

*Т. С. Милош, Н. Е. Максимович,
И. К. Дремза*

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕСПИРАТОРНОЙ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА И КОЛИЧЕСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ У ОВАРИЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В результате проведения экспериментальных исследований на 30 белых беспородных крысах с субтотальной ишемией головного мозга после двухсторонней овариэктомии выявлено нарушение дыхательной функции митохондрий их головного мозга в условиях введения субстратов дыхания: сукцината и L-малат/L-глутамата, путем регистрации изменений показателей потребления кислорода митохондриями: скорость сукцинат- и L-малат/L-глутамат – зависимого эндогенного (базального) дыхания (V_1) уменьшалась на, 49,3 %, $p < 0,001$ и 48,5 %, $p < 0,001$ соответственно, скорость субстрат-зависимого

□ Оригинальные научные публикации

дыхания (V_2) и сопряженного с фосфорилированием (V_3) снизилась в 1,7 и 1,2 раза, $p < 0,05$ соответственно, наряду с уменьшением после внесения только L-малат/L-глутамата скорости дыхания после расходования внесенного АДФ (V_4) на 35,3 %. Одновременно мы наблюдали ухудшение морфологических свойств эндотелия кровеносных сосудов, характеризующееся увеличением в 2 раза ($p < 0,05$) числа эндотелиоцитов, свидетельствуя о десквамации эндотелиальной выстилки.

Ключевые слова: овариэктомия, головной мозг, дыхание митохондрий, эндотелиоциты.

T. S. Milosh, N. Ye. Maksimovich, I. K. Dremza

CHARACTERISTIC OF THE RESPIRATORY FUNCTION OF BRAIN MITOCHONDRIA AND THE AMOUNT OF CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS IN OVARIECTOMIZED RATS

The results of experimental researches of 30 white outbred rats with subtotal brain ischemia following bilateral ovariectomy were injected respiratory substrates – succinate and L-malate/L-glutamate. We revealed impairment of the respiratory function in rat brain mitochondria by registering the changes in mitochondrial oxygen consumption values: the speed of succinate and L-malate/L-glutamate – dependent endogenous (basal) respiration (V_1), reduced by, to 49,3 %, $p < 0,001$ and 48,5 %, $p < 0,001$, respectively, the speed of substrate-dependent respiration (V_2) and dual phosphorylation (V_3) dropped 1,7 and 1,2 times, $p < 0,05$, respectively, along with a reduction after making only L-malate/L-glutamate in the rate of respiration after consuming the included ADF (V_4) by 35,3 %. Simultaneously, we observed a deterioration of the morphological properties of the blood vessel endothelium, characterized by the increase in 2 times ($p < 0,05$) in the number of endothelial cells, indicating desquamation of the endothelial lining.

Key words: ovariectomy, brain, mitochondrial respiration, endothelial cells.

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания служат основной причиной смерти женщин в большинстве стран мира [6], при этом, следствием их инвалидности является мозговой инсульт [2]. Рост этих заболеваний обусловлен угасанием яичников [10]. Нарастающий эстрогенный дефицит женских половых гормонов из-за хирургически одномоментного выключения функции яичников вызывает более выраженную патологию функции эндотелия сосудов и морфологические изменения эндотелиальной выстилки, являясь фактором риска атеросклероза, ранней ИБС, артериальной гипертензии, инсультов, поражения периферических артерий, наряду с развитием инсулинорезистентности, висцерального ожирения и метаболических нарушений, объединенных рамками менопаузального метаболического синдрома [4].

Известно, что в результате ишемии головного мозга даже при небольшой степени гипоксии митохондрии, играющие важнейшую роль в процессах тканевого дыхания, становятся уязвимы [1]. К тому же, значимым критерием повреждения эндотелия служит количество циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) [3].

В связи с этим, в условиях частичной ишемии головного мозга и удаления яичников изучение нарушений дыхательной функции митохондрий головного мозга и количества циркулирующих эндотелиоцитов представляет значительный интерес.

Цель исследований – изучить респираторную активность митохондрий головного мозга и количество циркулирующих эндотелиоцитов у овариэктомизированных крыс.

