

## МАЛАТ-АСПАРТАТНЫЙ ШУНТ В РЕАКЦИЯХ АДАПТАЦИИ НЕЙРОНОВ К УСЛОВИЯМ ИШЕМИИ: МОЛЕКУЛЯРНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ

© 2012 г. И. Ф. Беленичев, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов,  
Е. П. Соколик\*, Н. В. Бухтиярова

*Запорожский государственный медицинский университет*

Острая или хроническая ишемия мозговой ткани обуславливает целый каскад патобиохимических реакций, которые в конечном итоге приводят к развитию очагового неврологического дефицита, дисциркуляторной энцефалопатии или к гибели больного. В различные сроки ишемии (1 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 120 ч и 21 сут) установлено, что в период наибольших ишемических нарушений (24–72 ч) наблюдается гиперпродукция лактата на фоне угнетения гексокиназы – фермента, катализирующего первую “пусковую” реакцию гликолиза. Рост малата с повышением активности митохондриальной и цитозольной малатдегидрогеназ в первые часы церебральной ишемии свидетельствует об активации малат-аспаратного челночного механизма транспорта восстановленных эквивалентов в митохондрии. Угнетение продукции малата и активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы коррелирует с падением содержания АТФ, HSP-70 и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1a), а также со степенью неврологических нарушений. Можно предположить, что в ответ на формирование ишемии головного мозга экспрессируется HIF-1a, который инициирует запуск компенсаторных механизмов выработки энергии.

*Ключевые слова: ишемия головного мозга, компенсаторные шунты продукции энергии, митохондриально-цитозольный транспорт энергии, белки теплового шока.*

Сосудистые заболевания головного мозга – одна из ведущих причин смертности и инвалидизации населения всего мира. Окклюзия сосудов, питающих головной мозг, является начальным звеном в цепочке неблагоприятных изменений, которые приводят к грубым нарушениям метаболизма нейронов, структурно-функциональным изменениям, нередко заканчивающимся гибелью нервных клеток. Острая или хроническая ишемия мозговой ткани обуславливает целый каскад патобиохимических реакций, которые в конечном итоге приводят к развитию очагового неврологического дефицита, дисциркуляторной энцефалопатии или к гибели больного [1, 2]. Тесная взаимосвязь нарушений энергетического и пластического обмена и их влияние на течение и прогноз заболевания нередко не учитываются при разработке схем лечения, а основой патогенетической терапии считается восстановление гемодинамики. В последнее время нарушениям энергетического метаболизма и возможностям его коррекции уделяется большое внимание [3, 4]. Многие ученые считают, что метаболическая терапия, осуществляемая как в острый

период инсульта, так и в восстановительный, является мощным превентивным фактором по отношению к повторным инсультам, инвалидизации больных и их гибели [5, 6].

Фундаментальными исследованиями процессов энергопродукции в условиях ишемии установлено, что получение энергии осуществляется путем анаэробного гликолиза, реакции которого завершаются образованием только 2 молекул АТФ и накоплением лактата [7, 8]. На начальном этапе церебральной ишемии любой этиологии в митохондриях снижается скорость аэробного окисления. Это ведет к уменьшению количества АТФ и возрастанию содержания АДФ и АМФ и, как следствие, к снижению коэффициента  $[АТФ]/([АДФ] + [АМФ])$ . При низком соотношении  $[АТФ]/([АДФ] + [АМФ])$  активируется гексокиназа (ГК), что позволяет резко увеличить прорусную способность реакций анаэробного гликолиза. Клетка в этих условиях расходует гликоген, обеспечивая себя энергией за счет бескислородного распада глюкозы [9, 10]. На этом этапе еще может идти адаптация к гипоксии и стабилизация энергообмена. Однако такая стабилизация обычно бывает недолгой и сопровождается достаточно быстрым истощением запасов гликогена, и анаэробный гликолиз не способен длительное время и

\*Адресат для корреспонденции: Украина, Запорожье, пр. Маяковского, 26, 69035, раб. тел: (0612) 24-64-69, моб. тел: +380970594381; факс: (0612) 33-60-07, e-mail: sokolikep@gmail.com.

