

СМОЛЕНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ

на правах рукописи

ИВАНОВА Анна Владимировна

СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И
АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА МИТОХОНДРИЙ ТКАНИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ КОМЕ И
РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ЕЕ КУПИРОВАНИЯ

03.01.04. – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

научный руководитель –
кандидат медицинских наук
доцент Н.М. Стунжас

Смоленск - 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление.....	2
Список использованных сокращений.....	4
Введение.....	5
Глава 1. Современные представления об особенностях метаболизма и энергетического обмена головного мозга при гипогликемических состояниях и после их купирования (обзор литературы)	
1.1 Гипогликемические состояния, их причины, клинические проявления.....	12
1.2 Особенности метаболизма мозга при гипогликемических состояниях.....	17
1.3 Состояние энергетического обмена мозга при гипогликемии.....	21
1.4 Патохимические механизмы повреждения нейронов при гипогликемической коме	24
1.5 Купирование гипогликемических состояний.....	37
Глава 2. Экспериментальные животные, условия опытов и методы исследования.	
2.1 Экспериментальные животные и условия опытов.....	44
2.2 Выделение митохондрий из ткани головного мозга и определение параметров их дыхания и фосфорилирования.....	47
2.3. Определение содержания белка.....	51
2.4 Определение содержания гидроперекисей липидов и общей антиоксидантной активности сыворотки крови и митохондриальной фракции головного мозга.....	51
2.5 Определение содержания малонового диальдегида (ТБК – активных продуктов) в митохондриальной фракции головного мозга.....	54

2.6	Определение содержания восстановленного глутатиона в митохондриальной и цитозольной фракции головного мозга.....	55
2.7	Определение содержания диеновых конъюгатов в суспензии митохондриальных мембран.....	56
2.8.	Статистическая обработка результатов исследования.....	57
Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение		
3.1.	Состояние окислительной и энергопреобразующей функции митохондрий мозга крыс при гипогликемическом судорожном синдроме и различных способах его купирования.....	59
3.1.1	Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга интактных животных.....	59
3.1.2	Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга при гипогликемическом судорожном синдроме	62
3.1.3.	Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга после купирования гипогликемического судорожного состояния введением глюкозы	66
3.1.4.	Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга крыс после купирования гипогликемического судорожного состояния введением глутамата натрия в сочетании с вдыханием воздуха в смеси с углекислым газом.....	70
3.2	Состояние липопероксидации в митохондриях головного мозга при гипогликемическом судорожном синдроме и после различных способов его купирования.....	77
Заключение.....		91
Выводы.....		100
Список литературы.....		102

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат
АМФ – аденозинмонофосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
АОЕ – антиоксидантная емкость
АФК – активные формы кислорода
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГЛП – гидроперекиси липидов
ГС – гипогликемический синдром
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖЛП – желточные липопротеиды
иЭЭГ – изоэлектрическая энцефалограмма
МДА – малоновый диальдегид
НАД(Ф) – никотинамидадениндинуклеотид (фосфат)
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СРО – свободно радикальное окисление
ТБК – тиобарбитуровая кислота
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
АСРD – транс-L-2-амино-4-фосфобутират
АМРА – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионат
GLUT 1-7 – переносчик глюкозы 1-7
GRP 75 – глюкозорегулирующий белок 75
GSH – восстановленный глутатион
L-AP4 – транс-L-аминоциклопентан-1,3-дикирбокмилат
NMDA – N-метил-D-аспартат
PARP-1- поли-(АДФ-рибоза)-полимераза-1

ВВЕДЕНИЕ

Проблема поражения головного мозга при тяжелых гипогликемических состояниях, весьма часто встречающихся в клинической практике, остается актуальной, не смотря на огромное количество исследований.

В настоящее время нет единого подхода в понимании патогенетических основ повреждения головного мозга в результате развития тяжелой гипогликемии.

Перестройка метаболизма в ткани мозга на начальных этапах гипогликемических состояний носит, несомненно, адаптивный характер. При гипогликемии потребление мозгом кислорода не уменьшается в той же степени, с какой падает потребление глюкозы, поскольку в катаболический процесс вовлекаются другие эндогенные субстраты: метаболиты гликолиза, цикла Кребса, аминокислоты, пептиды (Телушкин П.К., 2009; Agardh C.-D. et al., 1981).

Очевидно, что исчерпание адаптивных возможностей ткани мозга по поддержанию своего энергетического статуса ведет к постепенному нарушению тонко скоординированных метаболических процессов, их извращению и, как следствие, к гибели нейронов.

Падение энергетического потенциала ткани головного мозга, вследствие снижения поступления глюкозы, рассматривается некоторыми исследователями как важный, но не основной фактор проявления гипогликемической комы и развития судорожного состояния.

Наиболее популярной в настоящее время считается гипотеза о доминирующей роли глутаматэргических структур мозга в эксайтотоксическом повреждении нейронов при гипогликемии (Auer R.N. et al., 1991; Nehlig, 1997). Одной из причин развития цитотоксических эффектов и гибели нейронов при чрезмерной активации глутаматэргических структур является Ca^{2+} -зависимое увеличение

продукции оксида азота NO (Schulz J. V. et al., 1995). Сам оксид азота также может, за счет нитрозилирования, блокировать работу дыхательных ферментов, имеющих в своем составе железо-сероцентры (Chénais V. et al., 2002). Опубликованными работами последних лет подтверждается факт интенсификации при гипогликемической коме процессов окисления липидов ткани мозга (Patockova J. et al., 2003) и, конкретно липидов, мембран митохондрий (Ballesteros J.R. et al., 2003).

В таких условиях электронтранспортные системы митохондрий не могут оставаться интактными, вплоть до необратимых их повреждений. Однако, вопрос в том, на каких этапах гипогликемии начинают развиваться такие наиболее тяжелые и, притом, необратимые изменения в метаболизме ткани мозга остается открытым. Имеющиеся в литературе данные по функциональному состоянию митохондрий, оксидантному статусу мозга касаются тяжелых степеней гипогликемии с полной и притом довольно длительной утратой его спонтанной электрической активности (Agardh et al., 1981).

Различия во временном аспекте длительности пребывания животных в тяжелом гипогликемическом состоянии, их видовые особенности, а также различная чувствительность структур мозга к гипогликемии могут быть причиной нередко противоречивых данных о состоянии липопероксидации в ткани мозга, ее антиоксидантных возможностей и выраженности митохондриальных дисфункций (Шестакова С.А., 2009). Однако, пусковым моментом развития наиболее тяжелых изменений в метаболизме мозга некоторые исследователи склонны считать все же восстановительный период выхода из гипогликемической комы после введения глюкозы (Suh S.W. et al., 2007).

Аммиачная интоксикация, развивающаяся при гипогликемическом шоке, является еще одним из факторов, играющим немаловажную роль в повреждении головного мозга. Особенно высокая концентрация аммиака в

ткани мозга создается в судорожный период гипогликемической комы (Козлов Н.Б., 1960). Исследованиями автора была убедительно доказана возможность купирования судорожного состояния введением не глюкозы, а глутамата натрия с последующим вдыханием воздуха с добавлением 7-8% углекислого газа, что не приводило к подъему уровня глюкозы в крови. Предложенный способ вскоре был даже апробирован в клинической практике (Вангейм К. А., 1962), однако в дальнейшем не привлек к себе должного внимания исследователей.

В последующие годы был установлен ряд новых научных фактов, делающих актуальным углубленное изучение механизма купирующего гипогликемический шок эффекта CO_2 при его совместном применении с глутаминовой кислотой. Так, было показано, что гиперкапническое состояние, вызванное вдыханием газовой смеси с 7 – 8 % CO_2 способствуют поддержанию энергетического статуса мозга животных, находящихся в гипогликемической коме (Pellegrino D. et al., 1981). Исследованиями Когана А. Х. и соавторов (1996) убедительно проиллюстрировано, что углекислый газ обладает сильным ингибирующим влиянием на генерацию активных форм кислорода как при прямом воздействии на клетки различных органов и систем, так и при воздействии на целостный организм.

С учетом вышеизложенного очевидно, что сравнительный анализ динамики ответа электронтранспортных цепей митохондрий мозга на два принципиально отличных способа купирования гипогликемического шокового состояния представляется важным в плане углубления существующих знаний о состоянии биоэнергетических процессов в ткани мозга в условиях, как самой гипогликемии, так и возможных ее последствий.

Цель исследования: проведение сравнительного анализа метаболических изменений в работе дыхательных цепей митохондрий и их

оксидантного статуса при гипогликемической коме на высоте судорожного состояния и в различные сроки восстановительного периода после купирования как глюкозой, так и глутаматом натрия в сочетании с вдыханием гиперкапнической газовой смеси.

Задачи исследования:

1. Изучить состояние окисления и фосфорилирования в митохондриях, выделенных из ткани мозга как здоровых животных (контроль), так и крыс в состоянии инсулин-индуцированной гипогликемической комы на высоте судорожного состояния.

2. Изучить состояние окисления и фосфорилирования в митохондриях, выделенных из ткани мозга животных после купирования гипогликемической комы введением глюкозы (после исчезновения симптомов коматозного состояния, и спустя сутки)

3. Изучить состояние окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга в те же сроки, но после купирования комы введением глутамата натрия в сочетании с вдыханием гиперкапнической газовой смеси (воздух + 7% CO₂)

4. Изучить интенсивность перекисных процессов в организме подопытных животных в целом (в сыворотке крови) и в мембранах митохондрий мозга.

Научная новизна исследования: В данном диссертационном исследовании впервые проведен анализ параметров дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий головного мозга крыс на ранней стадии развития гипогликемической комы (судорожное состояние) и в различные сроки после ее классического купирования глюкозой.

В работе представлены также результаты исследования дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий мозга при использовании альтернативного способа купирования гипогликемического судорожного

синдрома введением глутамата натрия с одновременным вдыханием воздушной гиперкапнической газовой смеси.

Обобщенный диссертационный материал указывает на интенсификацию процессов липопероксидации в митохондриальных мембранах уже в начальные сроки восстановительного периода после купирования гипогликемического шока, дается оценка антиоксидантных возможностей этих органелл.

Практическая и теоретическая значимость: Полученные результаты расширяют существующие представления об этапности развития метаболических изменений в ткани мозга в условиях тяжелой гипогликемии и являются перспективными в плане выработки новых подходов к коррекции выявляемых нарушений, а возможно, и разработке превентивных мер их профилактики.

Методология и методы исследования: Работа основана на сравнении респираторных параметров дыхательных цепей митохондрий, выделенных на высоте судорожного состояния гипогликемической комы и после ее купирования, а также оксидантного статуса этих органелл. Для проведения исследования использовали полярографический анализ, хемилюминисцентные и спектрофотометрические методики.

Положения, выносимые на защиту:

1. Дыхательные цепи митохондрий вовлекаются в общую ответную реакцию нервной ткани на гипогликемический шок, повышая свою дыхательную и фосфорилирующую способность.

2. Купирование судорожного состояния глутаматом натрия в сочетании с углекислым газом, в отличие от классического купирования глюкозой, в краткосрочной перспективе, нивелирует эти изменения в работе дыхательных цепей митохондрий.

3. Через сутки, вне зависимости от способа купирования, ряд параметров, характеризующих дыхание митохондрий, оказывается существенно измененным.

4. Под влиянием высоких доз инсулина, не смотря на купирующее действие примененных веществ, в митохондриальных мембранах интенсифицируются процессы ПОЛ.

5. Антиоксидантные возможности этих органелл (восстановленный глутатион - GSH, антиоксидантная емкость - АОЕ) в указанные временные сроки остаются не исчерпанными.

Степень достоверности и апробация результатов исследования:

Результаты получены современными биохимическими методами. Основные выводы работы и выносимые на защиту положения являются обоснованными и полностью соответствуют полученным результатам. Достоверность выводов подтверждается корректной статистической обработкой данных.