Материалы и методы. В экспериментах 30 крыс-самок массой 200–250 г, находившихся на стандартном рационе вивария в соответствии с нормами содержания лабораторных животных и предварительно адаптированных к условиям проведения эксперимента, были разделены на 4 группы: контрольную группу ($n = 8$) составили интактные ложнопериовариованные крысы. Животным 1-й опытной группы ($n = 8$) выполнена двухсторонняя овариэктомия (ДО), крысам 2-й опытной группы ($n = 6$) смоделирована субтотальная ишемия головного мозга (СИГМ) в течение 3 суток, животным 3-й опытной группы ($n = 8$) после ТО произведена СИГМ на протя-

жении 3 суток. При выполнении экспериментов руководствовались принципами гуманного отношения к животным. Моделирование СИГМ у крыс осуществляли перевязыванием левой общей сонной артерии в течение 3-х суток с помощью хлопчатобумажных нитей в двух местах открытым хирургическим способом [8]. Перед наложением лигатур артерию выделяли от окружающей соединительной ткани и нерва, затем рану ушивали. Кровь забирали путем катетеризации общей сонной артерии с добавлением гепарина (20 ЕД/мл). Выполнение ТО, СИГМ в течение 3-х суток, взятие крови и декапитацию для исследований осуществляли в условиях наркоза (внутримышечно тиопентал натрия, 60 мг/кг).

Изучение респираторной функции митохондрий проводили на изолированных митохондриях головного мозга. Для этого головной мозг крысы после ее декапитации быстро извлекали из черепной коробки на холоду (0–4 °С), осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и помещали в ледяную среду выделения (0,32 М сахарозы, 10 mM Трис-НСI, 1 mM ЭДТА, pH 7,4, объем 50 мл), затем немедленно гомогенизировали (при 0°C) в среде выделения (в соотношении 1:10), используя гомогенизатор Поттера-Эвельгейма с тefлоновым пестиком, согласно модифицированному классическому методу Lai и Clark (1974) [9].

Выделенные митохондрии ресуспендировали в среде выделения (концентрация белка 35–40 мг/мл) и хранили на льду в короткой пробирке. Инкубационная среда для дыхания митохондрий включала 0,17 М сахарозу, 40 mM KCl, 20 mM Трис-НСI, 5 mM K_2HPO_4 , 8 mM KHCO_3 , 0,5 mM ЭДТА, pH 7,4. Скорость митохондриального дыхания регистрировали полярографически [5], используя платиново-серебряный электрод Кларка, встроенный в термостатируемую герметическую ячейку объемом 1,75 мл, при 26,5 °С. Регистрация изменений напряжения кислорода (pO_2) в суспензии митохондрий осуществлялась с помощью электронного потенциометра КСП-4. Калибровку электрода Кларка проводили путем последовательного продувания через ячейку воздуха (pO_2 воздуха) и газообразного азота ($\text{pO}_2 = 0$ мм рт. ст.). Суспензию митохондрий вносили в ячейку со средой инкубации (0,125 М сахароза, 0,02 М Трис-НСI, 0,05 KCl, 0,02 М K_2HPO_4 , 0,0005 М MgSO_4 , 0,001 М ЭДТА, pH 7,5) в количестве, обеспечивающем конечную концентрацию белка 1 мг/мл. Активацию дыхания

митохондрий осуществляли введением субстратов (сукцинат – 5 mM или L-малат/L-глутамат – 2/5 mM, соответственно) и АДФ (200 μM) через специальные каналы, исключая контакт содержимого ячейки с атмосферным кислородом. По полученным полярограммам рассчитывали скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях: V_1 – скорость эндогенного (базального) дыхания, V_2 – скорость субстрат-зависимого дыхания, V_3 – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием (после внесения АДФ), V_4 – скорость дыхания после расходования внесенного АДФ. Определяли показатели, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: коэффициент акцепторного контроля ($\text{AK} = V_3/V_2$), коэффициент дыхательного контроля ($\text{ДК} = V_3/V_4$) и коэффициент фосфорилирования АДФ/О. Скорости дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях выражали в нанogramмах кислорода, потребляемого за 1 минуту в расчете на 1 мг белка митохондрий.