в полном объеме обеспечивать энергетические нужды головного мозга. Конечный продукт гликолиза — 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 появлении помутнения цитоплазмы (“мутное набухание”, “зернистая дистрофия”) [11]. Усиленное освобождение лактата при гипоксии дает метаболический лактатацидоз, который блокирует активность генов, что лимитирует адаптацию. На этой стадии гипоксии в клетке формируется истинный дефицит АТФ, поскольку аэробный механизм не реализуется из-за кислородного дефицита, а анаэробный — из-за ацидоза [7, 9, 12]. В связи с этим устойчивость к гипоксии формируется за счет перестройки энергетических путей, предполагающей мобилизацию механизмов поставки протонов для окислительного фосфорилирования и экономного использования недостающего кислорода. Считается, что основным из таких путей является сукцинатоксидазный, и многие компенсаторные механизмы направлены на анаэробный синтез сукцината (трансаминазный цикл М.И. Кондрашовой, цикл Робертса и др.). Поэтому на рубеже 80–90-х годов прошлого столетия метаболической терапии придавали важное значение в качестве превентивного фактора по отношению к повторным инсультам, инвалидизации больных и их гибели как в острый период инсульта, так и в восстановительный [13].

Однако клиническое применение препаратов янтарной кислоты (реамбирин, янтавит, полисар, цитофлавин и др.) показало их низкую терапевтическую эффективность в условиях острой церебральной ишемии. В последнее время благодаря революционным открытиям в области молекулярной биологии был приподнят занавес таинственности, скрывающий значение регуляторных белков в функционировании многих звеньев энергетического метаболизма. Так, в последнее время рядом экспериментальных работ установлена активация в условиях ишемии генов, кодирующих синтез фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1) и особенно его субъединицы HIF-1b (120 кДа). HIF-1b в условиях ишемии отвечает за экспрессию гена эритропоэтина и еще приблизительно 60 генов, продукты которых участвуют в таких процессах, как пролиферация, апоптоз, ангиогенез, стабилизации белковых молекул в условиях оксидативного стресса. Кроме того, в последнее время появились данные о роли белков теплового шока (HSP) в стабилизации HIF-1b при цере-

бральной ишемии, сопровождающейся интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, смещением тиол-дисульфидного равновесия, развитием нитрозирующего стресса, глутаматной эксайтотоксичности [14–16]. HSP индуцируются в клетках всех живых организмов в ответ на действие многочисленных стрессовых факторов, таких, как тепловой шок, гипоксия, ишемия, метаболические нарушения, вирусная инфекция и воздействия фармакологических агентов. Гены этих белков активируются не только в условиях стресса, но и в ходе основных процессов клеточной жизнедеятельности, пролиферации, дифференцировки и апоптоза [17, 18].

Учитывая, что представления о доминирующей роли сукцинатоксидазного механизма сформулированы на обобщении результатов опытов с изолированными органами, культурами тканей при ишемии и гипоксии разной степени выраженности, представилось целесообразным изучить состояние лимитирующих звеньев энергетического обмена и компенсаторных метаболических шунтов и механизмов их молекулярной регуляции при ишемии головного мозга. При этом одновременное исследование различных метаболических процессов и уровня белков теплового шока (HSP-70) и субъединицы HIF-1a дает информацию о направленности и степени изменений этих процессов. Учитывая вышеизложенное, цель настоящего исследования — исследование показателей, характеризующих состояние транспортных систем поставки восстановительных эквивалентов и субстратов окисления в митохондриях, цикла Кребса, тканевого дыхания, а также изучение фондов макроэргических фосфатов (АТФ), активности ферментов, регулирующих митохондриально-цитозольный транспорт энергии, содержания HSP-70 и HIF-1a в митохондриях головного мозга монгольских песчанок с моделированием острой церебральной ишемией (ОЦИ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нарушение мозгового кровообращения моделировали путем необратимой односторонней перевязки сонной артерии у монгольских песчанок (*Meriones unculatus*) массой 65–70 г, которые по данным литературы последних лет наиболее часто используются для моделирования нарушения мозгового кровообращения, что обусловлено разведением большого круга кровообращения и слабо развитой системой коллатерального кровообращения [19].

Все экспериментальные процедуры проводили согласно требованиям, взятым из “Положения про использование животных в биомедицинских исследованиях”. Животных выводили из экспе-

римента под тиопентал-натриевым наркозом (40 мг/кг) внутривенно.

