УДК 615.224:576.3

ВПЛИВ ПОХІДНИХ ЯНТАРНОЇ КИСЛОТИ НА ПЕРЕКИСНЕ ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ БАРБІТУРАТНІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ

Олійник С.А., к.б.н., доцент

Медичний інститут Української асоціації народної медицини (м. Київ)

ВСТУП

Відомо, що барбітурати належать до класичних блокаторів першого комплексу дихального ланцюга - вони блокують NADH-оксидазний комплекс дихального ланцюга (NADH-CoQ-редуктазу) та інші флавопротеїни в концентраціях 10^{-3}-10^{-4} М [1]. Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що застосування похідних янтарної кислоти - натрію сукцинату, суфану та яктону - на фоні експериментальної барбітуратної інтоксикації сприяє поновленню транспорту електронів через решту ланок дихального ланцюга за рахунок шунтування другого дихального комплексу, який переносить електрони від флавінових відновлювальних еквівалентів на коензим Q - $FADH_2$-CoQ-редуктази. При цьому значно збільшується швидкість поглинання кисню і швидкість фосфорилювання ADP ізольованими мітохондріями печінки отруєних етаміналом натрію щурів та нормалізується коефіцієнт фосфорилювання [2].

З іншого боку, активація процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) є одним з найголовніших факторів пошкодження клітин при гіпоксичних станах та тканинній ішемії [3, 4]. Відомо, що, як аеробний синтез основного макроергу клітин - аденозинтрифосфорної кислоти (ATP), так і генерація активних форм кисню (АФК) протікають у дихальному ланцюзі мітохондрій одночасно [5]. Проте в нормі тільки близько 5% кисню, який споживають мітохондрії, витрачається на утворення його активних форм; при патології цей показник значно підвищується [6, 7]. Інтенсифікація утворення активних кисневих інтермедіатів при порушенні клітинного гомеостазу, у свою чергу, стимулює деградацію макромолекул за вільнорадикальним механізмом [8]. Таким чином, співвідношення одно- і двохелектронного переносу у дихальному ланцюзі мітохондрій має значний вплив на розвиток гіпоксії, на що вказують дані про антигіпоксичну ефективність антирадикальних агентів, а також активаторів та субстратів окислювального фосфорилювання [9, 10, 11].

Раніше було встановлено, що системи ферментативного ПОЛ як джерело електронів можуть використовувати як NADPH, так і NADH [12]. Виходячи з наявності надлишку NADH, який створюється при блокаді барбітуратами NADH-CoQ-редуктазного комплекса, можна припустити значну роль NADH-залежного ПОЛ у механізмах вільнорадикального пошкодження мітохондрій при барбітуратній інтоксикації. Враховуючи наявність у похідних янтарної кислоти антиоксидантних властивостей, можна припустити, що в механізмі їх протекторної дії при барбітуратних інтоксикаціях певне значення може мати також і нормалізація окислювального гомеостазу. Тому метою нашого дослідження стало вивчення впливу похідних янтарної кислоти на процеси ферментативного (NADPH- та NADH-залежного) та неферментативного (аскорбат-залежного) ПОЛ мітохондрій печінки щурів при експериментальній барбітуратній інтоксикації.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Роботу виконували на 30 білих нелінійних щурах масою 220-250 г. Тварини були поділені на 5 експериментальних груп по 6 у кожній. Щури першої групи правили за контроль. Тваринам II-V груп внутрішньоочеревинно вводили розведений на фізіологічному розчині етамінал-натрій з розрахунку 60 мг/кг [13, 14, 15]. По досягненні стану наркозу (відсутність реакції на зовнішні подразники, відсутність рогівкого рефлексу, збереження тільки частого поверхневого дихання) щурам III-V груп внутрішньоочеревинно вводили препарати: третьої групи - натрію сукцинат у дозі 200 мг/кг, четвертої групи - суфан у дозі 70 мг/кг, п'ятої групи - яктон у дозі 70 мг/кг [2]. Тварин забивали декапітацією через 50-60 хв після введення препаратів (через 80-90 хв після введення етаміналу натрію). У мітохондріях печінки щурів, виділених методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифузі ЦЛР-1 (СРСР) [16], визначали інтенсивність неферментативного (аскорбат-залежного) і ферментативного (NADPH- та NADH-залежного) ПОЛ за накопиченням малонового діальдегіду (МДА) [17, 12], а також вміст відновлених нікотинамідних коферментів (NADH та NADPH) [18].