Материалы диссертации были представлены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), на конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск 2009), на VI научно-практической конференции с международным участием «Antioxidants and ROS» (Смоленск, 2009), на 37 конференции молодых ученых СГМА (Смоленск, 2009), на 2 международной конференции РАНМС «Recent advances in health and medical sciences» (Cyprus, 2010), на всероссийской научно-практической конференции «Основы формирования здорового образа жизни» (Смоленск, 2012)

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации: Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, иллюстрирована 2 рисунками и 12

таблицами; состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, и списка цитируемой литературы (216 источников, в том числе 172 на иностранных языках)

Личный вклад автора в работу состоит в планировании и постановке экспериментов, статистической обработке и интерпретации результатов экспериментов.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОСОБЕННОСТЯХ МЕТАБОЛИЗМА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ И ПОСЛЕ ИХ КУПИРОВАНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

1.1 Гипогликемические состояния, их причины, клинические проявления.

Проблема поражения головного мозга при тяжелых гипогликемических состояниях остается актуальной, несмотря на огромное количество исследований. Термин «гипогликемия», как известно, обозначает снижение концентрации глюкозы в крови, что влечет за собой недостаточное обеспечение клеток, тканей и, прежде всего, мозга этим основным энергетическим субстратом. Концентрация глюкозы в крови является одной из важнейших гомеостатических констант живого организма и необходимым условием метаболического благополучия тканей.

На сегодняшний день механизмы гибели нейронов при гипогликемическом шоке связывают с патологической ролью нейротрансмиттеров, в частности глутамата, с отягощением нейронов кальцием, оксидантным стрессом, с нарушением целостности мембран, которые и приводят к отеку, набуханию нейрона, активации внутриклеточных протеаз и, в конечном итоге, к гибели нейрона. В центре этих патологических каскадов лежит энергетический дефицит, развивающийся в результате снижения концентрации восстановленных эквивалентов, являющихся источниками электронов для дыхательных цепей митохондрий.

Падение энергетического потенциала ткани, вследствие снижения поступления глюкозы - основного энергетического субстрата мозга, рассматривается исследователями как важный, но не основной фактор проявления гипогликемической комы и развития судорожного состояния.

Хорошо известно, что неврологическая симптоматика при гипогликемии, в отличие от ишемическо-гипоксических воздействий, возникает при степенях ее, еще существенно не затрагивающих энергетическое состояние мозга.

Причины гипогликемических состояний, которые в клинической практике принято называть гипогликемическим синдромом (ГС), весьма разнообразны. Наиболее важной и, притом, весьма частой причиной гипогликемического синдрома является передозировка инсулина или его неправильное распределение в течение дня при лечении больных, страдающих сахарным диабетом. Но этот синдром может быть также следствием нарушения пищевого режима, недостаточного приема углеводов, приема алкогольных напитков, чрезмерной мышечной работы, изменения всасывания глюкозы в кишечнике, наличия жировой дистрофии печени, хронической почечной недостаточности, которая приводит к увеличению времени циркуляции инсулина в крови и нарушению его экскреции с мочой. К гипогликемическому синдрому может приводить повышенная инсулин - чувствительность или понижение инсулин-активирующей способности печени; прием салицилатов, сульфаниламидных препаратов, адrenoблокаторов, особенно при назначении их в комбинации с инсулином. Гипогликемический синдром может развиваться и при интеркуррентном заболевании, сопровождающемся рвотой (Choudhary P. et al., 2011).

Гипогликемический синдром обычно развивается при снижении уровня глюкозы ниже 2,8 - 3,0 ммоль/л. Однако, в последнее время было установлено, что снижение показателей гликемии ниже 4,0 - 4,2 ммоль/л уже сопровождается повышением уровня секреции контринсулиновых гормонов (Teh M.M. et al., 2010). Поэтому с физиологической точки зрения, гипогликемию следует определять как снижение глюкозы крови ниже 4,2 ммоль/л, что особенно важно при использовании заместительной

интенсифицированной инсулинотерапии у больных сахарным диабетом (Balsells M. et al., 1997).

Для развития гипогликемического синдрома имеет значение не только уровень гликемии, но и скорость снижения глюкозы в крови. Возникновение приступа гипогликемии зависит также и от индивидуальной чувствительности организма к дефициту глюкозы. Следует подчеркнуть, что симптомы гипогликемического синдрома наиболее часто можно наблюдать при лечении инсулином на первом году болезни, что особенно свойственно детям раннего возраста.

Одной из причин развития гипогликемий у больных сахарным диабетом является дефект эпинефринового ответа. Распространенность его у детей с большой длительностью сахарного диабета составляет 40% (Borg M. et al., 1995, 1997).

Выброс адреналина, как и продукция глюкагона, является специфическим ответом на гипогликемию. Нарушение его секреции наблюдается часто при автономной нейропатии, но может встречаться и без нее. (Fanelli C. G. et al., 1994)

Клинические проявления ГС можно разделить на адренергические и нейрогликопенические симптомы. Адренергические симптомы при гипогликемии: объективные – усиленное потоотделение, учащенное и усиленное сердцебиение, повышение артериального давления, гиперемия или бледность кожных покровов, расширение зрачков, тремор рук; субъективные - неосознанное беспокойство и чувство страха, легкая оглушенность, эйфория, повышенная раздражительность, озноб, чувство внутренней дрожи, снижение зрения и диплопия.

При этом наблюдается возбуждение парасимпатического отдела вегетативной нервной системы, проявляющееся в чувстве голода, усиленном слюноотделении, тошноте, спастическими болями в животе. Нейрогликопенические симптомы гипогликемии отличаются большим

разнообразием – от легких нарушений эмоциональной и поведенческой сферы до тяжелых необратимых расстройств жизненно важных систем: сердечно-сосудистой и дыхательной. Расстройство функции диэнцефальных структур и коры головного мозга проявляется головокружением, головной болью, раздражительностью, беспокойством, нарушением памяти, сонливостью, апатией, заторможенностью, оглушенностью, иногда кратковременными обмороками, неадекватностью речи и поступков, а также тремором, гипергидрозом, желудочно-кишечным дискомфортом, гиперемией или лихорадкой, парестезией (чаще в области губ и языка).

У ряда больных наблюдается отсутствие реакции (в виде проявления ранних клинических симптомов, т.е. отмечается отсутствие адренергических механизмов) на снижение гликемии, что свидетельствует о наличии автономной нейропатии и энцефалопатии. Сознание больных в этот период может быть спутанным, а иногда - с проявлением агрессии, или, напротив, – заторможенности. Эта фаза бывает длительной и в ее пределах некоторые больные иногда бессознательно выполняют различные действия. Самостоятельный выход этой группы больных из гипогликемической комы затруднен. Рецидивы гипогликемии способствуют стабилизации потери чувствительности к ранним симптомам гипогликемии. Больные, имеющие такие проявления, должны поддерживать более высокие показатели глюкозы крови для того, чтобы избежать появления повторных гипогликемий. Таким образом, между уровнем гликемии и функциональным состоянием мозга существует явно выраженная зависимость. При снижении концентрации глюкозы в крови до 1,0 – 1,5 мМ/л у человека наступает кома. У крыс признаки гипогликемии (понижение двигательной активности, заторможенность) развиваются при уменьшении концентрации глюкозы в крови ниже 2,0 мМ/л; потеря рефлекса

положения («кома») наблюдается при концентрации глюкозы в крови ниже 1,0 мМ/л. В состоянии комы возможны местные и генерализованные судороги. Нарушение деятельности мозга при гипогликемии коррелирует с прогрессирующими изменениями электрофизиологических функций. Так, при нарушении сознания наблюдается общее замедление ЭЭГ. Развитие судорожного состояния сопровождается появлением множественных спайков, накладывающихся на медленно волновую активность с постепенной полной ее утратой (и ЭЭГ).

При глубокой и длительной гипогликемии может развиваться следующая клиническая симптоматика: анизокория, нистагм, страбизм, вялая реакция зрачков на свет, угнетение сухожильных и брюшных рефлексов, снижение тонуса мышц, патологические рефлексы, гиперкинезы (тризм, тонические или клонические судороги). Глубокая и продолжительная гипогликемия может привести к развитию внеклеточного отека мозга.

Развитие гипогликемического симптомокомплекса может носить волнообразный характер, что допускает большую лабильность и временную обратимость ряда симптомов.

Некоторые авторы (Дедов И.И. с соавт., 2000) отмечают различия в клинических проявлениях ГС в зависимости от быстроты падения уровня глюкозы в крови. При медленном снижении уровня гликемии возможна адаптационная перестройка метаболизма и, как следствие, отсутствие клиники ГС. На функции мозга влияет не только содержание глюкозы в притекающей крови, но и ее количество, поступающее в мозг. Поэтому гипогликемический симптомокомплекс может развиваться и при нормальной гликемии, если в мозг переходит малое количество глюкозы. Если же в мозг поступает достаточное количество глюкозы, даже при условии существенного снижения ее уровня в крови, то этот симптомокомплекс может и не развиваться вообще.

1.2. Особенности метаболизма мозга при гипогликемических состояниях.

Мозг является единственным органом, покрывающим свои энергозатраты исключительно за счет окисления углеводов. Энергетические же потребности мозга весьма велики, и 65 – 70% циркулирующей в крови глюкозы утилизируется центральной нервной системой. Это и предопределяет опасность гипогликемических состояний. В отсутствие глюкозы, как впрочем, и при дефиците кислорода, существенно меняется метаболизм мозга, что и ведет к морфофункциональным изменениям его ткани, приобретающим на определенном этапе необратимый характер.

Так как мозг изолирован от общего кровотока гемато-энцефалическим барьером (ГЭБ), глюкоза должна проходить через клетки эндотелия и плазматические мембраны нейронов и глии. Глюкоза поступает в мозг путем облегченной диффузии с участием особых переносчиков. Этот процесс характеризуется насыщаемостью и стереспецифичностью, не зависит от энергии, концентрации катионов Na^+ и инсулина (Lund – Andersen H., 1979; Pardridge W.M., 1983). Процесс транспорта опосредован специфическими белками облегченной диффузии глюкозы. Было обнаружено семь представителей этого мультигенного семейства. Они известны как GLUT1-7 (Pessin J.E. et al., 1992; Bell G.I., 1993). Два из них, GLUT1 и GLUT3, были обнаружены в мозге (Pardridge W.M. et al., 1990; Maher F., 1993). GLUT 1 находится в ГЭБ, а GLUT 3 осуществляет транспорт глюкозы через плазматическую мембрану нейронов (Pessin J.E. et al., 1992; Vanucci S.J., 1994). В микрокапиллярах человеческого мозга широко распространены переносчики глюкозы, сходные с GLUT1, они же характерны и для других видов млекопитающих (Kalaria R.N. et al., 1988). GLUT 3, предположительно, играет важную роль

в регуляции энергетических затрат дендритов и аксонов, таким образом, участвуя в нейротрансмиссии (Mantych G.J. et al., 1992; Simpson I.A. et al., 2008).

В нормальном состоянии непрямой транспорт глюкозы из крови в мозг осуществляется в значительном избытке (3:1) по отношению к скорости ее утилизации (Lund – Andersen H., 1979; Pardridge W.M., 1983). Окисление других субстратов в ткани мозга начинается в значительной мере только при некоторых особых обстоятельствах, таких как голодание и гипогликемия. Лишь некоторые отделы мозга, лежащие за гематоэнцефалическим барьером, способны использовать жиры как источник энергии и, поэтому, они менее чувствительны к дефициту глюкозы. Метаболизм глюкозы в мозге, в отличие от такового в скелетных мышцах, не столько лимитирован транспортом, сколько ограничен фосфорилированием. Даже, когда транспорт глюкозы становится ограниченным, как в случае гипогликемии, основным лимитирующим фактором является ГЭБ, а не мембраны нейронов или клеток глии, так как глюкоза быстро переносится из мозгового межклеточного пространства во внутриклеточные компартменты (Lund – Andersen H., 1979; Gjedde A. et al., 1983).

