

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ НИКОТИНАМИДА ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

Р. И. Ижбульдин, В. В. Плечев, И. Р. Закиров

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Цель данного эксперимента заключалась в исследовании состояния мозгового энергетического статуса в условиях острой изолированной церебральной ишемии, а также ишемии с использованием никотинамида —предшественника НАД и ингибитора ПАРП. Результаты работы показывают, что в условиях острой ишемии головного мозга уровень адениловых нуклеотидов в его ткани резко меняется: содержание АТФ по сравнению с контролем снижается до 42,2%, а уровень АДФ и АМФ увеличивается, достигая 260,9% и 233,3% соответственно. Ишемия мозга сопровождается незначительными изменениями суммарного содержания адениловых нуклеотидов (на 9,1%), резким падением коэффициента АТФ/АДФ до 16,2% и снижением величины энергетического заряда до 63,8% по сравнению с контролем. Применение никотинамида в условиях церебральной ишемии способствовало восстановлению энергетического метаболизма. Уровень АТФ увеличился по сравнению с контролем 1,5 раза, и в 3,5 раза по сравнению с изолированной ишемией, а уровень АДФ и АМФ в мозге не снижался после окклюзии. Ишемия на фоне применения никотинамида сопровождалась увеличением суммарного содержания адениловых нуклеотидов в мозге на 39,8%, коэффициент АТФ/АДФ значительных изменений не претерпевал, а величина энергетического заряда увеличивалась до нормальных величин. Профилактическое введение никотинамида при острой церебральной ишемии способствует сохранению энергетического статуса клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Острые нарушения мозгового кровообращения являются актуальной медицинской и социальной проблемой. Несмотря на большой арсенал церебропротективных средств, продолжается поиск новых лекарственных препаратов в целях защиты мозга при острой ишемии.

Механизм физиологических и патофизиологических реакций, развивающихся в мозге на молекулярном уровне при ишемии, включает в себя каскад метаболических превращений, одним из основных звеньев которого является энергетический обмен.

Снижение перфузии ткани мозга сопровождается уменьшенной доставкой кислорода из кровеносного русла к клеткам, где он участвует в реакциях аэробного образования энергии. Развивающееся вслед за этим гипоксическое состояние представляет собой сложный фазный процесс.

Наиболее ранним ответом на гипоксическое воздействие является усиление интенсивности НАД-зависимого пути окисления [1, 2]. Дальнейшее же нарастание гипоксического состояния приводит к снижению интенсивности окисления НАД-зависимых субстратов и связанного с ним окислительного фосфорилирования, чувствительности дыхания к специфическим ингибиторам

НАД-зависимого участка дыхательной цепи [3]. Следствием перечисленных изменений является потеря клеткой способности к окислению ряда энергетических субстратов.

Нарушение функции митохондриального ферментного комплекса на раннем этапе гипоксии не приводит к значимым изменениям внутриклеточной концентрации аденозинтрифосфата (АТФ) и функциональной активности клеток. Это обусловлено активацией компенсаторных метаболических процессов, позволяющих сохранить энергосинтезирующую функцию клетки [4].

Наращение кислородной недостаточности сопровождается уменьшением содержания АТФ, появляется линейная зависимость дыхания и концентрации АТФ от парциального давления кислорода [3, 5, 6].

На последних этапах кислородного голодания уровень энергетического дефицита становится достаточным для запуска основных механизмов, приводящих к нарушению жизнедеятельности и гибели клетки. Стремительное увеличение концентрации аденозинмонофосфата (АМФ) сопровождается активацией протеинкиназной системы, что является дополнительным механизмом разрушения клеточных мембран [7].

Нейроны, подверженные тяжелой ишемии, а следовательно, и быстро развивающимся грубым нарушениям энергетического метаболизма, не

могут поддерживать ионный градиент мембран за счет подавления Na^+/K^+ -АТФ-азной ферментной системы [8]. Скорость развития аноксической деполяризации мембран нейронов зависит от глубины и длительности ишемии и ведет к некротической смерти клетки.