Результати досліджень обробляли статистично з використанням критерію Ст'юдента [19].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що при експериментальній барбітуратній інтоксикації інтенсивність NADH-залежного ПОЛ у мітохондріях печінки щурів зростає на 44,0%, при цьому в них спостерігається закономірне (за рахунок блокування першого комплексу дихального ланцюга) підвищення вмісту NADH на 68,8% при практично незмінному рівні NADPH (табл. 1). Що стосується аскорбат-залежного (неферментативного) та NADPH-залежного ПОЛ, то при гострому отруєнні етаміналом натрію в мітохондріях печінки спостерігається лише тенденція до їх підвищення. Отже, можна констатувати активацію вільнорадикальних процесів у мітохондріях печінки щурів при інтоксикації етаміналом натрію переважно за рахунок NADH-залежного ПОЛ, що пояснюється збільшенням у мітохондріях вмісту NADH.

Таблиця 1.- Вплив похідних янтарної кислоти на процеси ПОЛ (мкмоль МДА на 1 мг білку за 15 хв) та на вміст відновлених нікотинамідних коферментів (нмоль на 1 мг білка) в мітохондріях печінки щурів при інтоксикації етаміналом натрію.

Група тварин	Аскорбат-залежне ПОЛ	NADH-залежне ПОЛ	NADPH-залежне ПОЛ	NADH	NADPH
I група	295±22	248±26	227±20	1,6±0,3	1,9±0,4
II група	332±27	357±30*	251±23	2,7±0,4*	1,8±0,4
III група	318±24	262±31**	244±31	2,5±0,5*	1,9±0,5
IV група	323±28	273±28**	235±26	2,6±0,5*	1,9±0,4
V група	307±30	256±33**	225±29	2,7±0,5*	1,8±0,3

Примітка. * - $p<0,05$ порівняно з контролем (I групою);

** - $p<0,05$ порівняно з отруєнням етаміналом натрію (II група).

Застосування похідних янтарної кислоти на фоні експериментальної барбітуратної інтоксикації значно знижує активність NADH-залежного ПОЛ у мітохондріях печінки, проте практично не впливає на вміст у них відновлених нікотинамідних коферментів (табл. 1). Отже, антиоксидантна дія похідних янтарної кислоти не пов'язана із зменшенням у мітохондріях вмісту NADH.

Таким чином, механізм протекторної дії похідних янтарної кислоти при гострій барбітуратній інтоксикації досить складний і не зводиться лише до поновлення транспорту електронів через дихальний ланцюг за рахунок шунтування другого дихального комплексу. Велике значення має також і антиоксидантна дія цих сполук. Такий висновок узгоджується з результатами досліджень A.Bindoli et al. (1982) [20] і В.В.Жирнова та співавт (1998) [21]. Так, A.Bindoli et al. було показано, що янтарна кислота захищає мітохондрії від пероксидного стресу. В.В.Жирнов та співавт. встановили, що суфан *in vitro* в концентраціях 0,5-5,0 мкМ захищає мітохондрії міокарду щурів від ушкоджуючої дії перекису водню. Характерно, що в концентрації 0,5 мкМ препарат не тільки корегує параметри, що характеризують ефективність фосфорилювання, але й нормалізує швидкість споживання кисню. На підставі отриманих даних авторами робиться висновок про те, що однією з особливостей механізму дії суфану є його ефективний захист мітохондріальної функції при розвитку пероксидного стресу. Крім того, на їх думку, дія суфану на мітохондрії опосередкується різними шляхами залежно від концентрації: припускають, що в максимальних концентраціях суфан має субстратну активність, оскільки його компонентом є сукцинат, а в мінімальних - не виключають регуляторного ефекту препарату на гомеостаз Ca^{2+} у мітохондріях, вихід якого з цих органел стимулюється перекисом водню [22].