Так как невысокий уровень эндогенной глюкозы и гликогена в мозге может обеспечивать энергетический метаболизм только в течение очень короткого периода времени, должен осуществляться постоянный приток глюкозы с кровью. Падение концентрации глюкозы в крови ниже нормы (ниже 1 -2 мкмоль/мл) приводит к снижению скорости окисления глюкозы без соответствующего снижения скорости утилизации кислорода, указывая на то, что при гипогликемии энергетический метаболизм поддерживается иными субстратами.

На начальных стадиях развития гипогликемии, очевидно, происходит утилизация различных интермедиатов метаболизма, так как их

концентрация в мозге снижается. Концентрации эндогенной глюкозы и гликогена (Ghajar J.B.G. et al., 1985), промежуточных продуктов цикла Кребса, за исключением оксалоацетата и сукцината, а также аминокислот, за исключением аспартата (Feise G. et al., 1977), снижается к моменту падения концентрации глюкозы в крови до 2 ммоль/мл и продолжают падать в течение первых пяти минут комы. Наибольшая скорость утилизации доступных эндогенных метаболитов и аминокислот наблюдается спустя 5 мин после развития комы (Agardh C.-D. et al., 1981).

Лактат, кетоновые тела и свободные жирные кислоты крови в обычных условиях не являются энергетическими субстратами в мозге взрослых млекопитающих (McIlwain H. et al., 1971; Siesjo B.K. et al., 1978). Хотя мозг и способен окислять другие субстраты кроме глюкозы, однако, только глюкоза проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в достаточных количествах для поддержания энергетического статуса мозга (McIlwain H. et al., 1971; Pardridge W.M. et al., 1977; Siesjo B.K. et al., 1978). Многие аминокислоты имеют сравнительно малую величину скорости переноса через ГЭБ (Pardridge W.M. et al., 1977). Тем не менее, некоторые исследователи полагают, что углеродные скелеты поступающих из крови аминокислот все же могут использоваться в качестве метаболических субстратов (Siesjo B.K. et al., 1983). Кетоновые тела в определенных условиях могут утилизироваться мозгом взрослого человека (Siegel G.J. et al., 1999), однако, гиперкетонемия, вызванная усилением липолиза за счет активации симпатoadреналовой системы, не в состоянии поддерживать метаболизм и функции мозга при инсулин-индуцированной гипогликемии (Fanelli C. et al., 1993). Некоторые исследования показывают, что лактат крови при гипогликемии у животных с экспериментальным сахарным диабетом может быть использован мозгом в качестве энергетического субстрата (Avogadro A. et al., 1990) и, более того, может оказывать

защитное действие на функции мозга при гипогликемии даже у человека (King P. et al., 1997, Haces M.L. et al., 2008).

Косвенные свидетельства указывают на то, что эндогенные не углеводные субстраты могут также использоваться в качестве источника энергии при тяжелой гипогликемии. Содержание фосфолипидов в ткани мозга уменьшается через 5 мин после развития комы, следовательно, они могут выступать в качестве возможных субстратов энергетического метаболизма на первых стадиях комы а, возможно, и на более поздних ее этапах (Agardh C.-D. et al., 1981). Имеются также данные о падении содержания белков и нуклеиновых кислот при тяжелой гипогликемии (Abood L.G. et al., 1955), однако, эти факты не подтверждаются другими исследователями (Davis J.M. et al., 1970).

Хотя альтернативные субстраты и утилизируются в той или иной степени мозгом при тяжелой гипогликемии, они все же не могут обеспечить достаточного уровня энергетического метаболизма в его ткани и препятствовать развитию комы (Siesjö B., 1978).

Развитие гипогликемической комы, как это было показано на крысах, сопряжено с существенным изменением кислотно-щелочного баланса в ткани головного мозга. Кратковременный кислотный сдвиг на начальных этапах комы сменяется выраженным (на 0,2 единицы pH) защелачиванием (Bengtsson F. et al., 1990). Увеличение pH при гипогликемии отмечалось не только в межклеточном пространстве, но также внутри клеток (цитоплазматический pH). Увеличение цитоплазматического pH, возможно, связано как с недостатком лактата в клетках мозга (Auer R. N., 2004), так и с вовлечением в окислительные процессы эндогенных аминокислот, высвобождающих свободный аммиак (Auer R. N., 2004; Pelligrino D. et al., 1981; Honegger P. et al., 2002; Mellergard P., 1993).

1.3. Состояние энергетического обмена мозга при гипогликемии

Дыхательная цепь является центральным звеном энергетического метаболизма в головном мозге, так как она обеспечивает связь между субстратами и потреблением кислорода при синтезе АТФ. Изменения в потоке восстановленных эквивалентов от субстрата к кислороду отражаются на окислительно-восстановительном состоянии компонентов дыхательной цепи и поэтому являются чувствительным индикатором тканевой метаболической активности.

Первоначально результаты о влиянии гипогликемии на обмен макроэргических соединений в мозге имели противоречивый характер. Так, одни авторы обнаружили расстройства энергетического обмена при выраженной гипогликемии (Hinzen D.H. et al., 1971; Tews J.K. et al., 1965), другие нашли, что концентрация высокоэнергетических фосфатов не изменялась (Ferrendelli J.A. et al., 1973; Tarr M. et al., 1962). В дальнейшем было установлено, что различия в результатах связаны со степенью нарушений функций мозга (т.е. с глубиной комы). Так, если не анестезированных животных замораживали сразу на момент потери постуральных рефлексов, содержание в мозге фосфокреатина и АТФ существенно не снижалось (Gorell J.M. et al., 1976). С другой стороны, было показано, что если у животных, находящихся на искусственной вентиляции легких в предкоматозном состоянии, соответствующем появлению на ЭЭГ медленных волн и полипиков, концентрация фосфокреатина, АТФ, АДФ, АМФ, заметно не снижается, то через 5 мин и ЭЭГ она резко уменьшается при концентрации глюкозы в крови около 1,0 моль/л (Agadarh C.- D. et al., 1978; Feise G. et al., 1978; Lewis L.D. et al., 1974; Norberg K. et al., 1976). Таким образом, уменьшение уровня АТФ, по-

видимому, не является причиной возникновения электрофизиологических нарушений (DiRoosco R.J., 1986).

Отношение фосфокреатин/неорганический фосфат (индикатор потенциала фосфорилирования), вероятно, является более точным показателем уровня энергообеспечения нейронов, поскольку этот параметр начинает существенно уменьшаться при снижении гликемии начиная с 2,0 ммоль/л (Imai T. et al., 1996).

Тяжелая и продолжительная гипогликемия приводит к уменьшению общего пула адениловых нуклеотидов (суммы АТФ, АДФ и АМФ) (Agardh C.-D. et al., 1978; Feise G. et al., 1978; Lewis L.D. et al., 1974; Norberg K. et al., 1976) и накоплению аденозина, инозинмонофосфата, инозина и гипоксантина (Chapman A.G. et al., 1981). Эти результаты показывают, что АМФ расщепляется через реакции, катализируемые 5-нуклеотидазой (КФ 3.1.3.5) и АМФ-деаминазой (КФ 3.5.4.6). Кроме того, уменьшение концентрации АТФ сопровождается параллельным снижением уровня ГТФ, УТФ и ЦТФ (Chapman A.G. et al., 1981).

В тоже время уровень потребления кислорода в мозге остается неизменным, по крайней мере, в течение 15 мин изоэлектрической ЭЭГ. Падение содержания АТФ, на фоне высокого уровня потребления кислорода, может быть связано как с возросшими энергетическими потребностями мозга в состоянии гипогликемической комы, так и с разобщением дыхания и окислительного фосфорилирования. Последнее предположение, однако, не получило экспериментального подтверждения (Agardh C.-D. et al., 1982), что позволило сделать заключение об относительности резистентности митохондрий мозга к гипогликемии. Однако в работе Agardh C.D. et al. (1982) было показано, что малат- и глутаматзависимое дыхание митохондрий, выделенных из мозга крыс после тяжелой гипогликемии (30 минут отсутствия электроэнцефалографической активности), характеризовалось снижением

чувствительности к стимулирующему влиянию АДФ (состояние 3) и выраженным падением показателя дыхательного контроля по Чансу (V_3/V_4). После 60-минутной гипогликемии эти изменения оказались еще более существенными, а для сукцинат-зависимого дыхания было выявлено при этом и снижение степени сопряжения окисления и фосфорилирования. Изменения в дыхании митохондрий мозга после 30 минутной гипогликемии оказались потенциально обратимыми: спустя 90 минут после нормализации уровня глюкозы в крови параметры дыхания практически вернулись к контрольным значениям. Однако, полного восстановления исходного энергетического статуса мозга (по уровню макроэргов) авторами не было выявлено.

Принципиально иными оказались изменения в восстановительном 90-минутном периоде после одночасовой гипогликемической комы. Как следует из цитируемой работы, в этом случае восстановительный период, несмотря на достаточное снабжение мозга глюкозой, характеризовался дальнейшими ухудшениями респираторных характеристик митохондрий и еще большим снижением энергоэффективности их дыхания.

Таким образом, из представленных данных следует, что митохондрии мозга все же не остаются резистентными в условиях гипогликемического метаболического стресса. Очевидно, что вовлечение дыхательных цепей этих органелл в ответную реакцию нервной ткани на гипогликемию определяется не только степенью дефицита глюкозы, как основного энергетического субстрата, но и продолжительностью такого воздействия. Может ли ответ митохондрий в условиях гипогликемии быть проявлением их адаптивных возможностей, или он является результатом только деструктивных процессов в митохондриальных мембранных структурах – подобного рода вопросы не находят своего освещения в доступной литературе.

1.4. Патохимические механизмы повреждения нейронов при гипогликемической коме.

До настоящего времени нет четкого представления о том, нарушение функций каких структур головного мозга приводит к развитию гипогликемической комы. Патогистологические изменения у животных, погибших от гипогликемии, показывают, что ранние и наиболее тяжелые поражения развиваются в коре головного мозга; нейроны ствола мозга и подкорковых узлов оказываются менее подверженными повреждениям (Madl J.E. et al., 1999). Грубые патологические изменения ЭЭГ коры мозга также развиваются быстрее, чем нарушения электрической активности образований ствола мозга (Honegger P. et al., 2002; Zeevalk G.D. et al., 2000). По мнению других исследователей (Aral Y.Z. et al., 1998; Hernández-Fonseca K. et al., 2005), возникновение гипогликемической комы может быть связано с избирательным угнетающим действием гипогликемии на ретикулярную формацию. Однако, клинические данные свидетельствуют о том, что первичные физиологические нарушения при гипогликемии могут почти беспорядочно возникать на нескольких различных уровнях ростральных отделов нервной оси, а при последующих приступах гипогликемии дисфункция может обнаруживаться и в иных структурах (Ferrand-Drake M. et al., 2003).

Считается, что мозг относительно устойчив к гипогликемическому повреждению нейронов. Действительно, нейрональный некроз не наблюдается до появления изоэлектрической ЭЭГ (Auer R.N. et al., 1984). У человека при гипогликемическом повреждение мозга нейрональный некроз наблюдается в коре головного мозга, полосатом теле, СА1 области зубчатой извилины гиппокампа (Kalimo H. et al., 1980; Auer R.N., 1986, 1989; Hernández-Fonseca K. et al., 2012). У крыс и обезьян повреждения нейронов обнаруживаются в коре больших полушарий и гиппокампе

(Brierley J.V. et al., 1971; Auer R.N. et al., 1984, 1985,). Мозжечок же считается структурой, относительно устойчивой к гипогликемическому повреждению нейронов (Agardh C.-D. et al., 1981).