Информация об изменении состояния мембранных структур и рецепторов, определяемая картиной перераспределения протеинкиназ на мембранах, передается с помощью систем вторичных мессенджеров (аденилатциклаз, протеинкиназ, фосфатаз) к ядру клетки, что является сигналом к включению единого молекулярного механизма, реализующего универсальный алгоритм ответа ткани мозга на повреждающее воздействие [9, 10]. Таким образом, острая церебральная ишемия активирует комплекс генетических программ, которые приводят к последовательной экспрессии большого числа генов.

Биохимические процессы генной экспрессии определяются доступностью АТФ и в целом сохранностью энергетического метаболизма [11]. Первой реакцией ткани мозга на снижение мозгового кровотока является снижение синтеза матричной РНК и белков [12]. Для поддержания белкового синтеза требуется адекватный мозговой кровоток, необходимый для поддержания продукции АТФ [13, 14].

Относительно неспецифичной реакцией генома на ишемическое повреждение является индукция генов раннего реагирования [9, 15, 16]. Их включение происходит уже в первые минуты ишемии в ответ на изменения активного ионного транспорта и потенциала мембран в поврежденной области, стимуляцию нейрональных рецепторов продуктами глутаматной «эксайтотоксичности» и оксидантного стресса [15, 17]. От рецепторов и мембран сигнал о повреждающем клетку воздействии передается к ядру нейронов, где и начинается экспрессия генов [9, 10]. Активность синтезированных белков изменяется под влиянием посттрансляционной модификации по механизмам фосфорилирования и дефосфорилирования в виде реакции поли(АДФ-рибозил)ирования [18].

Экспрессия большинства генов раннего реагирования приводит к синтезу ДНК-связанных протеинов, или транскрипционных факторов, которые в свою очередь вызывают экспрессию широкого спектра генов [19].

Поли(АДФ-рибозил)ирование представляет собой реакцию посттрансляционной модификации белков. Процесс синтеза поли(АДФ-рибозы) (ПАР)

предшествует началу репарации повреждений ДНК. Синтез ПАР локализован в ядре, его осуществляет фермент поли(АДФ-рибоза)-полимераза (ПАРП).

Экспрессия ПАРП-кДНК в ядрах детально для клеток. Это связано с тем, что внутриядерное накопление ПАР сопровождается подавлением репликации ДНК и транскрипции [20; 21]. Донором АДФ-рибозы является никотинамид-динуклеотид (НАД). Активность ПАРП возрастает в 500 раз и более при связывании с участками разрыва ДНК. Чрезмерная активация ПАРП при массивных разрывах ДНК, сильно снижая содержание внутриклеточного НАД, ведет к подавлению гликолиза и митохондриального дыхания и вызывает гибель клетки по варианту некроза.

Известно, что НАД регулирует жизненно важные процессы в клетке; он является кофактором для процесса гликолиза и цикла трикарбоновых кислот, восстанавливая АТФ, в большинстве клеточных процессов. НАД служит также предшественником никотинамид-динуклеотидфосфата (НАДФ), который действует как кофактор в пентозном цикле [22].

В результате реакции посттрансляционной модификации белков остатки АДФ-рибозы, связываясь с белками-акцепторами, формируют разветвленный полимер [23]. Первый остаток АДФ-рибозы присоединяется к гамма-карбоксильной группе глутаминовой кислоты белка-акцептора (в качестве акцепторов ПАР может выступать целый ряд ассоциированных с хроматином белков, включая, гистоны, топоизомеразы, ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы и саму поли(АДФ-рибоза)-полимеразу) [24]. Присоединение каждого остатка АДФ-рибозы к полимеру сопровождается образованием молекулы никотинамида. Последний включается в реакции ресинтеза НАД, протекающие непосредственно в ядре.