Биохимические исследования головного мозга 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 проводили при 60000 g в рефрижераторной центрифуге Centrifuge 5804R (Eppendorf, Germany). В полученных цитозольной и митохондриальных фракциях спектрофотометрически исследовали следующие показатели: уровень активности митохондриальной и цитозольной НАД- и НАДФ-зависимых малакдегидрогеназ (мМДГ и цМДГ); сукцинатдегидрогеназы (СДГ), митохондриальной аспаратаминотрансферазы (АсТ), цитохромоксидазы (ЦХО), ГК. Активность митохондриальной и цитозольной креатинфосфокиназы (мКФК и цКФК) определяли после разделения на DEAE-сефадексе А-50 по оптическому тесту Варбурга. Содержание лактата, малата в головном мозге определяли по методу Хохорста. Концентрацию изоцитрата в тканях определяли по методу Зиберта [20].

Концентрацию в тканях головного мозга HIF- и HSP-белков определяли методом Вестерн-блот анализа. Белки разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроолюцией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в растворе Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST) с 5%-ным 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 [21, 22].

Выраженность неврологического дефицита определяли по шкале McGrow [23]. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов: до 3 баллов – легкая степень, от 3 до 7 баллов – средняя степень и от 7 баллов и выше – тяжелая степень. Отмечали парезы, параличи конечностей, тремор, манежные движения, птоз, положение на боку, подвижность.

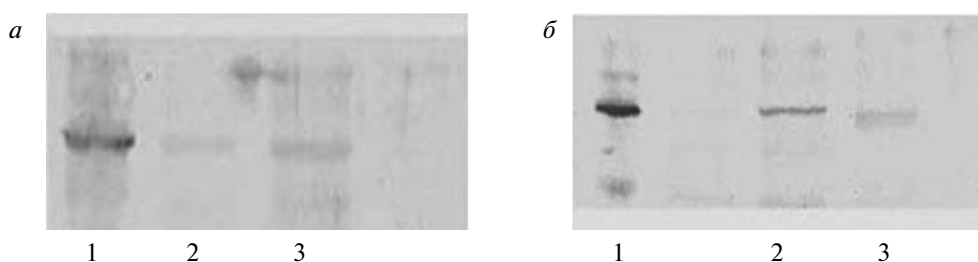
Нормальность распределения оценивали по критериям Kolmogorov-Smirnov (D) и Lilliefors, Shapiro-Wilk (W). В случае распределения, отличающегося от нормального, или анализа порядковых переменных использовали Mann-Whitney U для

двух несвязанных выборок, для большего числа выборок – критерий Kruskal-Wallis H с дальнейшим сравнением по Games-Howell. Сравнение групп по качественному признаку проводили при помощи критерия  $\chi^2$  с анализом таблиц сопряженности. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки репрезентативности среднего значения. Взаимосвязь между исследуемыми переменными проводили, используя процедуру бинарного регрессионного анализа. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета программы “SPSS 16”, “Microsoft Excel 2003”, “STATISTICA® for Windows 7.0” (StatSoft Inc.), для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при уровне значимости менее 0.05 [24].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенными экспериментальными исследованиями на различные сроки ишемии (1 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 120 ч и 21 сут) установлено, что в период наибольших ишемических нарушений (24–72 ч) наблюдается гиперпродукция лактата, на фоне угнетения ГК, катализирующей первую, “пусковую” реакцию гликолиза (табл. 1). При оценке динамики изменений окислительного метаболизма обращает на себя внимание резкое угнетение СДГ (77–85%) и уровня изоцитрата (56–70%). Восстановление этих показателей начинается лишь к 21-м сут 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%) (табл. 1). Таким образом, наблюдается выраженное ингибирование цикла трикарбоновых кислот на участке цитрат-сукцинат. Столь резкое угнетение активности СДГ делает проблематичным реализацию сукцинатоксидазного пути поставки протонов в дыхательную цепь. Рост малата с повышением активности мМДГ и цМДГ в первые часы церебральной ишемии свидетельствует об активации малат-аспаратного 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- и НАДФ-зависимых малакдегидрогеназ, а также содержание HSP-70 и HIF-1a (рис. 1).

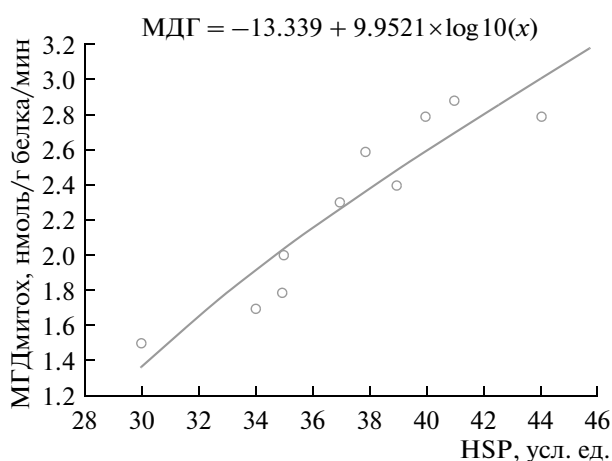
Отмечался параллелизм в изменениях уровня малата и активности НАД-зависимой МДГ митохондрий, цитоплазматической АсТ и содержанием HSP-70 и HIF-1a. Установлена статистически до-