Гипогликемия приводит к гибели нейронов, хотя нарушение поступления глюкозы, вероятно, не является прямой причиной этого. Наиболее популярной в настоящее время считается эксайтотоксическая теория гибели нейронов. Впервые гипотеза эксайтотоксичности была сформулирована Olney J.W. et al. (1999). Согласно этой гипотезе, чрезмерная стимуляция глутаматных рецепторов путем увеличения концентрации их агонистов или их продолжительной активации при умеренном повышении концентрации самих возбуждающих аминокислот, приводит к гиперактивации нейронов и их повреждению. Эта гипотеза основывается на более ранних данных, свидетельствующих о том, что глутамат индуцирует нейротоксичность как *in vivo*, так и *in vitro* (Lucas D.R. et al., 1957).

Теория эксайтотоксичности, в первом приближении, состоит в том, что любое повреждающее воздействие на “первый” нейрон, приводящее к деполяризации мембраны и генерации продолжительной серии потенциалов действия, приводит к массивному высвобождению нейротрансмиттеров его синаптическими окончаниями. Избыточная активация рецепторов постсинаптической мембраны приводит к гибели “второго” нейрона (Голубев А. Г., 1994).

Глутамат является основным возбуждающим медиатором в составе ЦНС (Дамбинова С.А., 1989; Fonnum F., 1984; Ottersen O.P., 1991). Нейроны коры освобождают эксайтотоксины (глутамат) окончаниями кортикофугальных и кортикокортикальных глутаматэргических волокон (Auer R.N. et al., 1993). Нейротрансмиттерная функция глутамата характерна также для волокон, идущих из коры в другие области, включая прилежащее ядро перегородки, обонятельные бугорки, миндалину,

верхние холмики пластинки четверохолмия, вентральное поле покрышки, красные ядра, черную субстанцию, ядра моста и спинной мозг (Ottersen O.P., 1991). Изучение гиппокампа млекопитающих позволило сделать заключение о том, что все основные входящие и выходящие пути гиппокампа также являются глутаматэргическими (Ottersen O.P., 1991). Таким образом, если принять во внимание приведенные выше морфологические данные, то максимальное повреждение нейронов при гипогликемии наблюдается именно в областях мозга, имеющих наибольшее количество глутаматэргических синапсов.

Вовлечение эндогенных возбуждательных аминокислот в развитие острых патологических состояний центральной нервной системы подтверждается значительным увеличением внеклеточных концентраций глутамата и аспартата в ткани головного мозга. Считается, что накопление этих медиаторов снаружи клетки может происходить в результате, как увеличения их выброса из нервных окончаний, так и нарушения в функционировании АТФ-зависимой системы репоглощения этих нейромедиаторов клетками (Isaev N. K. et al., 2007)

В настоящее время доказано наличие в ткани мозга пяти основных типов рецепторов глутамата, которые получили свое название от агонистов, вызывающих их селективную активацию: 1) N-метил-D-аспартат (NMDA), 2) АМРА (α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионат), 3) каинат, 4) L-2-амино-4-фосфонобутират (L-AP4) и 5) АСРД (транс-L-аминоциклопентан-1,3-дикарбоксилат) (Monaghan D. T. et al., 1992). NMDA – рецепторы преимущественно концентрируются в гиппокампе, коре головного мозга, в стриатуме, амигдале. Высокая плотность АМРА и каинатных рецепторов выявлена в ростральных отделах мозга - гиппокампе и коре больших полушарий (Monaghan D. T. et al., 1992). NMDA, АМРА и каинатные рецепторы – ионотропные и связаны с Ca^{2+} -ионными каналами (Chatterjea D. et al., 2010). L-AP4 и АСРД –

метаботропные, сопряженные с G-белками. Различные глутаматные рецепторы вносят различный вклад в развитие нейротоксического повреждения нейронов. Очевидно, что главную роль в гибели нейронов играют NMDA рецепторы.

Вклад гиперактивации глутаматных рецепторов в нейродегенеративный процесс при гипогликемии подтверждается экспериментальными данными с применением антагонистов NMDA рецепторов (Hernández-Fonseca K. et al., 2008). При инсулиновой коме у животных фармакологическая блокада этих рецепторов значительно снижает повреждение нейронов (Wieloch T., 1982; 1985). Похожие данные были получены и на культуре нейронов головного мозга. Блокирование NMDA рецепторов предотвращало гибель нейронов, индуцированную снижением поступления глюкозы. (Tasker R.C. et al., 1992; Facci L. et al., 1990; Monyer H. et al., 1990; 2009).

Ингибирование же других подтипов глутаматных рецепторов в условиях гипогликемии не давало такого эффекта (Tasker R.C. et al., 1992; Facci L. et al., 1990; Monyer H. et al., 1989).

Прямым подтверждением эксайтоксической природы повреждения нейронов при гипогликемии явилась так же работа (Wieloch T. et al., 1985), в которой было продемонстрировано, что удаление, путем декорткации глутаматэргических кортикостриальных проекций, приводило к уменьшению количества некротически измененных нейронов в полосатом теле при гипогликемии. Подобным образом, устранение дофаминэргического входа в полосатое тело при разрушении черной субстанции 6-гидрокситриптамином, уменьшало избирательный нейрональный некроз в хвостатом ядре (Auer R. N., 1986), а разрушение норадреналинэргических проекций голубого пятна в передний мозг не увеличивало в последнем количество нейрональных некрозов при гипогликемии (Lindvall O. et al., 1988).

Данные о концентрации глутамата в головном мозге при гипогликемии весьма разрозненны. Накопление этого нейромедиатора в коре головного мозга при гипогликемической коме было выявлено у 1-2 - недельных поросят (Ichord R.N. et al., 2001), в спинно-мозговой жидкости новорожденных с гипогликемией (Aral Y.Z. et al., 1998), и в культуре клеток гиппокампа при йодоацетатингибированном метаболизме глюкозы (Hernández-Fonseca K. et al., 2005). В других работах было выявлено, напротив, снижение концентрации этого нейромедиатора или его предшественника - глутамина в различных структурах: культуре клеток лобной доли, сетчатке и полосатом теле (Honegger P. et al., 2002; Zeevalk G.D. et al., 2000; Madl J.E. et al., 1999; Gundersen V. et al., 2001). Авторы полагают, что такое снижение концентрации глутамата и глутамина при гипогликемии связано с тем, что дефицит глюкозы приводит к увеличению дезаминирования аминокислот с последующей их утилизацией в цикле трикарбоновых кислот. (Honegger P. et al., 2002; Sutherland G.R. et al., 2008; Zeevalk G.D. et al., 2000)

С другой стороны, использование клетками метаболического пула глутамата, в качестве энергетического субстрата при нейрогликопении, вызывает сдвиг равновесия аспартатаминотрансферазной реакции в сторону образования аспартата. Аспартат высвобождается в межклеточное пространство мозга и поступает в цереброспинальную жидкость. Подъем уровня аспартата в мозге при гипогликемии (Телушкин П.К. с соавт., 1995; Agadarh C.-D. et al., 1980; Sandberg M. et al., 1985), увеличение внеклеточной концентрации аспартата в состоянии иЭЭГ в 15 раз (Sandberg M. et al., 1986), а также местные нейрональные нарушения при инъекции аспартата в нервную ткань (Nadler J.V. et al., 1981), позволяют считать эндогенно продуцируемый аспартат другим наиболее вероятным эксайтотоксическим агентом, вызывающим нейрональный некроз при

гипогликемии. Последнее объясняет гибель нейронов областей мозга, контактирующих с цереброспинальной жидкостью.

Вместе с тем необходимо отметить, что наблюдаемые при гипогликемии нарушения в энергетическом метаболизме нейронов увеличивают их восприимчивость к эксайтотоксическому повреждению и повышают вероятность гибели клеток в ответ даже на нормальные концентрации возбуждающих аминокислот (Beal M.F., 1992). Так, например, на культуре нейронов было показано, что снижение концентрации глюкозы в инкубационной среде приводило к увеличению их чувствительности к токсическим эффектам глутамата (Stelmashook E.V. et al., 2010). Более того, увеличенная чувствительность сохранялась длительное время даже после восстановления нормальной концентрации глюкозы (Vergun O. et al., 2003).

Степень эксайтотоксического повреждения нейронов зависит от взаимодействия ингибиторных и возбуждающих входов (Beal M.F., 1992). Поэтому важно также и то, что избыточное выделение глутамата и накопление аспартата происходит на фоне уменьшения тормозного медиатора (ГАМК) в мозге (Agadarh C.-D. et al., 1978; Lewis L.D. et al., 1974; Roberts E. et al., 1972; Saad S.F., 1972).

Клеточные механизмы, ответственные за гибель нейронов при избыточной активации рецепторов аминокислот, в значительной мере обусловлены нарушением ионного баланса в цитоплазме нейронов и увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция (Болдырев А.А., 1995; Телушкин П.К. с соавт., 1997; Beal M.F., 1992; Cadet J.L. et al., 1992).

Увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} осуществляется путем открытия связанных с NMDA- и AMPA-рецепторами Ca^{2+} каналов. Деполяризация мембраны, обусловленная активацией ионотропных рецепторов, приводит к открытию потенциал зависимых Ca^{2+} каналов.

Активация метаболитных рецепторов, которые через G-белок активируют фосфолипазу C (КФ 3.1.1.4), сопровождается образованием инозитол-1,4,5-трифосфата, который освобождает Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В дополнение к этому, вход Ca^{2+} извне и освобождение Ca^{2+} в цитоплазму из пула, регулируемого фосфоинозитолами, еще больше стимулирует Ca^{2+} -индуцированное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасов (Alford S. et al., 1992).

Повышение концентрации ионов кальция в цитозоле нейронов при гипогликемии, потеря ими ионов калия приводят не только к деполяризации мембран нейронов, но и к активации свободно-радикальных окислительных процессов (СРО), следствием чего является развитие метаболического окислительного стресса. Показано, например, что митохондрии резко увеличивают продукцию свободных радикалов после помещения их в среду, содержащую 2,5 мкмоль ионов кальция. Такая концентрация этих катионов возникает в цитозоле нейронов после воздействия эксайтотоксинов (Dykens J.A., 1994). Как известно, под термином окислительный или оксидативный стресс, понимают существование тканевого дисбаланса между интенсивностью свободно-радикальных окислительных процессов, идущих с участием активных форм кислорода (АФК), и состоянием антиоксидантной системы защиты.

СРО непрерывно протекает в норме во всех тканях живых организмов и, при определенной интенсивности, является одним из типов нормальных метаболических процессов (Бурлакова Е.Б., 1998; Зенков Н.К. с соавт., 1993; Зинчук В.В. с соавт., 2001; Кожевников Ю.Н., 1985; Козлов Ю.П., 1973; Скулачев В.П., 1996; . Cabrera C. et al., 1995; Pamplona R. et al., 2011). Имеется вполне определенный стационарный физиологический уровень липопероксидации, причем для тканей с высокой скоростью метаболизма (мозг, печень, почки, сердце) характерна более высокая активность свободнорадикальных реакций (Barja G., 1993; Cristol J.P. et al.,

1998). Они являются жизненно важным звеном в регуляции проницаемости эндотелия (Redmond E.M. et al., 1998) и транспорта веществ через мембраны, участвуют в синтезе простагландинов и лейкотриенов, метаболизме катехоламинов и стероидных гормонов, в дифференцировке и делении клеток (Poli G. et al., 2004), транспорте электронов в цепи дыхательных ферментов (Dröge W., 2002). Низкий уровень пероксидов, свойственный нормальным тканям, объясняется сбалансированностью в организме процесса их образования и распада (Brunk U.T. et al., 1992; Bulger E.M. et al., 2001), т. е. равновесием оксидантных и антиоксидантных систем.

