



УДК 615.35:537.875.1547.792].011.077

© 2011

Ю. М. Колесник, член-корреспондент НАН України **И. С. Чекман,**  
**И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, Н. А. Горчакова,**  
**Н. В. Бухтиярова, И. Ю. Яковлева**

### **Биохимические механизмы регуляции продукции энергии в условиях экспериментальной острой церебральной ишемии**

*Досліджено молекулярно-біохімічні механізми активації компенсаторних шунтів продукції енергії в умовах моделювання гострої церебральної ішемії у монгольських піщанок. Стійкість нервової тканини до гіпоксії формується за рахунок перебудови енергетичних шляхів, що передумовлює мобілізацію механізмів постачання протонів для окисного фосфорильовання та економного використання кисню. Встановлено, що компенсаторна в умовах церебральної ішемії продукція енергії може відбуватися впродовж активації малат-аспартатного шунта, який більш стійкий до гіпоксії. Математичним бінарним регресійним аналізом виявлено тісну асоціацію між рівнем експресії HSP та активністю НАД-залежної малатдегідрогенази, що визначена резистентністю до ішемії.*

Сосудистые заболевания головного мозга — одна из основных причин смертности и инвалидизации населения всего мира [1]. В результате исследований процессов энергопродукции в условиях ишемии установлено, что получение энергии осуществляется путем анаэробного гликолиза, реакции которого завершаются образованием только двух молекул аденозинтрифосфата и накоплением лактата. На начальном этапе церебральной ишемии любой этиологии в митохондриях снижается скорость аэробного окисления. Клетка в этих условиях расходует гликоген, обеспечивая себя энергией за счет бескислородного распада глюкозы [2, 3]. Конечным продуктом гликолиза является лактат, нарастание которого провоцирует внутриклеточный ацидоз. На ранних этапах ишемии клеточный ацидоз можно рассматривать в качестве защитной реакции, так как снижение рН оказывает стабилизирующее действие на клеточные мембраны. Однако прогрессирование ацидоза вызывает денатурацию некоторых белков и формирование в цитоплазме зерен, что проявляется в помутнении цитоплазмы (“мутное набухание”, “зернистая дистрофия”) [4]. На этой стадии гипоксии в клетке формируется истинный дефицит АТФ, поскольку аэробный механизм не осуществляется из-за кислородного дефицита, а анаэробный — из-за ацидоза [1, 2].

В последнее время благодаря открытиям в области молекулярной биологии установлены новые механизмы в патогенезе гипоксии регуляторных белков в функционировании многих звеньев энергетического метаболизма. Показана активация в условиях ишемии генов, кодирующих синтез белка HIF-1 (hypoxia-inducible factor) и, особенно, его субъединицы HIF-1 $\beta$  (120 кДа). Данный ген в условиях ишемии отвечает за экспрессию гена эритропоэтина и еще около 60 генов, продукты которых участвуют в таких процессах, как пролиферация, апоптоз, ангиогенез, стабилизация белковых молекул в условиях оксидативного стресса. Кроме того, установлено участие белков теплового шока (HSP) в стабилизации HIF-1 $\beta$  при церебральной ишемии, сопровождающейся интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, смещением тиол-дисульфидного равновесия, развитием нитрозирующего стресса, глутаматной эксайтотоксичности [5–7].

В настоящей работе приведены результаты исследования показателей, характеризующих состояние транспортных систем поставки восстановительных эквивалентов и субстратов окисления в митохондриях, цикле Кребса, тканевом дыхании, а также изучения фондов макроэргических фосфатов (АТФ), активности ферментов, регулирующих митохондриально-цитозольный транспорт энергии, и определения содержания HSP70 и HIF-1 $\alpha$  в митохондриях головного мозга монгольских песчанок при моделировании острой церебральной ишемии (ОЦИ).

**Материалы и методы исследования.** Нарушение мозгового кровообращения моделировали путем необратимой односторонней перевязки сонной артерии у монгольских песчанок (*Meriones unculatus*) массой 65–70 г, которые в последние годы наиболее часто используются для моделирования нарушения мозгового кровообращения, что обусловлено разьединением большого круга кровообращения, слаборазвитой системой коллатерального кровообращения. Экспериментальные исследования проводили согласно “Положению об использовании животных в биомедицинских исследованиях”. Животных выводили из эксперимента под тиопентал-натриевым наркозом (40 мг/кг, внутривенно).

