beyin, siçovullar

**The Influence Of Hypoxia On The Dynamics Of Succinate Dehydrogenase Activity
Of Rats Brain During Organogenesis Period**

E.Sh.Abiyeva

Institute of Physiology named after A.I.Garayev, ANAS

The dynamic of changes in the activity of succinate dehydrogenase in tissue, sotozol and mitochondrial subfractions of rats brain during early postnatal ontogenesis (17 and 30-day) and in the mature period (90-day), underwent hypoxia in prenatal organogenesis is revealed. It is established that hypoxia lead to increased activity of enzyme.

Key words: *Hypoxia, succinate dehydrogenase, brain, rats*