При патологических процессах баланс между ПОЛ и антиоксидантной системой нарушается и, при этом в первую очередь страдают липидные компоненты мембранных структур, что ведет к изменению их физических и биологических свойств – микровязкости, текучести, гидрофобности, степени олигомеризации мембранных белков и их взаимодействию с липидами (Владимиров Ю.А., 1989; 1992; 2000; Дементьева И.И. с соавт., 1993; Шерстнев М.П., 1990). При этом повышается ионная и молекулярная проницаемость мембран (Baker J.E. et al., 1988; Voes M. et al., 1989; Kehrer J.P., 1993), что обуславливает выход из лизосом и митохондрий ферментов и способствует накоплению в клетках ионов Na^+ и Ca^{2+} . В первую очередь повреждаются клетки, не способные к выполнению своих функций. Однако, при чрезмерном накоплении продуктов ПОЛ, их разрушающее действие может распространяться на здоровые ткани, что ведет к расширению зоны повреждения (Hall E.D. et al., 1993; Halliwell V. et al., 1990; 1994; Kehrer J.P., 1993). Следствием избыточного ПОЛ являются не только повреждение тканевых структур, но и торможение процесса регенерации (Бурлакова Е.Б., 1998; Журавлёв А.И., 1982; Подопригорова В.Г., 2004). Таким образом, свободно-радикальные процессы, играющие

исключительно важную роль в жизнедеятельности организма, становятся важным патогенетическим звеном в развитии многих патологических процессов. Не являются исключением и тяжелые гипогликемические состояния.

Как было показано выше, гипогликемия провоцирует развитие оксидативного стресса в нервной ткани (Patočková J. et al., 2003) и приводит к увеличению синтеза АФК в культурах нейронов и клетках нейронального происхождения (Hino K. et al., 2005; Liu Y. et al., 2003; Isaev N. K. et al., 2005). В клетках синтез АФК осуществляется в основном митохондриальными электронтранспортными цепями, причем этот процесс имеет место и в условиях нормального метаболизма (Lesnefsky E.J. et al., 2001; Wallace D.C., 2000; Niizuma K. et al., 2009). Таким образом, митохондрии занимают центральное место в исследованиях механизма продукции АФК при гипогликемии. После двух часовой инсулин-индуцированной гипогликемии, продукция супероксид анион радикала и пероксида водорода в митохондриях, выделенных из коры головного мозга новорожденных свиней, увеличивается с 60% до 100% по сравнению с контролем (McGowan J.E. et al., 2006).

Однако, митохондрии являются не только главным инициатором оксидативного стресса, но и мишенью этого патологического процесса. Ballesteros J.R. et al. (2003) отмечают интенсификацию ПОЛ в мембранах митохондрий после гипогликемии и отсутствие данного явления в синаптосомах и ядерных мембранах. Гипогликемия, по данным этого исследования, приводила так же к фрагментации митохондриальной ДНК. Авторы делают вывод, что повреждение митохондрий при увеличении продукции АФК является начальным этапом развития повреждения мозга при гипогликемии (Ballesteros J.R. et al., 2003)

Сам механизм увеличения продукции АФК митохондриями нейронов в условиях гипогликемии, по-видимому, является многофакторным.

Белок GRP75 (75 кДа, глюкозорегулирующий белок, принадлежащий к семейству белков теплового шока 70), расположенный в основном в митохондриях, участвует в регуляции образования АФК при гипогликемии. Повышенная экспрессия этого белка увеличивает выживаемость РС12 (феохромоцитомных) клеток в условиях гипогликемии, но не влияет при этом на снижение в них концентрации АТФ и митохондриальный мембранный потенциал. (Liu Y. et al., 2005). Образование АФК в нейронах при гипогликемии также, возможно, связано с повышением неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны. Индукция митохондриальной неспецифической проницаемости всегда сопровождается увеличением образования АФК, но сущность этого явления до сих пор не выяснена (Brady N.R. et al., 2006; Zorov D.V. et al., 2000; 2006).

Механизм увеличения продукции АФК митохондриями нейронов, как предполагают, может быть подобен механизму образования АФК нейронами в условиях глутаматной токсичности, где ключевым звеном является поступление ионов кальция в клетку (Chinopoulos C. et al., 2006). Эта гипотеза косвенно подтверждается сходством проявлений внутриклеточного патофизиологического процесса в нейронах, как в условиях гипогликемии, так и глутаматной эксайтотоксичности: в обоих случаях усиливается приток кальция в клетку, активируется PARP-1 (поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1) (КФ 2.4.2.30) - фермент участвующий в репарации ДНК, снижается митохондриальный мембранный потенциал, падает концентрация АТФ. Все это и позволяет говорить о том, что токсичность возбуждающих аминокислот, возможно, является одной из причин повреждения нервной ткани при гипогликемии. Авторами (Sensi

S.L. et al., 1999; 2003; Isaev N.K. et al., 2012) было установлено, что в условиях гипогликемии нейроны некоторых отделов мозга, в частности гиппокампа, могут аккумулировать ионы цинка, что также может провоцировать, по мнению авторов, образование АФК.

Особую роль в развитии оксидативного стресса при гипогликемии может играть Ca^{2+} -зависимое увеличение продукции оксида азота II (нитрооксид, NO) из аргинина (Schulz J.B. et al., 1995). Образование NO происходит с участием молекулярного кислорода и НАДФН₂. Реакцию катализирует фермент нитроксидсинтаза (КФ 1.1.2.23).

Оксид азота в норме является антиоксидантом, но при нарушении баланса между образованием NO и продукцией супероксидрадикала ($\cdot\text{O}_2^-$) с их участием образуется крайне токсичный агент пероксинитриланион ($\cdot\text{ONOO}^-$). Пероксинитриланион разрушается до гидроксильного свободного радикала и нитрогеноксида, которые могут быть мощными потенциальными активаторами пероксидации липидов (Болдырев А.А., 1995; Телушкин П.К. с соавт., 1997; Darley-Usmar V. et al., 1995).

Известно, что сам NO ингибирует некоторые ферменты, включая НАДН-убихиноноксидоредуктазу (КФ 1.6.5.3) и сукцинат-убихиноноксидоредуктазу (КФ 1.3.5.1) митохондриальной дыхательной цепи, фермент цикла Кребса аконитазу (КФ 4.2.1.3) (Drapier J. C. et al., 1988), а также и скорость-лимитирующий фермент репликации - ДНК-рибонуклеотидредуктазу (КФ 1.17.4.1) (Nakaki T. et al., 1990). Эти ферменты имеют в составе активного центра железо-серные комплексы. Кроме того NO, также как и супероксидрадикал, способен мобилизовать железо из ферритина, потенцируя, тем самым дальнейшую пероксидацию липидов (Schulz J.B. et al., 1995; Youdi M.B.H. et al., 1993; Hill B.G. et al., 2010).

Другим процессом, который приводит к накоплению свободных радикалов, является активация фосфолипазы А₂ (КФ 3.1.1.4),

обеспечивающая высвобождение арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов, что способствует ее вовлечению в каскад дальнейших превращений (Páramo B. et al., 2010). Ингибиторы фосфолипазы A_2 оказывают частично защитное действие против токсичности глутамата *in vitro* (Lafon-Cazal M. et al., 1993).

Активные формы кислорода и азота реагируют с большой скоростью и высоким сродством почти со всеми молекулами клетки, вызывая, в частности, химическое повреждение дезоксирибозы, пуриновых и пиримидиновых оснований, мембранных липидов, белков и углеводов (Halliwell B., 1992; Bargnoux A.S. et al., 2009). Это инициирует повреждение электронтранспортных систем, дальнейшее нарушение гомеостаза Ca^{2+} (Adam-Vizi V. et al., 2010), активацию протеаз и фосфолипаз и прогрессирующее увеличение пероксидации липидов мембран, приводя в финале к гибели клетки (Halliwell B., 1992; Youdium M.B.H. et al., 1993).

Продолжительная продукция АФК митохондриями, особенно в сочетании с увеличенной концентрацией внутримитохондриального Ca^{2+} , сама по себе может вызывать неспецифическую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны, приводя тем самым к ее полной деэнергизации (Isaev N.K. et al., 2008). Более того, АФК также могут воздействовать на ядерную ДНК, приводя тем самым к немедленной активации PARP-1, участвующего в репарации ДНК. Однако, повышенная активность PARP-1 приводит к быстрому истощению запасов пуриновых нуклеотидов, необходимых для различных процессов, в том числе для синтеза коферментов. Поэтому даже при нормализации поступления глюкозы в нейроны после гипогликемии, гликолитический цикл не способен быстро восстановить свою активность из-за дефицита НАД.

Повышение концентрации АФК в клетках может происходить, как уже отмечалось, не только из-за увеличения их образования в электрон-транспортной цепи, но и из-за снижения активности антиоксидантной

системы. Однако в этом плане в литературе имеется мало экспериментальных данных и, к тому же, довольно противоречивых. Так, Телушкиным П.К. (1998) было показано, что в состоянии гипогликемической комы (концентрация глюкозы в крови около 1 ммоль/л) в стволовой части мозга крыс снижена активность супероксиддисмутазы. При этом не было выявлено изменений в активности глутатионредуктазы, в содержании диеновых конъюгатов и в уровне малонового диальдегида. Иные данные были получены исследователями Patocova et al. (2003). В опытах на мышах с такой же степенью гипогликемии авторами было выявлено повышение в ткани мозга уровня малонового диальдегида при статистически неизменной активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. В работе же Puneet S. et al. (2004) приводятся данные, свидетельствующие об усилении липидной пероксидации в ткани мозга в условиях гипогликемической комы, что сочеталось со значительным снижением активности митохондриальной каталазы, супероксиддисмутазы, снижением уровня восстановленного глутатиона и подъемом активности глутатионпероксидазы.

Таким образом, представленные данные, определенная разнородность которых, по-видимому, обусловлена в первую очередь длительностью коматозного состояния, а возможно и иными факторами, не позволяют сделать однозначного вывода о состоянии ферментативного компонента антиоксидантной системы мозга в условиях гипогликемии. Вполне вероятно, что изменения в активности защитных ферментов в процессе развития данного метаболического стресса носят фазовый характер и на определенном этапе интенсификации свободно-радикальных процессов они сами повреждаются активными формами кислорода, либо конечными продуктами липопероксидации.

1.5. Купирование гипогликемических состояний.

Метаболические изменения, сопровождающие умеренную гипогликемию (пре-иЭЭГ), полностью и сравнительно быстро купируются классическим способом - введением глюкозы (Телушкин П.К. с соавт., 1988;1995; Gorell J.M. et al., 1976; 1977; Tews J.K. et al., 1965).

При купировании комы продолжительностью до 30 мин и ЭЭГ наблюдается быстрое восстановление ЭЭГ и сенсорных вызванных потенциалов (Agadarh C.-D. et al., 1979). В соответствии с купированием функциональных расстройств в мозге нормализуются относительные концентрации фосфокреатина, АТФ, АДФ, АМФ, а также интермедиатов цикла Кребса. Достаточно быстро восстанавливается соотношение между глутаматом и аспаратом (Телушкин П.К. с соавт.,1988; 1995). Восстановление же общего пула адениловых нуклеотидов, аминокислот и количества гликогена осуществляется медленнее. Скорость нормализации этих показателей может отражать максимальную способность ферментов, которые лимитируют синтеза этих веществ. Считают, что нормализация общего содержания адениловых нуклеотидов ограничена скоростью синтеза пуриновых оснований и нуклеозидов (Charman A.G. et al., 1981).

