

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СУКЦИНАТСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Вик. В. Яснецов¹, Е. П. Просвинова², Е. Г. Цублова¹

В полярографическом исследовании установлено, что сукцинатсодержащие препараты цитофлавин (0,85 мМ сукцината), мексидол и амтизола сукцинат (в концентрации 0,85 мМ) в отличие от реамберина (0,045 мМ сукцината) примерно в равной степени (на 35 – 45%) увеличивают скорость потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга крыс. Стимулирующий эффект препаратов практически полностью подавляется ингибитором комплекса II дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназа) малонатом.

Ключевые слова: сукцинатсодержащие препараты, митохондрии, полярография, потребление кислорода

ВВЕДЕНИЕ

Препараты янтарной кислоты в настоящее время широко применяют при лечении различных заболеваний [4, 6]. Во многом это обусловлено важной ролью янтарной кислоты в биохимических процессах в клетке, в частности, в качестве субстрата окисления в цикле трикарбоновых кислот – центральном звене метаболизма. Установлено, что сукцинат – лиганд рецептора GPR91. Он является сигнальной молекулой, осуществляющей внутриклеточные и межклеточные взаимодействия и способствующей множеству опосредованных вторичных метаболических процессов, положительно влияющих не только на энергетику, но и на метаболизм и разные функции организма [3, 13, 14].

Эти факты стимулировали синтез соединений, содержащих соли янтарной кислоты. Действительно, с введением в структуру сукцината появляются (в отличие от основания) разнообразные фармакологические эффекты, что зачастую существенно расширяет возможности применения данных средств. Примером таких соединений являются 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина гидрохлорид (действующее вещество лекарственного препарата эмоксипина) и его сукцинатсодержащее производное этилметилгидроксипиридина сукцинат (на его основе созданы лекарственные препараты мексидол, мексикор и др.), меглюмин (вспомогательное вещество ряда лекарственных препаратов, например, цитофлавина) и меглюмина натрия сукцинат (действующее вещество реамберина), а также амтизол и амтизола сукцинат и др. [1, 5, 8].

Сравнительного исследования действия указанных выше сукцинатсодержащих препаратов на потребление кислорода митохондриями клеток мозга животных

не проводилось. В связи с этим в настоящей работе исследовали их влияние на дыхание митохондрий клеток головного мозга крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Митохондрии выделяли из ткани головного мозга 59 белых нелинейных крыс-самцов (массой 200 – 270 г, декапитированных под общей анестезией диэтиловым эфиром) с помощью дифференциального центрифугирования по методике [12]. Содержание белка в изолированных митохондриях определяли по методу М. М. Bradford [11].

Потребление кислорода изолированными митохондриями регистрировали полярографически с помощью стандартного электрода Кларка в 1 мл среды инкубации (маннит – 215 мМ, сахароза – 75 мМ, MgCl₂ – 2 мМ, KН₂РO₄ – 10 мМ, бычий сывороточный альбумин – 0,1 %, ЭГТА – 1 мМ, НЕРЕС – 20 мМ, рН 7,4) при постоянном перемешивании. Скорость потребления кислорода (O₂) выражали в наномолях (нМ) O₂ за 1 мин в расчете на 1 мг белка митохондрий.

Поскольку объем каждого из исследуемых препаратов не превышал 1 мл, были избраны следующие концентрации данных препаратов и их компонентов. Цитофлавин содержит в 1 мл раствора кислоты янтарной 100 мг, никотинамида 10 мг, инозина 20 мг и рибофлавина мононуклеотида 2 мг, т.е. в 1 мл содержится 0,85 мМ сукцината. В соответствии с этим сукцинат в отдельности использовали также в концентрации 0,85 мМ (в качестве вещества сравнения). Для выявления эффекта инозина и рибофлавина мононуклеотида (в виде субстанции) они были взяты в значительно большей концентрации (чем в цитофлавине) – 1 мМ. Реамберин содержит в 1 л раствора 5,28 г янтарной кислоты, т.е. в 1 мл содержится 0,045 мМ сукцината. В связи с этим сукцинат в отдельности также использовали в концентрации 0,045 мМ (в качестве вещества сравнения). Препараты сравнения мексидол (состоящий из 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и сукцината), эмоксипин (2-этил-6-метил-3-гидроксипириди-

¹ ОАО “Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ”, 142450, Московская область, Ногинский район, Старая Купавна, ул. Кирова, 23.