Нашими попередніми дослідженнями встановлено значну антиоксидантну активність натрію сукцинату, суфану та яктону на моделях фракціонованого рентгенівського опромінення та максимального фізичного навантаження [23]. Дослідженнями *in vitro* встановлено, що вони не мають вираженої антирадикальної активності у відношенні стабільного радикала дифенілпікрилгідразилу і тому є антиоксидантами непрямої дії [24]. Механізм антиоксидантної дії цих препаратів значною мірою можна пояснити їх комплексоутворенням з деякими лігандами. Так, нами показано, що константи стійкості ($K_{ст}$) комплексів суфану та яктону з тривалентним залізом ($FeCl_3$) складають 186 та 102 л/моль відповідно, що свідчить про специфічний характер взаємодії цих речовин з Fe^{3+} [24, 25]. Очевидно, вона деякою мірою пояснює їх антиоксидантні властивості. Так, не викликає сумнівів те, що суфан та яктон, не маючи відновлювальних властивостей, знижують активність процесів ПОЛ за рахунок комплексоутворення з іонами Fe^{3+}, у які перетворюються іони Fe^{2+} (центри радикалоутворення). Крім того, специфічний характер має і взаємодія яктону з NADH ($K_{ст}$=130 л/моль) [25]. Отже, не виключено, що комплексоутворення яктону з NADH може відігравати певну роль у гальмуванні препаратом NADH-залежного ПОЛ.

ВИСНОВКИ

1. При експериментальній барбітуратній інтоксикації інтенсивність NADH-залежного ПОЛ у мітохондріях печінки щурів зростає на 44,0%, при цьому в них спостерігається підвищення вмісту NADH на 68,8% при практично незмінному рівні NADPH.

2. Застосування похідних янтарної кислоти (натрію сукцинату, суфану та яктону) на фоні експериментальної барбітуратної інтоксикації значно знижує активність NADH-залежного ПОЛ у мітохондріях печінки, проте практично не впливає на вміст у них відновлених нікотинамідних коферментів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ. - М.: Мир, 1991. - 544 с.
2. Олійник С., Чекман І., Горчакова Н. та ін. Корекція порушень клітинного дихання при експериментальній барбітуратній інтоксикації // Галицький лікарський вісник. - 2000. - Т. 7, № 3. - С. 96-98.
3. Ruuge E.K., Ledenev A.N., Lakomkin V.L., Konstantinov A.A., Ksenzenko M.Y. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion // Amer. J. Physiol. - 1991. - Vol. 261, № 4, Suppl. - P. 81-86.
4. Shlater M., Gallagher K.P., Adkins S. Hydrogen peroxide generation by mitochondria isolated from regionally ischemic and nonischemic dog miocardium // Basic Res. Cardiol. - 1990. - Vol. 85, № 4. - P. 318-329.
5. Minakami H., Takahashi A., Suzuki S. Mechanism of mithochondrial O_2 generation and electron transport // Med. Biochem. and Chem. Aspects Free Radicals; Proc. 4th Biennial Gen. Meet Soc. Free Rad. Res. (Kyoto, 9-13 Apr., 1988). - Amsterdam etc., 1989.- Vol. 1. - P. 83-87.
6. Fridovich I. The chemistry and biology of superoxide: central concepts and residual problems // J. Cell Biochem. - 1991. - Suppl. 15c. - P. 200.
7. Van Lente F. Free radicals // Anal. Chem. - 1993. - Vol. 65, № 12. - P. 3748-3778.
8. Kristal B.S., Kim J.D., Yu B. Tissue-specific susceptibility to peroxyl radical-mediated inhibition of mitochondrial transcription // Redox Report. - 1994. - Vol. 1, № 1. - P. 51-55.
9. Кумерова А.О., Шкестерс А.П., Шкестерс И.Я. Изучение кардиозащитного эффекта α-токоферола и пантенола на модели экспериментальной ишемии-реперфузии изолированного сердца // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1994. - Т. 117, № 6. - С. 574-576.
10. Scarlett J.L., Packer M.A., Porteous C.M., Murphy M. Alterations to glutathione and nicotinamide nucleotides during the mitochondrial permeability transition induced by peroxynitrite // Biochem. Pharmacol. - 1996. - Vol. 52, № 7. - P. 1047-1055.
11. Vendemiale G., Grattagliano I., Altomare E., Turturro N., Guerrieri F. Effect of acetaminophen administration on hepatic glutathione compartmentation and mitochondrial energy-metabolism in the rat // Biochem. Pharmacol. - 1996. - Vol. 52, № 8. - P. 1147-1154.
12. Зоценко Д.М., Олійник С.А., Хмелевський Ю.В. NADH як субстрат ферментативного перекисового окиснення ліпідів // Укр. биохим. журн. - 1993. - Т. 65, № 4. - С. 78-82.
13. Ерофеев С.В., Воронов С.Н., Рехтер М.Д., Зуев В.С. Характеристика некоторых показателей кислородного режима в мышцах белых крыс при наркозе нембуталом // Тез. докл. конф. молодых научных работников, посвященной 60-летию образования СССР. - Иваново, 1982. - С. 101-102.
14. Линенко В.И., Милонова Н.П., Сливко С.Ф. Изменение интенсивности поглощения кислорода тканями головного мозга под влиянием этаминала натрия в различных условиях // Функционально-структурные основы системной деятельности и механизмы пластичности мозга. - Вып. 2. - М., 1973. - С. 142-144.
15. Милонова Н.П., Сливко С.Ф. Поглощение кислорода тканями мозга при разных условиях медикаментозного сна и наркоза // Матер. 2 съезда фармакологов УССР (Львов, 30 мая - 1 июня 1973 г.). - К., 1973. - С. 154-155.
16. Jonson D., Lardy H. Issolation of liver or kidney mitochondria // Methods in Enzymology. - N.-Y.: Acad. Press, 1969. - Vol. 10. - P. 94-96.

17. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 259 с.

18. Дедов В.Н., Демин О.В., Черняк В.Я., Черняк Б.В. Индукция неселективной проницаемости внутренней мембраны в деэнергизированных митохондриях // Биохимия. - 1999. - Т. 64, вып. 7. - С. 965-973.

19. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. - К.: Морион, 2000. - 320 с.

20. Bindoli A., Cavallini L., Jocelyn P. Mitochondrial lipid peroxidation by cumene hydroperoxidation and its prevention by cuccinate // Biochem. Biophys. Acta. - 1982. - Vol. 681, № 3. - P. 496-503.

21. Жирнов В.В., Лебедь О.І., Гриневич О.Й., Лаврушенко Л.Ф. Вплив суфану на дихання і окислювальне фосфорилювання при стимуляції процесів пероксидації у мітохондріях серця щурів // Ліки. - 1998. - № 3. - С. 48-51.

22. Roychoudhury S., Ghosh S.K., Chakraborti T. Role of Hydroxyl Radical in the Oxidant H_2O_2-Mediated Ca^{2+} Release from Pulmonary Smooth-Muscle Mitochondria // Molecular and Cellular Biochemistry. - 1996. - Vol. 159, № 2. - P. 95-103.

23. Чекман І., Горчакова Н., Олійник С. та ін. Динаміка перекисного окислення ліпідів в органах щурів при опроміненні та антиоксидантний ефект суфану // Галицький лікарський вісник. - 2000. - Т. 7, № 2. - С. 85-88.

24. Чекман І.С., Горчакова Н.О., Олійник С.А. та ін. До механізму антиоксидантної дії суфану // Вісник пробл. біол. і мед. - 1998. - Вип. 19. - С. 109-118.

25. Олійник С.А., Горчакова Н.О., Лозинський М.О., Бобков В.М. Комплексоутворення натрію сукцинату та яктону з компонентами біомембран, іншими біолігандами, солями металів, деякими лікарськими засобами // Гигиена труда: Сб. - К., 2000. - Вып. 31. - С. 343-351.