После длительной гипогликемии (60 мин иЭЭГ) электрическая активность мозга восстанавливается медленно или вовсе не восстанавливается: трудный выход из гипогликемического состояния отражается в позднем, вторичном увеличении уровня внеклеточного калия (Agadarh C.-D. et al., 1982). При этом, неожиданно быстрым, является восстановление энергетического заряда, который практически нормализуется через 90 мин после купирования (Agadarh C.-D. et al., 1978). Это, по мнению авторов, является результатом относительной резистентности митохондрий мозга к гипогликемическому повреждению. Вполне вероятно, что изменения энергетического заряда нервной ткани

сами по себе не являются единственным показателем нарушения функциональных способностей мозга.

Необходимо отметить, что период более поздней реституции (часы, сутки) после инсулиновой гипогликемии практически не исследован. Хорошо известно, что в клинической практике эпизоды гипогликемии у одного и того же пациента могут наблюдаться неоднократно (Балаболкин М.И., 1994; Генес С.Н., 1970; Касаткина Э.П., 1996; Прихожан В.М., 1981; Amiel S.A. et al., 1993). Это может приводить к суммации неблагоприятных изменений, поскольку последующие эпизоды гипогликемии могут возникать на ином метаболическом фоне. Эксперименты на крысах, перенесших серию гипогликемических ком, выявили нарушения энергетического метаболизма, обмена медиаторных аминокислот и инициацию перекисного окисления липидов в мозге уже на вторые сутки восстановительного периода после инсулиновой гипогликемии (Телушкин П.К. с соавт., 1994; 1995; 1998; Telushkin P.K. et al., 1998).

Весьма примечательно то, что гибель нейронов, по мнению некоторых исследователей, происходит в основном уже после купирования гипогликемического шока глюкозой. Так, например, у крыс с инсулиновой гипогликемией образование нитрозина выявлялось сразу же после введения глюкозы, а не во время гипогликемии (Телушкин П.К. с соавт., 1997). Так же было отмечено, что активация поли(АДФ-рибоза)полимеразы-1, фермента приводящего к повреждению ДНК, происходит именно после введения глюкозы (Телушкин П.К. с соавт., 1997). Таким образом, состояние гипогликемия/реперфузия глюкозы имеет ряд сходств с состоянием ишемия/реперфузия, при котором оксидативный стресс связан с повторным введением кислорода в поврежденную ткань (Chan P.H., 2001). Однако фундаментальное отличие состоит в том, что содержание кислорода в мозге особенно не изменяется ни при гипогликемии, ни при реперфузии глюкозы, и таким образом, повторное

поступление глюкозы в мозг, а не кислорода, приводит к развитию оксидативного стресса в данных условиях.

Это подтверждается исследованием Suh S. W. et al. (2007), которые показали, что первичной причиной нейронального оксидативного стресса является активация нейрональной НАДФ-оксидазы (КФ 1.6.3.1), и, что скорость образования супероксида зависит от концентрации глюкозы в крови в первые сроки постгипогликемического периода. Причем, в состоянии гипогликемии наблюдается лишь незначительное увеличение образования АФК, а при введении глюкозы эта продукция значительно усиливается, как в случае клеточной культуры, так и в опытах *in vivo*.

Первичным источником супероксида при введении глюкозы, скорее всего, является именно НАДФН-оксидаза, а не митохондрии (Suh S. W. et al., 2007). Косвенным свидетельством того, что НАДФН-оксидаза является первичным источником супероксида, можно считать тот факт, что для поддержания активности этого фермента в не нейрональных клетках требуется постоянный, непрерывный синтез НАДФН (Brennan A.M. et al., 2009). Регенерация НАДФН происходит через гексозомонофосфатный шунт, где в качестве субстрата используется глюкоза. В данном исследовании ингибирование гексозомонофосфатного шунта 6-аминоникотинамидом приводило к блокированию, как продукции нейронального супероксида, так и последующей гибели нейронов. Этот результат трудно объяснить чем-либо, кроме, как подавлением активности НАДФН-оксидазы (Won S.J. et al., 2012).

Данное исследование указывает на то, что гибель нейронов при гипогликемии запускается реперфузией глюкозы, однако, лечение гипогликемии в клинике требует коррекции уровня глюкозы в крови. Таким образом, данные о том, что образование супероксида и выживаемость нейронов зависят от увеличения уровня глюкозы в крови после гипогликемии, должны учитываться при выведении из

гипогликемической комы. Восстановление концентрации глюкозы до 1-2 мМ в первый час после гипогликемии приводит к меньшей продукции супероксида и меньшей гибели нейронов, чем восстановление ее концентрации до 5мМ. Все это свидетельствует о том, что постепенная коррекция концентрации глюкозы у пациентов с гипогликемической комой предпочтительнее, чем более быстрое повышение ее концентрации и гипергликемия. Естественно, что результаты этого исследования, полученные на моделях грызунов, не могут напрямую применяться при лечении человека и быть применительными к гипогликемии с меньшей степенью тяжести.

В цитируемой работе (Suh S. W. et al., 2007) не обосновываются биохимические механизмы этого эффекта, кроме как возможности усиления транспорта глюкозы через гематоэнцефалический барьер при росте ее концентрации (Choi I.Y. et al., 2001), с последующим увеличением поступления ее в гексоэмофосфатный шунт. Это может облегчать регенерацию НАДФН и способствовать активации НАДФН-оксидазы (Gupte S.A. et al., 2005; Kohler E. et al., 1970). Влияние гематоэнцефалического барьера на активность НАДФН-оксидазы подтверждается тем, что в случае клеточной культуры высокие концентрации глюкозы оказывали гораздо меньший повреждающий эффект.

При решении проблемы аммиачной интоксикации, развивающейся при гипогликемическом шоке, еще в 1960 г. Н. Б. Козловым был предложен способ его купирования не глюкозой, а введением глютамата натрия в сочетании с последующим вдыханием воздуха с добавлением к нему 7 – 8 % углекислого газа, что позволяло быстро купировать судорожное состояние и вывести животное из состояния шока без подъема уровня глюкозы в крови (Вангейм К. А. с соавт., 1962). Автор, изучая в эксперименте на животных механизмы инсулинового шока, показал, что во

время второй стадии инсулиновой гипогликемии, характеризующейся двигательным возбуждением и появлением судорог, в крови повышается концентрация аммиака. Еще более отчетливым было повышение концентрации аммиака в мозговой ткани. Введение глутаминовой кислоты приводило к снижению концентрации аммиака, повышению содержания глутамина и к усилению выделения мочевины. При этом судороги у животных прекращались или совсем не наступали, тогда как уровень глюкозы в крови так и оставался неизменно низким. Благоприятное действие глутаминовой кислоты при судорожном состоянии автор объяснял обезвреживанием аммиака за счет ферментативного амидирования этой дикарбоновой аминокислоты. Н. Б. Козловым было также показано, что глутаминовая кислота, участвуя в синтезе глутамина и приводя к снижению в ткани мозга концентрации аммиака, оказывала лечебный эффект при аммиачном отравлении, вызванном введением хлористого аммония, а также при некоторых других судорожных состояниях.

Несомненно, что нейтрализация аммиака, путем ферментативного синтеза глутамина, не является единственным механизмом воздействия глутаминовой кислоты на судороги при инсулиновой гипогликемии. Дело в том, что в условиях дефицита глюкозы особенно значимым для поддержания энергетического статуса мозга является вовлечение в катаболизм глутамина и глутаминовой кислоты (Stelmashook E.V. et al., 2011), на долю которых в нервной ткани, в частности, мозга крыс, приходится более 40% от общего содержания свободных аминокислот (Knauff H. G. et al., 1962). Эти аминокислоты, ферментативно теряя аммиак, либо вступая в реакцию переаминирования с оксалоацетатом, трансформируются в α -кетоглутарат, который затем включается в цикл Кребса. Это позволяет нейронам достаточно длительно обеспечивать дыхательные цепи митохондрий восстановленными эквивалентами, вплоть

до полного или почти полного истощения общего клеточного пула глутаминовой кислоты и ее амида.

Предложенный Н.Б.Козловым способ купирования инсулинового шока вскоре был успешно апробирован в клинической практике (Вангейм К. А. с соавт., 1962), однако, в дальнейшем этот метод не привлек к себе должного внимания исследователей.

К настоящему времени установлен ряд новых научных фактов, которые делают актуальным углубленное изучение механизма купирующего гипогликемический шок эффекта CO_2 при его совместном применении с глутаминовой кислотой. Так, в частности, было показано, что гиперкапническое состояние, вызванное вдыханием газовой смеси с 7 – 8 % CO_2 способствуют в значительной мере поддержанию энергетического статуса мозга животных, находящихся в гипогликемической коме (Pellegrino D. et al., 1981). Исследованиями А. Х. Когана и соавторов убедительно проиллюстрировано, что углекислый газ обладает мощным ингибирующим влиянием на генерацию активных форм кислорода, как при прямом воздействии на клетки различных органов и систем, так и при воздействии на целостный организм. Предварительное вдыхание животными газовой смеси с 7 – 8 % CO_2 в течение 50 минут, в частности, подавляло способность выделенных из мозга митохондрий к генерации супероксидного анион-радикала почти в 2 раза. Такие митохондрии обладали более высокой фосфорилирующей способностью, что проявлялось не только в возрастании скорости фосфорилирования добавки АДФ, но и в увеличении степени сопряжения окисления и фосфорилирования.

Считается, что митохондрии мозга относительно резистентны к гипогликемии (Телушкин П. К. с соавт., 1999). Однако, ухудшение энергетического статуса мозга при сохранении достаточно высокого уровня потребления кислорода позволяет говорить о возможных

нарушениях в механизме окислительного фосфорилирования. Тем более, что имеются данные об интенсификации свободно-радикальных процессов в условиях гипогликемии (Patočkove J. et al., 2003).

В связи с вышеизложенным, целью исследования было изучение дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий ткани мозга при гипогликемическом судорожном состоянии, а также в различные сроки восстановительного периода после его купирования, как введением глюкозы, так и глутаматом натрия с последующим вдыханием воздуха в смеси с углекислым газом.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ, УСЛОВИЯ ОПЫТОВ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 . Экспериментальные животные и условия опытов

Экспериментальные исследования были проведены на 200 белых крысах обоего пола с массой тела 150 – 200 г. Подопытные животные содержались в условиях вивария и находились на обычной лабораторной диете. Перед проведением каждого эксперимента животные не получали пищу в течении 14 часов, но при этом имели свободный доступ к воде.

Забой животных осуществлялся путем моментальной декапитации с параллельным определением уровня глюкозы в крови с помощью портативного глюкометра (One Touch Horizon, LifeScan, Johnson & Johnson).

Все экспериментальные животные были разбиты на шесть групп.

Первая группа – контрольная. Это интактные животные, которые подвергались декапитации, как и животные других серий экспериментов, после 14-часового голодания. Концентрация глюкозы в крови этой группы интактных животных находилась в пределах 3,3 – 5,6 ммоль/л.

Вторая группа – животные с выраженным судорожным состоянием, вызванным подкожным введением инсулина в дозе 40 ед/кг массы тела (продажный препарат Актрапид НМ, Ново Нордиск А/С, Дания).

Применение инсулина в указанном выше количестве объясняется повышенной резистентностью крыс к данному гормону. Подобные же дозы инсулина при постановке эксперимента на крысах применялись и другими исследователями (Мартинсон Э.Э. и Тяхепыльд Л.Я., 1966, Agardh C.D. et al., 1981, McGowan J. et al., 2005).

Клиника развивающегося инсулинового шока ничем не отличалась от типичной картины, описываемой другими исследователями (Чергейшвили Ю.П., 1963; Вангейм К.А. и др. 1962).