**Рис. 1.** Результаты иммунодетекции HIF-1a (а) и HSP-70 (б) белков. Примечание: 1 – группа монгольских песчанок с легкой степенью неврологических нарушений; 2 – группа монгольских песчанок с тяжелой степенью неврологических нарушений; 3 – группа монгольских песчанок со средней степенью неврологических нарушений.

статистическая корреляция между изменениями уровня малата, НАД-МДГ и HSP-70 ( $\chi = 0.821$ ;  $T=2.94$ ). Было также установлено, что общая тенденция к снижению малата сопряжена с восстановлением НАДФ-МДГ и HIF-1a ( $\chi = 0.839$ ;  $T=3.09$ ). Математическим анализом была установлена прямая зависимость между концентрацией HSP-70 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 (рис. 2). 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,  $p = 0.00082$ ) (рис. 2).

В целях выяснения роли малатного шунта в механизмах компенсаторной продукции энергии и



**Рис. 2.** Результаты регрессионного анализа взаимосвязи HSP и МДГ.

молекулярных механизмах его регуляции нами была проведена рандомизация животных с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК) по степени устойчивости к ишемии по баллам шкалы Р.МсGrow на 24-м ч ишемии. Анализ показал, что у животных с высокими баллами по Р.МсGrow (выраженная неврологическая симптоматика) содержание малата, HSP-70 и HIF-1a наиболее низкое (рис. 1, табл. 2). При этом падение уровня малата в митохондриях коррелировало с высокой степенью достоверности со снижением HSP-70 ( $\chi = 0.899$ ;  $T=11.4$ ) и НАД-МДГ митохондрий ( $\chi = 0.976$ ;  $T=6.3$ ), а также АсТ митохондрий ( $\chi = 0.997$ ;  $T=9.1$ ) и АТФ ( $\chi = 994$ ;  $T=9.3$ ) (табл. 2, рис. 2). Эти факты убеждают в том, что продукция энергии в условиях острой церебральной ишемии зависит от функционирования малат-аспаратного шунта. В этом отношении, базируясь на многочисленных экспериментальных исследованиях, можно с определенной уверенностью сказать о преимуществе малат-аспаратного шунта, во-первых, как более устойчивого к гипоксии, а, во-вторых, обеспечивающего протонами в условиях острой ишемии электронно-транспортную цепь, частично замещающую суццинатазный механизм поставки протонов в электронную цепь. Кроме того, шунт Робертса лимитирован содержанием гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в головном мозге [7, 10]. При этом рост малата является маркером производительности этой челночной системы, и уровень HIF-1a определяет возможность активации компенсаторного шунта энергии, а HSP-70 – возможность его длительного функционирования. Данное утверждение подтверждается работами других исследователей. Так, исследованиями М.А. Dery и Л.Е. Huang было установлено, что один из шаперонов, HSP-90, способен связываться с доменом PAS (Per-Arnt-Sim) В-фактора и стабилизировать его [16, 25]. Другой клеточный шаперон, HSP-70, узнает иной структурный мотив молекулы HIF-1b, так называемый домен кислородзависимой деградации (ODD) [25]. Следует отметить, что роль этих межбелковых взаимодействий неясна; предпола-

**Таблица 1.** Состояние энергетического обмена головного мозга монгольских песчанок; концентрация HIF- и HSP-белков на разные сроки церебральной ишемии

Показатели	Интакт	1 ч	6 ч	24 ч	48 ч	72 ч	120 ч	21 сут
Малат, мкмоль/гр/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/гр/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 митохондрией, мкмоль/гр/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/гр/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/гр/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/гр/ткани/мин.	10.45 ± 0.79	18.65 ± 1.23*	25.3 ± 1.3*	16.2 ± 0.65*	12.32 ± 1.0*	7.43 ± 0.68*	6.97 ± 0.36*	7.06 ± 0.6*
Лактат, мкмоль/гр/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*
HSP-70, у.е./гр/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-1a, у.е./гр/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/гр/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*

Примечания: \* –  $p \leq 0.05$  по отношению к интакту.

