



УДК 615.35:537.875.1547.792].011.077

© 2012

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

**Молекулярно-биохимические механизмы активации
энергетического и пластического обмена
в митохондриях и цитозоле при острой церебральной
ишемии в эксперименте**

Исследованы молекулярно-биохимические механизмы активации энергетического и пластического обмена в митохондриях и цитозоле в условиях моделирования острой церебральной ишемии у монгольских песчанок. Показано, что устойчивость нервной ткани к гипоксии в условиях дифференциации по степени тяжести формируется за счет перестройки энергетических путей, а именно малат-аспартатного шунта, более устойчивого к гипоксии. Кроме того, установлено, что у животных с высокой резистентностью к ишемии наиболее низкое содержание не только малата, но и белков HSP 70 и HIF-1 в митохондриях головного мозга.

Окклюзия сосудов головного мозга является начальным звеном в патогенезе неблагоприятных процессов, сопровождающихся значительными нарушениями метаболизма в нейронах, структурно-функциональными изменениями, нередко заканчивающимися гибелью нервных клеток. Острая или хроническая ишемия мозговой ткани обуславливает возникновение 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, их влияние на течение и прогноз заболевания нередко не учитываются при разработке схем лечения. В последнее время нарушениям энергетического метаболизма и возможностям его коррекции уделяется большое внимание [3, 4]. Метаболическая терапия, осуществляемая как в острый, так и восстановительный период инсульта, является основным превентивным фактором по отношению к повторным инсультам, инвалидизации больных и их гибели [5, 6].

Адаптация к гипоксии, которая развивается при ишемии, и стабилизация энергообмена длятся недолго, сопровождаются истощением запасов гликогена и неспособностью анаэробного гликолиза в течение длительного времени обеспечивать энергетические нужды го-

лового мозга. Прогрессирование ацидоза может вызвать денатурацию некоторых белков и появление “зернистой дистрофии” [7–9].

В последнее время благодаря революционным открытиям в области молекулярной биологии было установлено значение регуляторных белков в функционировании многих звеньев энергетического метаболизма. Так, HSP (белок теплового шока) и белок HIF-1 (hypoxia induced factor) стабилизируется в клетках всех живых организмов в ответ на действие многочисленных стрессовых факторов, таких как гипоксия, тепловой шок, 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 [10].

Учитывая, что представления о доминирующей роли сукцинатаоксидазного механизма сформированы на обобщении результатов опытов с изолированными органами, культурами тканей при ишемии и гипоксии разной степени выраженности, целесообразным является изучение состояния лимитирующих звеньев энергетического обмена и компенсаторных метаболических шунтов и механизмов их молекулярной регуляции при ишемии головного мозга. Причем одновременное исследование различных метаболических процессов, уровня белков теплового шока (HSP 70) и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1), дает информацию о направленности и степени изменений этих процессов.

В связи с вышеизложенным нашей целью было исследование показателей, характеризующих состояние энергетического и пластического (содержание HSP 70 и HIF-1) метаболизма в митохондриях и цитозоле головного мозга монгольских песчанок при моделировании острой церебральной ишемии (ОЦИ) различной тяжести.

Материалы и методы. Нарушение мозгового кровообращения у монгольских песчанок (*Meriones unculatus*) массой 65–70 г моделировали путем необратимой односторонней перевязки сонной артерии. Все экспериментальные процедуры проводили согласно “Положению об использовании животных в биомедицинских исследованиях”. Животных выводили из эксперимента под тиопентал-натриевым наркозом (40 мг/кг, внутривенно).

Для биохимических исследований головного мозга обогащенную фракцию нейронов путем дифференцированного ультрацентрифугирования разделяли на две фракции — цитозольную и митохондриальную. Центрифугирование проводили 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 (мМДГ, цМДГ), НАД и НАДФ малатдегидрогеназы; сукцинатдегидрогеназы (СДГ), митохондриальной аспартатаминотрансферазы (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 определяли по методу Хохорста. Концентрацию изоцитрата в тканях рассчитывали по методу Зиберта [11].

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 электроолюцией 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 [12].

Выраженность неврологического дефицита определяли по шкале McGrow [13]. Тяжесть состояния оценивали по сумме соответствующих баллов: до 3 баллов — легкая степень; от 3 до 7 баллов — средняя степень; от 7 баллов и выше — тяжелая степень. Отмечали парезы, параличи конечностей, тремор, манежные движения, птоз, положение на боку, подвижность.

Сравнение полученных данных по группам проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Результаты исследования обрабатывали с применением статистического пакета лицензионной программы “STATISTICA for Windows 6.1” (StatSoft Inc., № AXXR712D833214SAN5), а также “SPSS 16.0”, “Microsoft Excel 2003” [14].