Степень морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов изучали по количеству десквамированных циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в 1 л плазмы крови методом микроскопии [7].

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы «Statistica 6,0». После проверки данных на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка рассчитывали медиану, межквартильный интервал (25-й и 75-й процентиля). Различия между группами устанавливали с помощью критериев Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В группе овариэктомированных (ОЭ) животных наблюдалось значительное снижение большинства параметров дыхания митохондрий относительно показателей группы ложнопериовариованных крыс.

У этих самок при внесении в качестве субстрата дыхания сукцината, отмечено снижение скорости базального дыхания (V_1) на 10,6 % ($n = 8$, $p < 0,05$), составив 12,7 (12,4; 12,9) нг ат. O_2 /мин/мг/белка, в то время как в контроле значение этого показателя равнялось 14,2 (13,8; 14,7) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$); скорости субстрат-зависимого дыхания (V_2) – на 20,6 % ($n = 8$, $p < 0,001$), составив 22,3 (22,2; 22,4) нг ат. O_2 /мин/мг/белка, у интактных животных 28,1 (25,8; 30,9) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$); скорости дыхания в усло-

□ Оригинальные научные публикации

виях потребления экзогенного АДФ (V_4) – на 33,7 % ($n = 8$, $p < 0,001$), равняясь 16,5 (16,3; 16,8) нг ат. O_2 /мин/мг/белка, у ложноперирированных 24,9 (22,9; 25,5) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$); коэффициента фосфорилирования – на 15,1 % ($n = 8$, $p < 0,05$), составив 1,35 (1,19; 1,4) нг ат. O_2 /мин/мг/белка, в то время как у интактных 1,59 (1,56; 1,63) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$). Не было отмечено изменений скорости АДФ-стимулированного дыхания (V_3) и коэффициентов акцепторного (V_3/V_2) и дыхательного контроля (V_3/V_4) ($p > 0,05$).

Аналогичные закономерности в изменении параметров респираторной активности наблюдались у крыс 1-й опытной группы в случае использования в качестве НАД-зависимых субстратов смеси L-малат/L-глутамат: V_2 снизилась на 28,2 % ($n = 8$, $p < 0,001$), равняясь 19,9 (19,7; 20,0), V_3 – на 32,8 % ($n = 8$, $p < 0,05$), составив 29,3 (29,7; 29,9), V_4 – на 33,2 % ($n = 8$, $p < 0,001$), равняясь 12,7 (12,3; 12,9). Изменений V_1 , коэффициентов V_3/V_2 , V_3/V_4 и АДФ/О относительно группы контрольных крыс не было установлено ($p > 0,05$).

У животных с СИГМ в ходе внесения в качестве субстрата дыхания сукцината, наблюдалось значительное снижение V_2 , V_3 и V_4 на 19,2 %, 11,3 и 26,5 % составив 20,7 (17,6; 23,6) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 6$, $p < 0,001$), 33,7 (26,7; 36,2) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 6$, $p < 0,001$) и 18,3 (16,3; 21,9) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 6$, $p < 0,05$), соответственно, чем у контрольных самок, хотя не выявлено достоверных различий ($p > 0,05$) относительно ОЭ крыс и животных 3-й опытной группы. У данных самок не установлено изменений V_1 ($p > 0,05$), коэффициентов V_3/V_2 ($p > 0,05$), V_3/V_4 ($p > 0,05$) и коэффициента АДФ/О ($p > 0,05$).