² ГБОУ ВПО “Московский государственный медико-стоматологический университет” Минздравсоцразвития России.

на гидрохлорид), компонент этих препаратов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин, а также амтизол (3,5-диамино-1-тиа-2,4-дiazол) и амтизола сукцинат использовали в концентрации 0,85 мМ для сопоставления их эффектов с цитофлавином.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы StatPlus 2009 Professional.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что исходная скорость потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга крыс составляла в среднем $4,8 \pm 0,1$ нМ O_2 /мин·мг белка митохондрий ($n = 97$). Цитофлавин (в 1 мл раствора содержится 0,85 мМ сукцината) и отдельно сукцинат в концентрации 0,85 мМ в равной степени увеличивали скорость потребления кислорода на $42 \pm 4\%$ и $43 \pm 4\%$ (таблица). Компоненты цитофлавина инозин и рибофлавина мононуклеотид в концентрации 1 мМ практически не изменяли данный показатель. Следовательно, можно предположить, что указанный эффект цитофлавина обусловлен входящим в его состав сукцинатом, а также наличием никотинамида.

Другой сукцинатсодержащий препарат – реамберин (в 1 мл раствора содержится 0,045 мМ сукцината) и отдельно сукцинат в концентрации 0,045 мМ значительно не изменяли скорость потребления кислорода митохондриями.

В свою очередь мексидол в концентрации 0,85 мМ значительно ($p < 0,001$) увеличивал скорость потребления

Влияние сукцинатсодержащих препаратов (цитофлавин, реамберин, мексидол, амтизола сукцинат), некоторых их компонентов и эмоксипина на скорость потребления кислорода (нМ O_2 /мин·мг белка митохондрий, $M \pm m$) митохондриями клеток головного мозга крыс

Вещество (концентрация, мМ)	Исходная скорость потребления кислорода	Скорость потребления кислорода под влиянием вещества
Цитофлавин (0,85 мМ сукцината), $n = 12$	$4,8 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,3^*$
Сукцинат (0,85), $n = 10$	$4,7 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,3^*$
Инозин (1), $n = 8$	$4,9 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$
Рибофлавина мононуклеотид (1), $n = 8$	$4,8 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,2$
Реамберин (0,045 мМ сукцината), $n = 8$	$4,7 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$
Сукцинат (0,045), $n = 8$	$4,8 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,2$
Мексидол (0,85), $n = 11$	$4,7 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,4^*$
Эмоксипин (0,85), $n = 8$	$4,8 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,2$
2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин (0,85), $n = 8$	$4,8 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,2$
Амтизол (0,85), $n = 8$	$4,9 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,2$
Амтизола сукцинат (0,85), $n = 8$	$4,9 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,3^*$

Примечание. * $p < 0,001$ – значимость различий по сравнению с исходной скоростью (критерий Стьюдента).

кислорода на $45 \pm 6\%$. Эмоксипин и 2-этил-6-метил-3-ГП (основание, входящее в состав мексидола и эмоксипина) в концентрации 0,85 мМ практически не влияли на данный показатель.

Амтизола сукцинат (в отличие от амтизола) в концентрации 0,85 мМ значимо ($p < 0,001$) увеличивал скорость потребления кислорода на $35 \pm 5\%$.

Ингибитор комплекса II дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназа) малонат практически полностью подавлял стимулирующие эффекты сукцината и цитофлавина, мексидола и амтизола сукцината, что свидетельствует об участии комплекса II в реализации действия этих сукцинатсодержащих препаратов.

Полученные нами результаты частично подтверждаются данными литературы. Так, в лаборатории Л. Д. Лукьяновой в сходных экспериментальных условиях получены близкие результаты в отношении влияния мексидола и эмоксипина на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс [3, 10]. Установлено также, что карбомилопроизводное 3-гидроксипиридина проксипин (как и мексидол содержащее в структуре сукцинат) вызывал специфические метаболические изменения, свидетельствующие об активации сукцинатоксидазного окисления; при этом аналог проксипина, не содержащий сукцинат, подобных изменений не вызывал [2, 3].