**Таблица 2.** Показатели энергетического метаболизма и уровень HSP-70 и HIF-1a в головном мозге животных с различной степенью выраженности неврологических нарушений при ОНМК

Показатель	Интакт	Легкая степень	Средняя степень	Тяжелая степень
АТФ, мкмоль/гр/ткани	2.98 ± 0.092	1.65 ± 0.11*	1.312 ± 0.12*	1.12 ± 0.077*
Малат, мкмоль/гр/ткани	0.44 ± 0.022	0.51 ± 0.052*	0.37 ± 0.052*	0.20 ± 0.032*
Лактат, мкмоль/гр/ткани	2.78 ± 0.32	3.77 ± 0.47*	5.12 ± 0.52*	6.58 ± 0.21*
НАДФ-МДГ цитозоля, мкмоль/гр/ткани/мин	5.23 ± 0.21	5.44 ± 0.17*	4.91 ± 0.81*	4.12 ± 0.87*
НАДФ-МДГ митохондрий, мкмоль/гр/ткани/мин	6.27 ± 0.12	7.82 ± 0.32*	4.32 ± 0.23*	3.00 ± 0.21*
НАД-МДГ цитозоля, мкмоль/гр/ткани/мин	1.57 ± 0.052	1.55 ± 0.055	1.12 ± 0.032*	0.98 ± 0.043*
НАД-МДГ митохондрий, мкмоль/гр/ткани/мин	1.77 ± 0.11	2.65 ± 0.12*	1.12 ± 0.10*	0.82 ± 0.032*
АсТ-мх, мкмоль/гр/ткани/мин	3.67 ± 0.22	3.98 ± 0.54	2.34 ± 0.43*	1.21 ± 0.20*
КФК цитозоля, мкмоль/гр/ткани/мин	0.97 ± 0.021	1.11 ± 0.033	0.82 ± 0.021*	0.61 ± 0.023*
КФК-мх, мкмоль/гр/ткани/мин	0.82 ± 0.012	0.98 ± 0.027*	0.78 ± 0.017*	0.65 ± 0.026*
ЦХО, мкмоль/гр/ткани/мин	14.2 ± 0.8	11.3 ± 0.7*	5.7 ± 0.8*	4.0 ± 0.7*
HSP-70, у.е./гр/белка	15.4 ± 0.31	27.5 ± 0.37*	23.2 ± 0.4*	16.5 ± 0.28*
HIF-1a, у.е./гр/белка	18.5 ± 0.65	31.6 ± 0.42*	26.4 ± 0.3*	19.2 ± 0.27

Примечания: \*  $p \leq 0.05$  по отношению к интакту.

гаются, что они необходимы для стабилизации HIF-1b в условиях нормоксии. В условиях гипоксии по крайней мере один из шаперонов (HSP-70) вытесняется из комплекса с HIF-1b белком ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), который в течение 20–30 мин гипоксии предохраняет структуру фактора от прицельного протеолиза. Таким образом, HSP-70 способен увеличивать время жизни фактора HIF-1b в условиях до и после гипоксии и, таким образом, необходим клеткам для надлежащей реакции на лишение кислорода [25].

При общей оценке результатов исследования метаболизма нервной ткани 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 HSP-70 и HIF-1a. Вместе с тем исследование этих процессов в условиях динамического наблюдения и дифференциации по степени тяжести неврологических нарушений позволяет оценить их с позиции молекулярно-биохимических механизмов адаптации, сравнить степень нарушения отдельных звеньев метаболизма, компенсаторных путей синтеза энергии и регуляторных белков (HSP-70 и HIF-1a). Так, степень угнетения СДГ, поставляющей протоны на ФАД-зависимый участок электронно-транспортной цепи намного выше, чем ЦХО, которая лимитирует поток электронов по всей цепи. Кроме того, имело место значительное снижение