Биохимические исследования в тканях головного мозга у интактных животных проводили через 1 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 120 ч и 21 сут ишемии. Для этого обогащенную фракцию нейронов путем дифференцированного ультрацентрифугирования разделяли на две фракции — цитозольную и митохондриальную. Центрифугирование осуществляли при 60000 g в рефрижераторной центрифуге Centrifuge 5804R (“Eppendorf”, Германия). В полученных цитозольной и митохондриальных фракциях спектрофотометрически исследовали следующие показатели: уровень активности митохондриальной и цитозольной малатдегидрогеназы, НАД и НАДФ малатдегидрогеназы (мМДГ, цМДГ); сукцинатдегидрогеназы (СДГ), митохондриальной аспартаттрансферазы (АсТ), цитохромоксидазы (ЦХО), гексокиназы (ГК). Активность митохондриальной и цитозольной креатинфосфокиназы (мКФК, цКФК) определяли после разделения на сефадексе ДЕ-АЕ-А-50 по оптическому тесту Варбурга. Содержание лактата, малата в головном мозге рассчитывали по методу Хохорста, концентрацию изоцитрата в тканях — по методу Зиберта [8].

Концентрацию в тканях головного мозга HIF- и HSP-белков определяли методом вестерн-блот анализа. Белки разделяли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроэлюцией в течение 45 мин. Преинкубацию вестерн-блотов проводили в растворе TBST с 5% обезжиренным молоком в течение 1 ч. Затем вестерн-блоты инкубировали в присутствии первичных моноклональных антител (Santa Cruz Biotechnology) против HIF и HSP в разведении 1 : 1000 в течение 1 ч. После отмывки блоты инкубировали в присутствии вторичных антител (Santa

Cruz Biotechnology), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1 : 2000), в течение 1 ч. Детекцию HIF и HSP осуществляли при помощи денситометрии в программе Adobe Photoshop [9, 10].

Сравнение полученных данных по группам проводили при помощи критерия Манна–Уитни. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы “STATISTICA for Windows 6.1 (StatSoft Inc., № AXXR712D833214SAN5), а также “SPSS 16.0”, “Microsoft Excel 2003” [11].

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что в тканях головного мозга в период наибольших ишемических нарушений (24–72 ч) происходит гиперпродукция лактата, на фоне угнетения ГК — фермента, катализирующего первую “пусковую” реакцию гликолиза (табл. 1). При оценке динамики изменений окислительного метаболизма отмечено резкое угнетение СДГ (77–85%) и изоцитрата (56–70%). Восстановление этих показателей начинается лишь к 21 суткам эксперимента. Обращает на себя внимание первоначальное (с 1 по 24 ч) повышение активности мМДГ и цМДГ, с увеличением уровня малата (20–50%), а в дальнейшем (48–72 ч) умеренная депрессия ее активности (10%) на фоне уменьшения содержания малата (16–38%) (см. табл. 1). Таким образом, имеет место выраженное ингибирование цикла трикарбоновых кислот на участке цитрат—сукцинат. Угнетение активности СДГ определяет проблематичность реализации сукцинатоксидазного пути поставки протонов в дыхательную цепь. Увеличение уровня малата с повышением активности мМДГ и цМДГ в первые часы церебральной ишемии свидетельствует об активации малат-аспартатного челночного механизма транспорта восстановленных эквивалентов в митохондрии. Исследование показателей биоэнергетики в острый период ишемии (до 24 ч) выявило интересные закономерности. Наиболее выражено изменялись такие показатели, как активность митохондриальных и цитозольных НАД-МДГ и НАДФ-МДГ, а также содержание HSP70 и HIF-1a.

Отмечен параллелизм в изменениях уровня малата и активности НАД-МДГ митохондрий, цитоплазматической АсТ и содержания HSP70 HIF-1a [12]. Установлена статистически достоверная корреляция между изменениями уровня малата, НАД-МДГ и HSP70 ( $r = 0,821$ ;  $T = 2,94$ ). Также обнаружено, что общая тенденция к снижению малата сопряжена с восстановлением НАДФ-МДГ и HIF-1a ( $r = 0,839$ ;  $T = 3,09$ ). Математическим анализом установлена прямая зависимость между концентрацией HSP70-белка и уровнем активности МДГ. Результаты данного бинарного регрессионного анализа показали тесную ассоциацию между уровнем экспрессии белков теплового шока, рассматриваемого в качестве независимого аргумента, и величиной активности МДГ митохондрий.