Что касается амтизола, то ранее была обнаружена его способность в условиях нормоксии стимулировать дыхание нейронов медицинской пивавки, активируя НАДН-дегидрогеназное окисление субстратов в цикле Кребса [7, 9]. Однако в наших экспериментах действовал лишь сукцинатсодержащий препарат амтизола сукцинат, а сам амтизол был неэффективен. Это можно объяснить различными условиями опытов.

Итак, сукцинатсодержащие препараты цитофлавин, мексидол и амтизола сукцинат в отличие от реамберина примерно в равной степени увеличивают скорость потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга крыс. Данный стимулирующий эффект препаратов практически полностью подавляется ингибитором комплекса II дыхательной цепи малонатом.

ВЫВОДЫ

1. Цитофлавин (0,85 мМ сукцината), мексидол и амтизола сукцинат (в концентрации 0,85 мМ) в отличие от реамберина (0,045 мМ сукцината) примерно в равной степени (на 35 – 45%) увеличивают скорость потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга крыс.

2. Ингибитор комплекса II дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназа) малонат практически полностью подавляет стимулирующие эффекты цитофлавина, мексидола и амтизола сукцината.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Воронина, *Фарматека*, 6, 35 – 38 (2009).

2. Л. Д. Лукьянова, Э. Л. Германова, Т. А. Цыбина и др., *Патогенез*, **6**(3), 32–36 (2008).
3. Л. Д. Лукьянова, *Труды XV Российского национального конгресса “Человек и лекарство”*, Москва, **1**, 84 – 105 (2009).
4. Е. И. Маевский, М. Л. Учитель, Е. В. Гришина, *Рос. биомед. журн.*, **11**, 78 – 92 (2010).
5. В. В. Марышева, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **5**(1), 17 – 27 (2007).
6. А. Б. Песков, Е. И. Маевский, М. Л. Учитель, М. Н. Кондрашова, *Рос. биомед. журн.*, **6**, 508 – 514 (2005).
7. С. С. Сергеева, И. Н. Январева, О. Ю. Урюпов, А. Б. Томчин, *Фармакол. и токсикол.*, **54**(3), 22 – 24 (1991).
8. Е. В. Силина, С. А. Румянцева, *Вестн. интенсивной тер.*, **2**, 82 – 88 (2006).
9. А. В. Смирнов, И. В. Зарубина, Б. И. Криворучко, *Экспер. и клин. фармакол.*, **59**(5), 56 – 58 (1996).
10. Г. Н. Чернобаева, В. Е. Романов, А. М. Дудченко и др., *Итоги науки и техники. ВИНИТИ. Фармакология. Химико-терапевтические средства*, **27**, 26 – 35 (1991).
11. М. М. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 – 254 (1976).
12. N. Brustovetsky, J. M. Dubinsky, *J. Neurosci*, **20**, 103 – 113 (2000).
13. Y. Hakak, K. Lehmann-Bruinsma, S. Phillips, et al., *J. Leukoc. Biol.*, **85**(5), 837 – 843 (2009).
14. P. Sapieha, M. Sirinyan, D. Hamel, et al., *Nat. Med.*, **14**(10), 1067 – 1076 (2008).

Поступила 22.02.12

COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF SUCCINATE-CONTAINING PREPARATIONS ON MITOCHONDRIAL RESPIRATION IN RAT BRAIN CELLS

Vic. V. Yasnetsov¹, E. P. Prosvirova², and E. G. Tsublova¹

¹ All-Russia Center for Safety of Biologically Active Substances, ul. Kirova 23, Staraya Kupavna, Moscow oblast, 142450, Russia

² Moscow State University of Medicine and Dentistry, ul. Delegatskaya 20/1, Moscow, 127473, Russia

It has been established by polarographic measurements that preparations containing succinate, such as cytoflavin (0.85 mM succinate), mexidol, and amtizol succinate (at a concentration of 0.85 mM) but not reamberin (0.045 mM succinate), nearly equally (by 35 – 45%) increase oxygen consumption in rat brain mitochondria. On the other hand, malonate – inhibitor of the respiratory complex II (succinate dehydrogenase) of mitochondrial chain suppressed the stimulating effect of these drugs.

Key words: Succinate-containing preparations, mitochondria, polarographic measurements, oxygen consumption