концентрации интермедиата ЦТК – изоцитрата. Эти факты позволяют предполагать, что цикл Кребса, контролируемый цитратсинтазой и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназой, существенно угнетен. При этом реализация компенсаторного сукцинатаксидазного 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 факт роста малата и активности НАД-МДГ митохондрий, коррелирующий с уровнем HSP-70, как в первые минуты ишемии, так и у животных, устойчивых к ишемии. Подобное наблюдение объясняется активацией малат-аспаратного механизма транспорта восстановленных эквивалентов в митохондрии и участием в механизме активации и в контроле его работы адаптационные белки – HSP-70 и HIF-1a. При этом угнетение продукции малата и активности НАД-МДГ митохондрий коррелирует с падением АТФ, HSP-70 и HIF-1a, а также со степенью неврологических нарушений. Можно предположить, что в ответ на формирование ишемии головного мозга экспрессируется HIF-1a, который инициирует запуск компенсаторных механизмов выработки энергии. В дальнейшем регуляция этих процессов переключается на HSP-70, который “продолжает” действие HIF-1a, а также самостоятельно поддерживает экспрессию активности НАД-МДГ митохондрий, тем самым длительно поддерживая активность малат-аспаратного челночного механизма.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Iadecola C.* Cerebral ischemia. New Jersey: Humana Press. 1999. P. 3–33.
2. *Зозуля І.С., Боброва В.І.* Укр. неврологічний журн. 2006. № 1. С. 5–8.
3. *Румянцева С.А., Афанасьев В.В., Силина Е.В.* Журн. неврол. и психиатрии. 2009. № 3. С. 64–68.
4. *Brann D.W., Dhandapani K., Wakade S., Mahesh V.B., Khan M.M.* Steroids. 2007. V. 72. P. 381–405.
5. *Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Константинов Ю.М., Якубов Л.А.* Бюл. ВСНЦ РАМН. 2006. № 5. С. 332–336.
6. *Виноградов В.М.* Фармакологические средства для профилактики и лечения гипоксии (состояние проблемы) // Кислородный гомеостазис и кислородная недостаточность. Киев: Наук. думка, 1978. С. 183–192.
7. *Беленичев И.Ф., Башкин И.Н., Визир В.А.* Структурно-функциональные и биохимические изменения мозговой ткани в условиях экспериментальной гипоксии головного мозга // Компенсаторно-приспособительные механизмы внутренних органов и головного мозга в норме, патологии и эксперименте. Тюмень, 1991. С. 104–110.
8. *Беленичев И.Ф., Башкин И.Н., Визир В.А., Дунаев В.В.* Сопряженность изменений метаболизма в мозговой ткани и миокарде при экспериментальной гипоксии головного мозга // Сборник работ “Коррекция сердечно-сосудистых нарушений в клинике и эксперименте”, Винница, 1991. С. 7–10.
9. *Giordano F.J.J.* Clin. Invest. 2005. V. 115. P. 500–508.
10. *Мазур И.А., Чекман И.С., Беленичев И.Ф., Метаболитотропные препараты, Запорожье, 2007. 369 с.*
11. *Huss J.D.J.* Clin. Invest. 2005. V. 115. P. 547–555.
12. *Галенко-Ярошевский П.А., Чекман И.С., Горчакова Н.А.* Очерки фармакологии средств метаболической терапии. М.: Медицина, 2001. 240 с.
13. *Тишкин В.С.* Клинико-экспериментальное исследование эффективности средств метаболической коррекции в комбинированной терапии острого инфаркта миокарда. Дис. д.мед.н. Запорожье, 1989. 402 с.
14. *Мокрушин А.А., Павлинова Л.И., Гужова И.В., Маргулис Б.А.* // Докл. РАН. 2004. Т. 394. № 3. С. 419–422.
15. *Katschinski D.M., Le L., Schindler S.G., Thomas T., Voss A.K., Wenger R.H.* // Cell Physiol. Biochem. 2004. V. 14. P. 351–360.
16. *Dery M.A., Michaud M.D., Richard D.E.* // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005. V. 37. P. 535–540.
17. *Nowak T.S., Jr., Osborne O.C., Suga S.* Prog. Brain Res. 1993. V. 96. P. 195–208.
18. *Papadopoulos M.C., Sun X.Y., Cao J., Mivechi N.F., Giffard R.G.* // Neuroreport. 1996. V. 7. P. 429–432.
19. *Стефанов О.В.* Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) // Київ: “Авіацена”, 2002. 527 с.
20. *Прохорова М.И.* Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) Л.: Изд-во Ленинградск. ун-та. 1982. 272 с.
21. *Avrames S., Termynck T.* // Mol. Immunol. 1993. V. 30. P. 119–127.
22. *Beere H.M.* // J. Cell Science. 2004. V. 117. P. 2641–2651.
23. *McGrow C.P.* // Arch. Neurol. 1977. V. 34. № 6. P. 334–336.
24. *Ланач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. К.: “МОРИОН”, 2002. 640 с.
25. *Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 79–96.

Поступила в редакцию  
14.04.2011 г.