В группе крыс с СИГМ при внесении в качестве субстрата дыхания L-малат/L-глутамата регистрировали похожие с 1-й опытной группой изменения параметров респираторной активности митохондрий головного мозга: снижение V_1 на 12,9 %, составив 14,9 (14,9; 18,3) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 6$, $p < 0,05$), чем у контрольной группы, не отмечено изменений ($p > 0,05$) по сравнению с животными на фоне ТО и крысами 3-й опытной группы. У этих самок обнаружено снижение V_2 , V_3 и V_4 на 36,2 %, 39,2 % и 39,4 %, равняясь 27,1 (22,6; 31,2) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 6$, $p < 0,05$), 40,8 (37,4; 57,0) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 6$, $p < 0,001$) и 17,7 (12,2; 19,0) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 6$, $p < 0,05$), соответственно,

относительно овариэктомированных крыс, что было несколько больше ($p > 0,05$), чем у животных 3-й опытной группы и не наблюдалось изменений в сравнении с ложноперирированной группой ($p > 0,05$). У данных самок не отмечено изменений коэффициентов, отражающих сопряжение процессов окисления и фосфорилирования V_3/V_2 и V_3/V_4 , наряду с АДФ/О ($p > 0,05$).

В группе ОЭ крыс наряду с СИГМ на протяжении 3 суток при внесении в качестве НАД-зависимого субстрата дыхания сукцината наблюдалось снижение V_1 на 49,3 % ($n = 8$, $p < 0,001$), составив 7,2 (6,0; 12,9) нг ат. O_2 /мин/мг/белка, чем у интактной группы и на 47,4 % по сравнению животными на фоне церебральной ишемии головного мозга ($p < 0,05$), в то время как достоверных различий по сравнению с 1-й опытной группой выявлено не было ($p > 0,05$). У этих крыс установлено снижение V_2 на 53 %, равняясь 13,2 (9,8; 18,2) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$) и на 23,9 % V_3 – 28,9 (20,7; 30,5) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$) относительно интактных ($p < 0,05$), чем у ОЭ самок ($p < 0,05$) в 1,7 и 1,2 раза, соответственно, и животных 2-й опытной группы ($p < 0,05$) на 36,2 % и 14,2 %, соответственно. У данных крыс не выявлено достоверных различий V_4 ($p > 0,05$), коэффициентов V_3/V_2 ($p > 0,05$), V_3/V_4 ($p > 0,05$) и коэффициента АДФ/О ($p > 0,05$).

У животных 3-й опытной группы при внесении в качестве субстрата дыхания L-малат/L-глутамата регистрировали снижение V_1 на 48,5 %, составив 8,8 (7,2; 10,9) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$, $p < 0,001$), чем у контрольных животных и 1,7 раза ($p < 0,05$), относительно крыс на фоне ТО, однако выявлялась тенденция к снижению ($p > 0,05$) по сравнению с крысами 2-й опытной группы. Кроме того, у этих животных отмечено снижение V_2 и V_3 , равняясь 21,7 (16,8; 24,3) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$) и 32,7 (31,5; 35,8) нг ат. O_2 /мин/мг/белка ($n = 8$) на 21,7 % и 25 %, соответственно, относительно интактных ($p < 0,05$), в сравнении с крысами 2-й опытной групп ($p < 0,05$) поровну в 1,2 раза, при этом не изменялась в сравнении с ОЭ. При этом, выявлено снижение V_4 на 35,3 % только по сравнению с контрольной ($p < 0,05$) группой крыс. У данных животных не регистрировалось изменений коэффициентов, отражающих сопряжение процессов окисления и фосфорилирования V_3/V_2 и V_3/V_4 , наряду с АДФ/О ($p > 0,05$).

Подсчет количества ЦЭК у крыс на фоне ТО и СИГМ выявил наличие эндотелиальной дисфунк-

ции, сопровождавшейся интенсивной отслойкой эндотелия кровеносных сосудов. Количество ЦЭК в плазме крови крыс 1-й опытной группы составило $22,5 (21,0; 24,0) \times 10^4/\text{л}$ ($n = 6$, $p < 0,001$), что превышало уровень контрольной группы в 5 раз, равняясь $4,5 (2,5; 5,0) \times 10^4/\text{л}$ ($n = 8$). У животных 2-й опытной группы количество ЦЭК составило $23,0 (18,0; 28,0) \times 10^4/\text{л}$ ($n = 8$), что в 5,1 раза больше ($p < 0,001$), чем у интактных и наблюдается тенденция к повышению ($p > 0,05$) относительно крыс с ДО. У ОЭ животных с перевязыванием левой общей сонной артерии количество ЦЭК равнялось $9,0(5,0; 11,0) \times 10^4/\text{л}$ ($n = 8$), что было больше в 2 раза ($p < 0,05$) относительно ложноперирированной группы и не выявлено достоверных отличий ($p > 0,05$) в сравнении с 1-й и 2-й опытными группами.