Одним из подходов, направленных на снижение риска развития церебральной ишемии в период временного прекращения кровотока по несущему сосуду, является использование фармакологической защиты головного мозга. В связи с этим научный и практический интерес представляет применение препаратов, блокирующих реакцию ПАР путем ингибирования клеточного фермента ПАРП. На животных моделях ингибирование ПАРП лекарственными препаратами уменьшает повреждение тканей, связанное с ишемическим инсультом и инфарктом миокарда [25].

Ингибиторы ПАРП, а также вещества, улавливающие свободные кислородные радикалы, предо-

тврщают резкое падение уровня НАД, подавляют синтез ПАР и увеличивают выживаемость клеток. Показано, что ингибиторы ПАРП вызывают уменьшение области инфаркта мозга при окклюзии средней мозговой артерии [26]. Такие же результаты были получены и при нокаутировании гена ПАРП депривацией [27].

К числу активных ингибиторов ПАРП относится амид никотиновой кислоты — никотинамид. Никотинамид по строению и действию близок к никотиновой кислоте, входит в состав коферментов (НАД, НАДФ), пируватдегидрогеназного комплекса и принимает участие в окислительно-восстановительных процессах в организме.

Никотинамид обладает высокой избирательностью к ПАРП. При использовании никотинамида был выявлен целый ряд неспецифических эффектов: действие его в качестве антиоксиданта, влияние на метаболизм глюкозы, липидов и нуклеотидов, подавление общего синтеза ДНК, РНК и белка [22, 23].

Целью нашей работы явилось изучение влияния никотинамида на энергетический обмен при острой циркуляторной ишемии мозга.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Опыты проведены на трех группах половозрелых крыс-самцов массой 180—200 г (по 8 крыс в каждой группе). Ишемию мозга вызывали у крыс под уретановым наркозом окклюзией обеих общих сонных артерий, в течение 90 мин. Первая группа — ложнооперированные животные (контроль); вторая группа — животные с окклюзией обеих общих сонных артерий без применения никотинамида; третья группа — животные с окклюзией обеих общих сонных артерий, получавшие никотинамид дважды: внутрибрюшинно в дозе 500 мг/кг за сутки до ишемии, а также внутриаартериально в той же дозе в одну из общих сонных артерий непосредственно перед их окклюзией. Мозг после декапитации фиксировали, погружая голову в жидкий азот.

Метаболический статус полушарий мозга и его изменения под воздействием никотинамида оценивали по количественному содержанию АТФ, АДФ, АМФ в тканях головного мозга, рассчитывали величину энергетического заряда, отношение АТФ/АДФ и сумму нуклеотидов.

Уровень АТФ в анализируемых образцах проводили на Luminometer LKB-Wallac 1251 с помощью набора «Микролюм» ООО Люмтек. Образец ткани головного мозга растирали в гомогенизаторе

с ледяным стерильным физ. раствором в соотношении 1/10. 0,1 мл полученного гомогената сразу после его получения соединяли с 0,9 мл ДМСО. Полученный гомогенат хранили в морозильной камере (–20 °С). Из образца отбирали 0,03 мл анализируемого образца в ДМСО, вносили в кювету люминометра с 0,07 мл АТФ-реагента, измеряли биолюминесцентный сигнал. Концентрацию АТФ в образцах рассчитывали по стандартной кривой уровня АТФ.

Содержание АДФ определяли спектрофотометрически по снижению величины оптической плотности по скорости окисления НАДН. АМФ определяли по окончании основной реакции (после того, как АДФ полностью превращается в АТФ): $АМФ + АТФ = 2АДФ$. В основе метода определения содержания АДФ и АМФ лежит фосфорилирование АДФ в АТФ и освобождение пирувата в ферментативной пируваткиназной реакции ($АДФ + \text{Фосфоенолпируват} = АТФ + \text{пируват}$). При этом концентрация АДФ будет эквивалентна массе пирувата, который участвует в восстановлении лактата через НАДН. ($\text{Пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+ = \text{Лактат} + \text{НАД}$).