Развивающаяся гипогликемия проявлялась в первые 1 – 1,5 часа адинамией, сонливостью. Крысы реагировали только на сильные раздражители; зрачковый и роговичный рефлекс были сохранены.

Спустя еще 30 – 60 минут начинался период, своего рода, двигательного возбуждения, при котором у животных периодически наблюдались произвольные подергивания мышц конечностей. На этом фоне через 3 – 4 часа после введения инсулина у животных внезапно развивалось судорожное состояние. В одних случаях возникали тонические судороги, которые переходили во вращательные движения туловища вокруг продольной оси, напоминающие торзионный спазм. У других животных на этой стадии гипогликемии возникали судороги, напоминающие эпилептический припадок. Они возникали внезапно, путем распространения миоклоний мышц лапок, с их последующей генерализацией в общие клонические судороги.

Такая клиническая картина развития гипогликемического шока наблюдалась в большинстве случаев, а различия в поведении отдельных животных заключались лишь в длительности описанных выше периодов. Забой животных данной серии производился на высоте судорожного состояния. Концентрация глюкозы в крови этих животных не превышала 1 ммоль/л.

К третьей группе были отнесены животные, которые подвергались декапитации спустя 1 час после купирования судорожного состояния подкожным введением изотонического раствора глюкозы из расчета 2 г на 1 кг массы тела. После введения глюкозы у всех животных в течение нескольких последующих минут прекращались судороги, они постепенно приходили в себя, а еще спустя 15 – 20 минут наблюдалось почти полное исчезновение симптомов гипогликемии: животные становились активными, подвижными, начинали проявлять интерес к пище. Уровень

глюкозы в крови при забое этих животных практически не отличался от нормы.

У животных четвертой группы исследования купирование судорожного состояния достигалось подкожным введением раствора глутамата натрия (0,5 г на 1 кг массы тела) и последующим их помещением в проточную газовую камеру объемом 5,5 литра, куда подавалась гиперкапническая газовая смесь (воздух + 7% CO₂).

Для приготовления газовой смеси заданного состава использовалась баллонная углекислота и обычный воздух, нагнетаемый в ресивер мембранным компрессором. Исходные газы через редукторы подавались к дозирующему блоку и, пройдя через ротаметрические трубки, попадали сначала в смесительную камеру, где тщательно перемешивались электровентилятором, и затем уже поступали через мелкие эжектирующие отверстия в затравочную камеру с помещенным туда животным. Скорость подачи газовой смеси заданного состава составляла 5 литров в минуту, что исключало возможность изменения ее параметров за счет внешнего дыхания животных. Уровень углекислоты на выходе из камеры контролировался газоанализатором двуокиси углерода непрерывного действия типа ОА – 2209. Как показывали контрольные измерения, концентрация газовых компонентов, близкая к заданной, устанавливалась уже через 5 мин от начала подачи газовой смеси.

Спустя уже несколько минут после помещения в газовую камеру экспериментальных животных этой серии, у них прекращались судороги, животные начинали приходить в себя, но в отличие купирования глюкозой, еще довольно длительное время оставались вялыми, заторможенными. Спустя 1 час осуществлялся забой этих животных. Концентрация глюкозы в крови при этом так и оставалась ниже 1 ммоль/л.

К 5 и 6 серии экспериментов были отнесены животные, которые после купирования судорожного гипогликемического состояния (глюкозой

– серия 5, либо глутаматом в сочетании с CO_2 – серия 6) помещались в условия вивария и при этом они имели свободный доступ к пище и воде. Забой этих животных для исследования осуществлялся спустя сутки после купирования шокового состояния

2.2 Выделение митохондрий из ткани головного мозга и определение параметров их дыхания и фосфорилирования.

Методика выделения митохондрий из ткани головного мозга сводилась к следующему. После декапитации животных быстро вскрывалась черепная коробка, из которой извлекался мозг. Его помещали в предварительно охлажденную фарфоровую ступку и промывали ледяной средой выделения следующего состава: 0,25 М сахара (хч), 0,1 мМ ЭДТА, 0,01 М трис-НСl, рН = 7,2. После чего из мозга удалялся мозжечок. Большие полушария и стволочную часть мозга подвергали гомогенизации в среде выделения в стеклянных гомогенизаторных пробирках, помещенных в смесь воды и льда. Тефлоновый пестик гомогенизатора, имевший клиренс, исключавший разрушение митохондрий, приводился в движение электромотором. Полученный гомогенат мозга подвергали предварительному центрифугированию в рефрижераторной центрифуге ЦЛР – 1 при 1000 g (температурный интервал от -3 до 0°C, 10 мин). Супернатант сливали в пробирку и подвергали центрифугированию в течении 20 мин при 12000g. Осажденные митохондрии промывали холодной (+5 С) средой выделения и, после повторного их осаждения в таких же условиях центрифугированием, ресуспендировали в среде выделения и переливали в пробирки, помещенные в воду со льдом.

Определение параметров дыхания и фосфорилирующей способности митохондрий проводилось по поглощению ими кислорода, напряжение которого в среде инкубации регистрировалось полярографическим методом с применением закрытого электрода типа

Кларка, изготовленного в лаборатории им. Белозерского при МГУ (Трушанов А.А, 1973).

Установка для проведения измерений состояла из полярографической приставки с регулируемым источником напряжения, самописца КСП-4 и электрода типа Кларка. Ячейка этого электрода в процессе анализа помещалась в термостатирующую камеру, изготовленную из теплоемкого материала и устанавливаемую на магнитную мешалку. Поддержание стабильной температуры (+ 27°C) в этой камере, а следовательно, и в ячейке электрода, достигалось с помощью ультратермостата типа УТ – 15.

Среда инкубации содержала 5 мМ K_2HPO_4 , 10 мМ трис- HCl , 20 мМ KCl , 0,4 мМ ЭДТА, тоничность до уровня 220 мМ доводилась сахарозой, рН среды – 7,4. В качестве субстратов дыхания митохондрий применяли как глутамат, так и сукцинат калия, которые вносили микродозаторами в ячейку электрода со средой инкубации до конечной концентрации 3 мМ. Анализ начинался с регистрации на ленте самописца нулевой линии и последующего вычерчивания на ней шкалы содержания кислорода в среде ячейки путем размыкания электрической цепи. Пробег самописца по всей длине шкалы при температуре среды 27°C, объеме 1 мл и обычном барометрическом давлении соответствовал 280 нмоль O_2 . После добавления к среде инкубации микродозаторами суспензии митохондрий (0,12 мл при изучении глутаматзависимого дыхания и 0,06 мл - сукцинатзависимого дыхания) регистрировали исходную скорость дыхания митохондрий V_2 . Затем последовательно регистрировали скорость дыхания в разных метаболических состояниях: V_3 – после добавления в ячейку аденозиндифосфата (до конечной концентрации 174 мкМ); V_4 – после окончания фосфорилирования добавки АДФ; $V_{\text{днф}}$ – после введения в ячейку разобщителя 2,4 – динитрофенола (до конечной концентрации 3 мкМ). Скорость дыхания митохондрий в различных

метаболических состояниях выражали в нанограмматах кислорода, потребленного за 1 минуту 1 мг белка митохондрий.

На рисунке 1 представлен типичный вид полярограммы, вычерчиваемой самописцем на диаграммной ленте и отражающей процесс потребления кислорода митохондриями в различных метаболических состояниях.

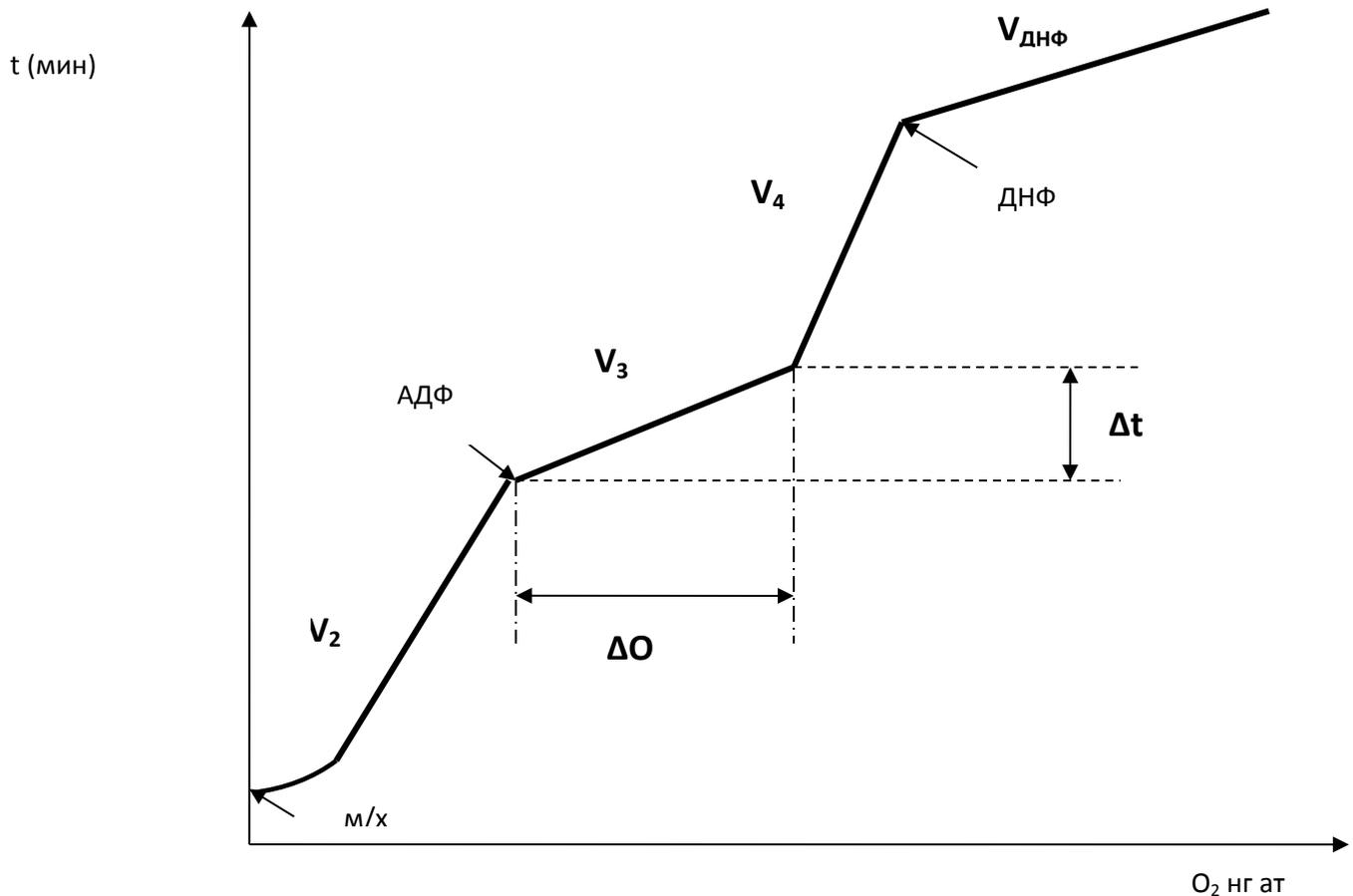


Рис. 1 Полярограмма дыхания митохондрий.

На основании каждой полярограммы рассчитывались общепринятые параметры (Ивков И.Н., Панченко Л.Ф., 1971): V_2 - скорость потребления кислорода митохондриями в исходном состоянии, т.е. в состоянии 2 по Чансу, которое характеризуется доступностью кислорода, субстратов окисления и отсутствием АДФ; V_3 - скорость потребления кислорода после добавки АДФ, т.е. скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием;

V_4 - скорость потребления кислорода митохондриями после расходования добавки АДФ; $V_{\text{днф}}$ - после добавки разобщителя протонофора 2,4 – динитрофенола, т.е. скорость дыхания митохондрий в состоянии разобщения.