Выявлено ухудшение респираторной функции митохондрий головного мозга крыс после ТО в условиях применения субстратов дыхания (сукцината и L-малат/L-глутамата), путем регистрации изменений параметров потребления кислорода митохондриями. В ходе частичной ишемии головного мозга на протяжении 3-суток при недостатке эстрогенов наблюдается патология тканевого дыхания, характеризующаяся снижением активности кислородзависимых механизмов и компенсаторной активации анаэробных механизмов энергообразования. Дефицит кислорода вызывает снижение окисления НАДН, торможение цикла Кребса и накопление глутамата, в результате чего происходит повышение активности глутамат-кальциевого каскада, что оказывает дополнительный нейротоксический эффект и служит одним из центральных звеньев патогенеза ишемического инсульта. Увеличенное число эндотелиоцитов свидетельствует о нарушении целостности эндотелиальной выстилки, являясь показателем выраженности сосудистой патологии.

Итак, полученные результаты свидетельствуют, что при частичной ишемии головного мозга на фоне недостатка половых гормонов, обусловленного тотальной овариэктомией, наблюдается значительное угнетение аэробной респираторной активности головного мозга крыс и разобщение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях. Выявленное повышение числа эндотелиоцитов у овариэктомизированных крыс и животных с субтотальной ишемией головного мозга показало, что ведущим патогенетическим механизмом индуцированной

менопаузы наряду с ишемическими повреждениями головного мозга может служить нарушение морфофункциональных свойств эндотелия кровеносных сосудов. Главенствующая роль эндотелия в регуляции сосудистого тонуса и кровотока подтверждает факт, что его нарушение может явиться важным патогенетическим механизмом изменений кровообращения у животных, испытывающих выраженный эстрогенный дефицит.

Литература

1. Бурчинский, С. Г. Стратегия мембранопротекции при ишемическом инсульте: задачи и возможности / С. Г. Бурчинский // Международный неврологический журнал. – 2016. – № 5 (83). – С. 137–142.
2. Ведение женщин с сердечно-сосудистым риском в пери- и постменопаузе: консенсус российских кардиологов и гинекологов / И. Е. Чазова [и др.] // Практическая медицина. – 2009. – Т. 2(34). – С. 5–18.
3. Диагностическая ценность определения циркулирующих эндотелиальных клеток крови / Н. Н. Петрищев [и др.] / Клиническая и лабораторная диагностика. – 2001. – № 1. – С. 50–52.
4. Сердечно-сосудистая патология у женщин в постменопаузе и влияние заместительной гормональной терапии / Е. И. Баранова [и др.] // Клиническая и экспериментальная кардиология; под ред. Е. В. Шляхто. – Санкт-Петербург, 2005. – С. 159–172.
5. Уильямс, Б. Методы практической биохимии / Б. Уильямс, К. Уилсон // пер. с англ. под ред. акад. С. Е. Северина и А. Д. Виноградова. – М.: изд-во «МИР», 1978. – С. 235–244.
6. *European Cardiovascular Disease Statistics*, 2nd edn / S. Peterson [et al.] // London: British Heart Foundation. – 2005.
7. Hladovec, J. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats / J. Hladovec, P. Rossman // *Thromb. Res.* – 1973. – Vol. 3. – P. 665–674.
8. Hossman, K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia / K. A. Hossman // *Cardiovascular Resarch.* – 1998. – Vol. 39. – P. 106–120.
9. Lai, J. C. K. Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain / J. C. K. Lai, J. B. Clark // *Methods in Enzymology.* – 1974. – Vol. 60. – P. 51–64.
10. *Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: a meta-analysis* / F. Atsma [et al.] // *Menopause.* – 2006. – Vol. 13. – P. 265–279.

Поступила 28.10.2016 г.