Навеску (500 мг) ткани головного мозга растирали в фарфоровой ступке в жидком азоте, помещали в охлажденную центрифужную пробирку, куда предварительно наливали 1 мл 6%-ной хлорной кислоты (HClO_4). Перемешивали, добавляли дополнительно 2,25 мл HClO_4 , оставляли на льду на 10 мин. для полной экстракции. Белки отделяли центрифугированием в течение 10 мин. при 3000 г. Безбелковый экстракт переносили в центрифужную пробирку и удаляли избыток хлорной кислоты, добавляя 5М раствор K_2CO_3 из расчета 0,05 мл на 1 мл кислого экстракта. Через 10 мин. осадок центрифугировали, нейтрализованный экстракт нагревали до комнатной температуры и немедленно использовали для ферментативного анализа. Для проведения ферментативной реакции в кювету толщиной 1 см наливали 2,0 мл тканевого экстракта; добавляли 0,2 мл раствора фосфоенолпирувата (10 мМ в 1,3 М KCl и 0,4 М MgSO_4); 0,2 мл раствора НАДН (2,5 мМ); 0,02 мл суспензии ЛДГ (500 ЕД/мл); перемешивали и измеряли начальное значение экстинкции (Е1). Затем добавляли 0,02 мл суспензии пируваткиназы (100 ЕД/мл) и определяли промежуточное значение (Е2). Добавляли 0,02 мл миокиназы, и по окончании реакции измеряли конечное значение (Е3). Концентрацию АТФ, АДФ и АМФ в образцах рассчитывали по стандартной кривой уровня АТФ [28]:

Энергетический заряд (ЭЗ) рассчитывали по формуле [29]:

$$\text{ЭЗ} = \frac{[\text{АТФ}] + [1/2 \text{АДФ}]}{[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]}$$

Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами с использованием t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одной из существенных причин повреждения и гибели клеток при гипоксии является развивающаяся недостаточность энергообеспечения, связанная как с повышенным расходом энергии (работа систем детоксикации, активация транспортных АТФ-аз), так и с недостаточным синтезом макроэргов (повреждение митохондриальных мембран и др.). Поэтому для характеристики энергетического состояния клеток при гипоксии головного мозга, вызванной перевязкой обеих сонных артерий необходимо определить содержание адениловых нуклеотидов.

Окклюзия сонных артерий приводит глубоким изменениям в метаболизме энергетической системы мозга (табл. 1). Содержание АТФ при ишемии снижается почти в 2,4 раза (42,2% по отношению к контролю), уровень АДФ и АМФ увеличивается и по сравнению с контролем достигает 260,9% и 233,3% соответственно. Обнаруженные сдвиги могут свидетельствовать как о торможении ресинтеза, так и об ускорении использования макроэргов в условиях интоксикации.

О более существенных сдвигах аденилнуклеотидной системы можно говорить при анализе отдельных его компонентов (таблица 2).

Ишемия мозга сопровождается незначительными изменениями суммарного содержания адениловых нуклеотидов (на 9,1 %).

Одним из высокоинформативных показателей энергетического потенциала является отношение АТФ/АДФ. Влияние ишемии, вызванной перевязкой обеих сонных артерий, приводит к резкому падению этого коэффициента с $3,48 \pm 0,31$ у интактных крыс до $0,56 \pm 0,04$ (до 16,2%) у ишемизированных животных.

Важным показателем взаимоотношения нуклеотидов является энергетический заряд. Результаты эксперимента показывают, что величина ЭЗ снижалась в условиях ишемии головного мозга до 63,8%. Существенное снижение величины ЭЗ при гипоксии является результатом падения содержания АТФ и параллельного прироста продуктов ее распада.

Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют об изменении концентрации продуктов энергетического метаболизма в головном мозге крыс.

О влиянии никотинамида на состояние энергетического статуса клеток судили по тем же количественным изменениям адениловых нуклеотидов и основных их параметров.