Результаты и их обсуждение. Для выяснения роли малатного шунта в механизмах компенсаторной продукции энергии и молекулярных механизмах его регуляции проведена рандомизация животных с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК) по степени устойчивости к ишемии по баллам шкалы Р. McGrow на 24 ч ишемии. Анализ показал, что у животных с высокими баллами по Р. McGrow (выраженная неврологическая симптоматика) содержание малата, АТФ и HSP 70, HIF-1 наиболее низкое (табл. 1). Усиленное освобождение лактата (более чем на 64% по отношению к контролю) при гипоксии способствует развитию метаболического лактатацидоза, который блокирует активность генов, что лимитирует адаптацию к гипоксии. На этой стадии гипоксии в клетке формируется истинный дефицит АТФ, поскольку аэробный механизм не функционирует вследствие кислородного дефицита, а анаэробный — из-за ацидоза. Кроме того, отмечался параллелизм в изменениях уровня малата и активности НАД-МДГ митохондрий, цитоплазматической АсТ и содержанием HSP 70 HIF-1. Установлена статистически достоверная корреляция между изменениями уровня малата, НАД-МДГ и HSP 70 ($r = 0,821$; $T = 2,94$). При этом уменьшение уровня малата в митохондриях коррелировало с высокой степенью достоверности со снижением содержания HSP 70 ($r = 0,899$; $T = 11,4$) и НАД-МДГ митохондрий ($r = 0,976$; $T = 6,3$), а также АсТ митохондрий ($r = 0,997$; $T = 9,1$) и АТФ ($r = 0,994$; $T = 9,3$).

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

Показатель	Интактные животные	Легкая степень	Средняя степень	Тяжелая степень
АТФ, мкмоль/г ткани	2,98 ± 0,092	1,65 ± 0,11*	1,312 ± 0,12*	1,12 ± 0,077*
Малат, мкмоль/г ткани	0,44 ± 0,022	0,51 ± 0,052*	0,37 ± 0,052*	0,20 ± 0,032*
Лактат, мкмоль/г ткани	2,78 ± 0,32	3,77 ± 0,47*	5,12 ± 0,52*	6,58 ± 0,21*
НАДФ-цМДГ, мкмоль/г ткани/мин	5,23 ± 0,21	5,44 ± 0,17	4,91 ± 0,81	4,12 ± 0,87*
НАДФ-мМДГ, мкмоль/г ткани/мин	6,27 ± 0,12	7,82 ± 0,32*	4,32 ± 0,23*	3,00 ± 0,21*
НАД-цМДГ, мкмоль/г ткани/мин	1,57 ± 0,052	1,55 ± 0,055	1,12 ± 0,032*	0,98 ± 0,043*
НАД-мМДГ, мкмоль/г ткани/мин	1,77 ± 0,11	2,65 ± 0,12*	1,12 ± 0,10*	0,82 ± 0,032*
мАсТ, мкмоль/г ткани/мин	3,67 ± 0,22	3,98 ± 0,54	2,34 ± 0,43*	1,21 ± 0,20*
цКФК, мкмоль/г ткани/мин	0,97 ± 0,021	1,11 ± 0,033	0,82 ± 0,021*	0,61 ± 0,023*
мКФК, мкмоль/г ткани/мин	0,82 ± 0,012	0,98 ± 0,027*	0,78 ± 0,017*	0,65 ± 0,026*
ЦХО, мкмоль/г ткани/мин	14,2 ± 0,8	11,3 ± 0,7*	5,7 ± 0,8*	4,0 ± 0,7*
HSP 70, у. е./г белка	15,4 ± 0,31	27,5 ± 0,37*	23,2 ± 0,4*	16,5 ± 0,28*
HIF-1, у. е./г белка	18,5 ± 0,65	31,6 ± 0,42*	26,4 ± 0,3*	19,2 ± 0,27

* $P < 0,05$ в сравнении с интактными животными.

Приведенные факты свидетельствуют о том, что продукция энергии в условиях острой церебральной ишемии зависит от функционирования малат-аспартатного шунта. Поэтому можно с определенной уверенностью утверждать о преимуществе малат-аспартатного шунта, во-первых, как более устойчивого к гипоксии и, во-вторых, обеспечивающего протонами в условиях острой ишемии электронно-транспортную цепь, частично замещая сукцинат-оксидазный механизм поставки протонов в электронную цепь. Кроме того, шунт Робертса лимитирован содержанием ГАМК в головном мозге [7, 10]. При этом увеличение малата является маркером производительности такой челночной системы, и уровень HIF-1 определяет возможность активации компенсаторного шунта энергии, а HSP 70 — возможность его длительного функционирования. Данное утверждение подтверждается работами других исследователей. Так, M. A. Dery, L. E. Huang установили, что белок HSP 90 способен связываться с доменом PAS В-фактора и стабилизировать его [10]. Белок HSP 70 регулирует функцию молекулы HIF-1, так называемый домен кислородзависимой дегградации (ODD) [10]. Роль этих межбелковых взаимодействий неясна; предполагается, что они необходимы для стабилизации HIF-1 в условиях нормоксии. В условиях гипоксии по крайней мере один из шаперонов (HSP 70) вытесняется из комплекса с HIF-1 белком ARNT, который в течение 20–30 мин гипоксии предохраняет структуру фактора от выраженного протеолиза. Таким образом, HSP 70 способен увеличивать время жизни фактора HIF-1 в условиях до и после гипоксии и, таким образом, необходим клеткам для надлежащей реакции на лишение кислорода [15].