Полученная зависимость носит прямой трансцендентный характер и статистически значимо аппроксимируется логарифмической моделью регрессии. Погрешность аппроксимации (0,19) и величина остаточной дисперсии показывают высокую точность линейной модели. Таким образом, задачу регрессионного анализа можно считать решенной ( $R = 0,93$ ,  $R^2 = 0,86$ , нормированный  $R^2 = 0,84$  при  $F = 53,25$ , стандартная ошибка 0,604,  $p = 0,00082$ ).

Анализируя результаты исследования особенностей метаболизма ткани головного мозга при ишемии, можно выделить общие закономерности. Так, двухсторонняя перевязка общих сонных артерий сопровождается типичными для ишемии нарушениями биохимических процессов — активацией гликолиза с гиперпродукцией лактата, угнетением ферментов цикла Кребса и электронно-транспортной цепи, дефицитом АТФ на фоне угнетения экспрессии HSP70 и HIF-1a. Степень угнетения СДГ, поставляющей протоны на ФАД-зависимый участок электронно-транспортной цепи, намного выше, чем ЦХО, которая лимитирует поток

Таблица 1. Состояние энергетического обмена головного мозга монгольских песчанок; концентрация HIF- и HSP-белков при разных сроках церебральной ишемии

| Показатель                     | Интактные животные | Продолжительность эксперимента |               |               |               |               |               |               |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                |                    | 1 ч                            | 6 ч           | 24 ч          | 48 ч          | 72 ч          | 120 ч         | 21 сут        |
| Малат, мкмоль/г ткани          | 0,44 ± 0,022       | 0,56 ± 0,012*                  | 0,87 ± 0,032* | 0,78 ± 0,014* | 0,37 ± 0,034* | 0,27 ± 0,011* | 0,25 ± 0,023* | 0,43 ± 0,021  |
| Изоцитрат, мкмоль/г ткани      | 0,48 ± 0,021       | 0,67 ± 0,027*                  | 0,54 ± 0,044* | 0,21 ± 0,027* | 0,18 ± 0,033* | 0,14 ± 0,018* | 0,20 ± 0,015* | 0,27 ± 0,031* |
| НАД-МДГ-мх, мкмоль/г ткани/мин | 1,23 ± 0,071       | 1,87 ± 0,016*                  | 2,47 ± 0,033* | 2,11 ± 0,041* | 1,87 ± 0,037* | 1,12 ± 0,016* | 1,11 ± 0,019* | 1,44 ± 0,012* |
| СДГ, мкмоль/г ткани/мин        | 5,4 ± 0,21         | 7,8 ± 0,7*                     | 5,2 ± 0,3     | 1,2 ± 0,3*    | 1,2 ± 0,5*    | 1,0 ± 0,2*    | 1,2 ± 0,5*    | 3,77 ± 0,5*   |
| АТФ, мкмоль/г ткани            | 2,94 ± 0,085       | 1,84 ± 0,074*                  | 1,5 ± 0,068*  | 1,43 ± 0,081* | 1,32 ± 0,047* | 1,25 ± 0,057* | 1,23 ± 0,074* | 1,13 ± 0,053* |
| ГК, мкмоль/г ткани/мин         | 10,45 ± 0,79       | 18,65 ± 1,23*                  | 25,3 ± 1,3*   | 16,2 ± 0,65*  | 12,3 ± 1,0*   | 7,43 ± 0,68*  | 6,97 ± 0,36*  | 7,06 ± 0,6*   |
| Лактат, мкмоль/г ткани         | 2,65 ± 0,36        | 3,96 ± 0,31*                   | 4,13 ± 0,41*  | 5,4 ± 0,28*   | 6,37 ± 0,42*  | 6,4 ± 0,36*   | 5,8 ± 0,33*   | 5,1 ± 0,27*   |
| HSP70, у. е./г белка           | 15,4 ± 0,31        | 22,5 ± 0,48*                   | 25,3 ± 0,31*  | 23,6 ± 0,51*  | 22,7 ± 0,33*  | 20,6 ± 0,5*   | 20,3 ± 0,42*  | 18,7 ± 0,4*   |
| HIF-1α, у. е./г белка          | 18,5 ± 0,65        | 31,5 ± 0,48*                   | 32,6 ± 0,5*   | 27,9 ± 0,43*  | 21,7 ± 0,62*  | 20,4 ± 0,41*  | 19,7 ± 0,37*  | 19,2 ± 0,52*  |
| ЦХО, мкмоль/г ткани/мин        | 14,8 ± 0,5         | 13,5 ± 0,3*                    | 12,0 ± 0,3*   | 9,2 ± 0,5*    | 7,8 ± 0,5*    | 7,7 ± 0,5*    | 8,4 ± 0,3*    | 12,4 ± 0,5*   |