Никотинамид способствует восстановлению уровня адениловых нуклеотидов в условиях ишемии головного мозга. Уровень АТФ достоверно

Таблица 1

Влияние никотинамида на энергетический обмен в головном мозге при острой ишемии, вызванной перевязкой обеих сонных артерий ($n = 8$)

| Показатели | Контроль | Ишемия | Никотинамид + ишемия |
|---------------|-----------------|--------------------------------------|---|
| | $M \pm m$ | | |
| АТФ, мкмоль/г | $2,23 \pm 0,13$ | $0,94 \pm 0,04$ $P_{1-2} < 0,001$ | $3,33 \pm 0,20$ $P_{1-3} < 0,001; P_{2-3} < 0,001$ |
| % от контроля | — | 42,2 | 149,3 |
| АДФ, мкмоль/г | $0,64 \pm 0,05$ | $1,67 \pm 0,07$ $P_{1-2} < 0,001$ | $0,79 \pm 0,05$ $P_{1-3} > 0,05; P_{2-3} < 0,001$ |
| % от контроля | — | 260,9 | 123,4 |
| АМФ, мкмоль/г | $0,42 \pm 0,04$ | $0,98 \pm 0,02$ $P_{1-2} < 0,001$ | $0,48 \pm 0,04$ $P_{1-3} > 0,05; P_{2-3} < 0,001$ |
| % от контроля | — | 233,3 | 114,3 |

Влияние никотинамида на некоторые параметры аденилнуклеотидной системы в головном мозге при острой ишемии, вызванной перевязкой обеих сонных артерий ($n = 8$)

| Показатели | Контроль | Ишемия | Никотинамид + ишемия |
|--|-----------------|--------------------------------------|--|
| | $M \pm m$ | | |
| Сумма адениловых нуклеотидов, мкмоль/г | $3,29 \pm 0,30$ | $3,59 \pm 0,29$ | $4,6 \pm 0,41$ |
| % от контроля | — | 109,1 | 139,8 |
| Коэффициент АТФ/АДФ | $3,48 \pm 0,31$ | $0,56 \pm 0,04$ $P_{1-2} < 0,001$ | $4,22 \pm 0,38$ $P_{1-3} > 0,05; P_{2-3} < 0,001$ |
| % от контроля | — | 16,2 | 121,0 |
| Энергетический заряд | $0,78 \pm 0,06$ | $0,49 \pm 0,03$ $P_{1-2} < 0,001$ | $0,81 \pm 0,07$ $P_{1-3} > 0,05; P_{2-3} < 0,001$ |
| % от контроля | — | 63,8 | 104,5 |

увеличился по сравнению с контролем 1,5 раза (с $2,23 \pm 0,13$ до $3,33 \pm 0,20$ мкмоль/г) и в 3,5 раза по сравнению с изолированной ишемией (с $0,94 \pm 0,04$ до $3,33 \pm 0,20$ мкмоль/г). Введение дважды никотинамида до окклюзии сонных артерий не снижало уровень АДФ и АМФ в мозге после окклюзии ($0,79 \pm 0,05$ и $0,48 \pm 0,04$ мкмоль/г) по сравнению с контролем ($0,64 \pm 0,05$ и $0,42 \pm 0,04$ мкмоль/г).

Ишемия на фоне применения никотинамида сопровождается увеличением суммарного содержания адениловых нуклеотидов в мозге с $3,29 \pm 0,30$ до $4,6 \pm 0,41$ (на 39,8%).

Значительных изменений коэффициента АТФ/АДФ у неишемизированных животных и животных, получавших никотинамид до церебральной ишемии не наблюдалось ($3,48 \pm 0,31$ и $4,22 \pm 0,38$ соответственно).

Величина ЭЗ в условиях ишемии головного мозга и протекции его никотинамидом достоверно увеличивалась до нормальных величин относительно контрольных животных.

ВЫВОДЫ

Острая циркуляторная церебральная ишемия у крыс характеризуется грубыми нарушениями энергетического обмена.