Исследование показателей энергетического и пластического обмена в условиях 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-1). Угнетение продукции малата и активности НАД-МДГ митохондрий коррелирует с уменьшением АТФ, активности мКФК, цКФК HSP 70 и HIF-1, а также со степенью неврологических нарушений. Можно предположить, что в ответ на формирование ишемии головного мозга экспрессируется HIF-1, который инициирует запуск компенсаторных механизмов выработки энергии. В дальнейшем регуляция этих процессов переключается на HSP 70, который “продолжает” действие HIF-1, а также самостоятельно поддерживает экспрессию активности НАД-МДГ митохондрий, тем самым длительно обеспечивая активность малат-аспартатного челночного механизма.

1. *Argentine C., Prencipe M.* The burden of stroke: a need for prevention // *Prevention of Ischemic stroke.* – London: Martin Dunitz, 2006. – P. 1–5.
2. *Зозуля І. С., Боброва В. І.* Гострі порушення мозкового кровообігу як критичні стани в невропатології // *Укр. неврол. журн.* – 2006. – № 1. – С. 5–8.
3. *Румянцева С. А., Афанасьев В. В., Силкина Е. В.* Патофизиологическая основа комплексной нейропротекции при ишемии мозга // *Журн. неврологии и психиатрии.* – 2009. – № 3. – С. 64–68.
4. *Brann D. W., Dhandapani K., Wakade C. et al.* Neurotrophic and neuroprotective effects of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications // *Steroids.* – 2007. – **72.** – P. 381–405.
5. *Судаков Н. П., Никифоров С. Б., Константинов Ю. М. и др.* Механизмы участия митохондрий в развитии патологических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией // *Бюл. ВСНЦ РАМН.* – 2006. – № 5. – С. 332–336.
6. *Huss J. D.* Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance // *J. Clin. Invest.* – 2005. – **115.** – P. 547–555.
7. *Giordano F. J.* Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure // *Ibid.* – 2005. – **115.** – P. 500–508.
8. *Мазур І. А., Чежман І. С., Беленичев І. Ф. и др.* Метаболитотропные препараты. – Запорожье, 2007. – 369 с.

9. Галенко-Ярошевский П. А., Чекман И. С., Горчакова Н. А. Очерки фармакологии средств метаболической терапии. – Москва: Медицина, 2001. – 240 с.
10. 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.
11. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
12. Veere 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.
13. McGrow C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils // *Arch. Neurol.* – 1977. – **34**, No 6. – P. 334–336.
14. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. – Киев: Морион, 2002. – 640 с.
15. Zhou J., Schmid T., Frank R., Brüne R. PI3K/Akt is required from heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1 α from pVHL-independent degradation // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 13506–13513.

Запорозький державний медичинський університет Поступило в редакцію 06.12.2010
 Національний медичинський університет
 ім. А. А. Богомольця, Київ

Ю. М. Колесник, член-кореспондент НАН України **І. С. Чекман**,
І. Ф. Бєленічев, **Н. О. Горчакова**, **С. В. Павлов**, **Н. В. Бухтіярова**,
І. Ю. Яковлева

Молекулярно-біохімічні механізми активації енергетичного і пластичного обміну в мітохондріях та цитозолі при гострій церебральній ішемії в експерименті

Досліджено молекулярно-біохімічні механізми активації енергетичного і пластичного обміну в мітохондріях і цитозолі в умовах моделювання гострої церебральної ішемії у монгольських піщанок. Показано, що стійкість нервової тканини до гіпоксії в умовах диференціації за ступенем тяжкості формується за рахунок перебудови енергетичних шляхів, а саме малат-аспартатного шунта, який більш стійкий до гіпоксії. Крім того, визначено, що у тварин з високою резистентністю до ішемії найнижчий вміст не тільки малату, але й білків HSP 70 та HIF-1 в мітохондріях головного мозку.

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

Mitochondrial-cytozol ways of the energy production by molecular-biochemical mechanisms of energetic and plastic metabolism activation in mitochondria and cytozol under acute cerebral ischemia in experiment

Some molecular-biological mechanisms of energetic and plastic metabolism activation in mitochondria and cytozol under conditions of the cerebral ischemia modeling in Meriones unculatus are studied. It is shown that the nerve tissue resistance to hypoxia develops by remodeling the energy production ways and, specifically, the malate-aspartate way which is steady to hypoxia. Moreover, animals with resistance to hypoxia have the lowest levels of malate, HSP 70, and HIF-1 in mitochondria.