\*  $p \leq 0,05$  по отношению к интактным животным.

электронов по всей цепи. Кроме того, имело место значительное снижение концентрации интермедиата ЦТК — изоцитрата. Эти факты позволяют предполагать, что активность процессов цикла Кребса, контролируемых цитратсинтетазой и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназой, существенно угнетена. При этом реализация компенсаторного сукцинатоксидазного механизма затруднена. Вместе с тем дыхательная цепь функционирует и продукция АТФ, хотя и на более низком уровне, осуществляется. Это предполагает наличие других компенсаторных механизмов поставки протонов к дыхательной цепи. В этой связи обращает на себя внимание повышение содержания малата и активности НАД-МДГ-мх, коррелирующее с уровнем HSP70, как в первые минуты ишемии, так и у животных, устойчивых к ишемии. Подобный факт объясняется активацией малат-аспартатного механизма транспорта восстановленных эквивалентов в митохондрии и участием в механизме активации и в контроле его работы адаптационных белков — HSP70 и HIF-1a.

1. Беленичев И. Ф., Колесник Ю. М., Павлов С. В. и др. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином // *Международ. неврологич. журн.* – 2008. – **20**, № 4. – С. 20–25.
2. Giordano F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure // *J. Clin. Invest.* – 2005. – **115**. – P. 500–508.
3. Мазур И. А., Чекман И. С., Беленичев И. Ф. и др. Метаболитотропные препараты. – Запорожье, 2007. – 369 с.
4. Huss J. D. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance // *J. Clin. Invest.* – 2005. – **115**. – P. 547–555.
5. Мокрушин А. А., Павлинова Л. И., Гужова И. В., Маргулис Б. А. Белок теплового шока (Hsp70) протектирует активность глутаматергической синаптической передачи в обонятельной коре мозга крыс *in vitro* от тяжелой аноксии // *Докл. АН.* – 2004. – **394**, № 3. – С. 419–422.
6. Katschinski D. M., Le L., Schindler S. G. et al. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization // *Cell Physiol. Biochem.* – 2004. – **14**. – P. 351–360.
7. Dery M. A., Michaud M. D., Richard D. E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – **37**. – P. 535–540.
8. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
9. Avrames S., Termyneck T. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies // *Mol. Immunol.* – 1993. – **30**. – P. 119–127.
10. Beere H. M. ‘The stress of dying’: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis // *J. Cell Sci.* – 2004. – **117**. – P. 2641–2651.
11. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. – Киев: Морион, 2002. – 640 с.
12. Zhou J., Schmid T., Franc R., Bruno R. PI3K/AKT is required from heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  from pVHL-independent degradation // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 13506–13513.

Запорожский государственный  
 медицинский университет  
 Национальный медицинский университет  
 им. А. А. Богомольца, Киев

Поступило в редакцию 26.11.2010

**Yu. M. Kolesnik**, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **I. S. Chekman**,  
**I. F. Belenichev**, **S. V. Pavlov**, **N. A. Gorchakova**, **N. V. Bukhtiyarova**,  
**I. Yu. Yakovleva**

### **Biochemical mechanisms of regulation of the energy production under experimental acute cerebral ischemia**

*There are some molecular-biological mechanisms of activation of compensative ways of the energy production under conditions of cerebral ischemia in Meriones uncinatus. The resistance of nervous tissue to hypoxia is developed by a reconstruction of the energy production ways causing the mobilization of protons delivery ways for oxidative phosphorylation and economical oxygen use. It is stated that the compensative energy production under conditions of acute ischemia can take place during the malate-aspartate way activation that is more steady to hypoxia. The binary regressive analysis shows a tight association between the level of the expression of HSP and the level of the mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase activity.*