Профилактическое введение никотинамида при острой церебральной ишемии предупреждает развитие тяжелых нарушений метаболизма в мозге, активирует работу систем энергетического обмена в клетке, тем самым способствует сохранению энергетического статуса клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганнушкина И.В., Баранникова М.В., Семенова Н.А. и др. Журн. невропатол и психиатр 1989; 9: 3—6.
2. Лукьянова Л.Д., Власова И.Г. Бюл. exper. биол. и мед. 1989; 108 (9): 266—269.
3. Lukjyanova L.D. In: Adaptation Biology and Medicine (Shanna V.K., Takeda N., Ganguly N.K. eds.). New Delhi 1996; 1: 261—279.
4. Власова И.Г., Куцов Г.М., Ломакин Ю.В. и др. Влияние гипоксии на нейроны различных структур мозга в условиях переживающих срезов. — В кн.: Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. Материалы Второй Всероссийской конференции. — М. — 1999. — с. 14.
5. Лукьянова Л.Д. Бюлл. exper. биол. и мед. 1997; 9: 244—254.
6. Лукьянова Л.Д., Дубченко А.М., Чернобаева Г.Н. Роль биоэнергетического обмена в формировании долгосрочных механизмов адаптации. — В кн.: Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. Материалы Второй Всероссийской конференции. — М. — 1999. — с. 92.
7. Scheinberg P. Neurology 1991; 41: 1867—1873.
8. Hansen A.J. Reviews 1985; 65: 101—148.
9. Morgan J.I., Curran T. Annu. Rev. Neurol. 1991; 14:421—451.
10. Steng M., Greenberg M.E. Neuron. 1990; 4 (477): 44—85.
11. Nowak T.S., Kiessling Jr. a. M. Reprogramming of Gene Expression after Ischemia. In: Cerebral Ischemia (Wolfgang Walz ed.). New Jersey, Totowa, Humana Press 1999; 145—217.
12. Yoshimine T., Hayakawa T., Kato A. et al. J. Cereb Blood Flow Metab. 1987; 1:387—393.
13. Mies G, Ishimam S., Xie Y. et al. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1991: 753—761.

14. Xie Y., Mies G., Hossmann K.A. *Stroke*. 1989; 20: 620—626.
15. Ашмарин И.П., Стукалов П.В. *Нейрохимия*. — М.: Изд-во Инст. Биомед. химии РАМН, 1996.
16. Herschman H.R. *Amu Rev Biochem* 1991; 68: 281—319.
17. Kiessling M, Gass P. *Brain Pathol* 1994; 4: 77—83.
18. Vandromme M., Gauthier-Rouviere C, Lamb N., Fernandez A. *Trends Biol Sci* 1996; 21: 59—64.
19. Akins P.T., Liu P.K., Hsu C.Y. *Stroke* 1996; 27: 1682—1687.
20. Новожилова А.П., Плужников Н.Н., Новиков В.С. В кн. Программированная клеточная смерть (под ред. В.С. Новикова), Наука, Спб., 1996, с. 9—29.
21. Oliver F.J., Menissier-de Murcia J., and de Murcia G. Poly(ADP-Ribose)Polymerase in the Cellular Response to DNA Damage, Apoptosis and Disease *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 64, 1282—1288.
22. Szabo C, Dawson V.L. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *TIPS* 1998, 19: 287—298.
23. Gaal J.C., Pearson C.K. Eukaryotic nuclear ADP-ribosylation reactions. *Biochem. J.* 1985, 230: 1—18.
24. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva, Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 1999, 342: 249—268.
25. Ha H.C. and Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion *PNAS*. 1999, Vol. 96, no.24, 13978—13982.
26. Endres M., Wang Z.-Q., Namura S., et al. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1997, 17: 1143—1151.
27. Huang Zh., Huang P., Panahian N. et al. Effects of Cerebral Ishemia in Mice Deficient in Neuronal Nitric Oxide Synthase // *SCIENCE*. 1994, Vol. 265, 1883—1885.
28. Угарова Н.Н., Фрундзян В.Г. Применение биолюминесцентной АТФ-метрии в биоаналитических целях. М.2003, с. 51
29. Методы биохимических исследований. // Под ред. М.И. Прохоровой. — Л.: Изд-во Ленингр. унив. — 1982. — 272 С.