Как производные этих величин находили:

- 1) $P/O = \text{количество АДФ(нмоль)}/\Delta O$ (потребленному за время фосфорилирования кислорода). Этот показатель, как известно, характеризует энергоэффективность окисления субстратов митохондриями.
- 2) Значение дыхательного контроля по Ларди (Lardy H.A., Wilman H., 1952) выражали через отношение $DK_{\text{Ларди}} = V_3/V_2$. Данный параметр часто называют коэффициентом усиления, поскольку он характеризует способность митохондрий отвечать на добавку АДФ ускорением своего дыхания, и, следовательно, является как бы мерой сродства дыхательной цепи к этому нуклеотиду.
- 3) Значение дыхательного (акцепторного) контроля по Чансу – Уильямсу (Chance B.S., Williams G.R., 1956) выражали через отношение $DK_{\text{Чанс}} = V_3 / V_4$. Эта величина является показателем интактности структур митохондрий и характеризует ингибирующий эффект наработанного АТФ на перенос электронов по дыхательной цепи.
- 4) Отношение $V_{\text{днф}}/V_4$, параметр, который часто рассматривается как показатель чувствительности митохондрий к разобщающему действию протонофора динитрофенола.
- 5) Скорость фосфорилирования добавки АДФ митохондриями ($\text{АДФ}/\Delta t$) рассчитывали в нмоль АДФ, фосфорилированного за 1 мин 1 мг белка суспензии митохондрий. Данный параметр характеризует интенсивность использования митохондриями освобождающейся в дыхательной цепи энергии.

б) Отношение V_2/V_4 , характеризующее способность мембран митохондрий сохранять собственный энергетический потенциал

2.3. Определение содержания белка.

Содержание белка в суспензии митохондрий определяли по методу Lowry O.H. et al. (1951). При этом использовали следующие реактивы:

А – 2% раствор Na_2CO_3 в 0,1 N растворе NaOH;

В – 0,5% раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% растворе цитрата Na 3-замещенного;

С – 1 часть раствора В смешивается с 49 частями реактива А (ex tempore);

Е – реактив Фолина – Чокальтеу, разбавленный дистиллированной водой до 1 н конечной концентрации кислоты

Ход определения сводился к следующему: к 2 мл реактива С добавлялось 0,4 мл суспензии митохондрий, предварительно разбавленной в 100 раз 0,9% раствором NaCl, содержащим детергент – дезоксихолат Na (100 мг на 100 мл). После взбалтывания смесь выдерживалась 10 мин при комнатной температуре. К ней добавляли 0,2 мл реактива Е, вновь взбалтывали и инкубировали при температуре 37 С в течение 30 мин. Оптическую плотность раствора измеряли против воды на фотоэлектроколориметре ФЭК – 2 М при 670 нм в кювете с толщиной оптического слоя жидкости 5 мм. Количество белка в суспензии митохондрий рассчитывали с учетом разбавления на основании калибровочного графика, построенного с использованием кристаллического бычьего сывороточного альбумина с содержанием основного вещества 99% (фирма Koch – Laboratories, LTD, Англия).

2.4 Определение содержания гидроперекисей липидов и общей антиоксидантной активности сыворотки крови и митохондриальной фракции головного мозга.

Измерение концентрации гидроперекисей липидов (ГПЛ) и общей антиоксидантной емкости (АОЕ) сыворотки крови и суспензии митохондрий было выполнено на хемилюминометре ИРА-03 с использованием ФЭУ – 127 (Шерстнев М.П., 1990). Измерение проводилось при 37°C, при постоянном перемешивании механической мешалкой.

Хемилюминисцентное исследование суспензии митохондриальных мембран проводили на основе методики, предложенной Владимировым Ю.А. (1992): в кювету помещали 0,1 мл суспензии митохондриальных мембран, стандартизированной по белку, 0,1 мл родамина Ж и довели объем до 5,7 мл фосфатным буфером, рН 7,7. Для инициации хемилюминисценции вводили 0,5 мл 25 мМ раствора FeSO₄. Наблюдалась вспышка ХЛ, в которой выделяли следующие основные параметры: h – высота быстрой вспышки, которая зависит от содержания в изучаемой системе гидроперекисей липидов; H – высота медленной вспышки, которая отражает способность липидов к перекисному окислению, т.е. максимально возможную интенсивность ПОЛ после введения Fe²⁺; τ – латентный период с момента введения Fe²⁺ до начала развития медленной вспышки, показывает скорость окисления Fe²⁺ до достижения концентрации Fe²⁺ критической величины, латентный период зависит от соотношения в системе про- и антиоксидантов; tg угла наклона медленной вспышки; светосумму медленной вспышки.

Для изучения динамики ПОЛ, в качестве контроля, использовали суспензию желточных липопротеидов (ЖЛП), которую получали путем десятикратного разведения желтка куриного яйца дистиллированной водой.

Для оценки содержания ГПЛ сыворотки крови и АОЕ как сыворотки крови, так и суспензии митохондриальных мембран использовалась методика предложенная Шерстневым М.П. (1990): в кювету помещали

суспензию ЖЛП в объеме 0,5 мл, содержащую около 5 мг фосфолипидов, 0,1 мл родамина Ж и доводили объем до 5,7 мл фосфатным буфером, pH 7,7. Для инициации хемилюминисценции (ХЛ) вводили 0,5 мл 25 мМ раствора FeSO_4 и 0,1 мл дистиллированной воды. На диаграммной ленте самописца отмечали стандартный сигнал быстрой (Бст) и медленной (Мст) вспышек (рис. 2).

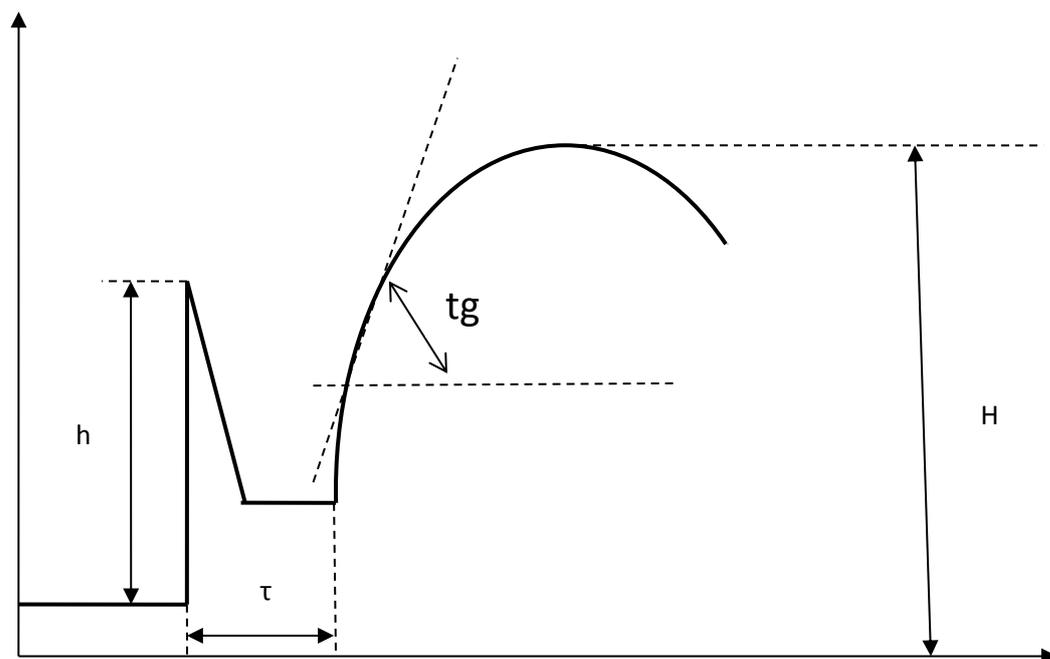


Рис. 2. Кинетика вспышки ХЛ сыворотки крови, либо суспензии митохондриальных мембран после введения Fe^{2+} .

Аналогично поступали и с опытной пробой, предварительно внося в кювету все те же компоненты, за исключением дистиллированной воды, вместо которой добавляли 0,1 мл сыворотки крови или 0,1 мл стандартизированной по содержанию белка взвеси митохондрий, которые выделяли из мозга животных ранее описанным методом, но в среде без добавления ЭДТА. На ленте самописца также регистрировали максимальную величину быстрой (Боп) и медленной (Моп) вспышек.

Содержание гидроперекисей липидов сыворотки крови и суммарную антиоксидантную емкость рассчитывали по формулам:

$$\text{ГПЛ} = \frac{\text{Боп}}{\text{Бст}} * 100\%$$

Бст – высота быстрой вспышки стандартной системы;

Боп - высота быстрой вспышки опытного раствора;

$$\text{АОЕ} = \frac{(\text{Мст} - \text{Моп})}{\text{Мст}} * 100\%$$

Мст – высота медленной вспышки стандартной системы;

Моп - высота медленной вспышки опытного раствора;

Содержание ГПЛ и АОЕ выражали в относительных единицах.

2.5. Определение содержания малонового диальдегида (ТБК – активных продуктов) в митохондриальной фракции головного мозга.

Принцип метода: тиобарбитуровая кислота (ТБК) в кислой среде взаимодействует с низкомолекулярными диальдегидами (главным образом, малоновым) с образованием окрашенного комплекса, имеющего максимум светопоглощения при длине волны 535 нм.

Реактивы: 2% раствор ортофосфорной кислоты (H_3PO_4), 0,6 % раствор тиобарбитуровой кислоты (ТБК), готовят ex tempore, н-бутиловый спирт

Ход определения: содержание МДА в митохондриях определяли сразу после их выделения из ткани головного мозга. Для определения МДА брали 0,2 мл митохондриальной суспензии, добавляли к ней 3,8 мл 2% ортофосфорной кислоты, 1 мл тиобарбитуровой кислоты и кипятили на водяной бане 45 мин.

Далее к пробам добавляли по 4 мл бутанола, тщательно перемешивали активным встряхиванием, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, добиваясь разделения фаз. Из верхней

(бутаноловой) фракции отбирали пробы для фотометрии при длинах волн 535 и 580 нм против н-бутанола в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Для расчета концентрации МДА использовали формулу:

$$C_{\text{мда}} = (E_{535} - E_{580}) * 5 * 2 * 10^6 / 1,56 * 10^5 * C_{\text{белка}} * 5 * 10$$

$$C_{\text{мда}} = (E_{535} - E_{580}) * 2 / 1,56 * C_{\text{белка}}$$

$C_{\text{мда}}$ – концентрация МДА в мкмоль/г

E_{535} – экстинция бутаноловой фракции при длине волны 535 нм

E_{580} – экстинция бутаноловой фракции при длине волны 580 нм

$C_{\text{белка}}$ – содержание белка 0,02 мл митохондрий

$C_{\text{белка}} * 5 * 10$ – содержание белка 0,2 мл митохондрий (проба для определения МДА)

$1,56 * 10^5$ – молярный экстинкционный коэффициент

5 и 2 – коэффициенты пересчета на кювету 5 мл

2.6 Определение содержания восстановленного глутатиона в митохондриальной фракции головного мозга.

Принцип метода основан на способности кислоторастворимых тиоловых группировок (тиоловых групп низкомолекулярных соединений) при взаимодействии с 5,5' – дитиобис(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ) образовывать окрашенное соединение – 2-нитро-6-меркаптобензойную кислоту, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм. Поскольку, восстановленный глутатион является преобладающим низкомолекулярным тиолом, концентрация последних принимается условно за концентрацию восстановленного глутатиона.

Реактивы: 15% раствор сульфосалициловой кислоты в 2% растворе детергента полиэтиленгликоля, 0,1 М трис-НСl буфер с рН 8,5,

содержащий 0,01% ЭДТА, абсолютный метанол, 0,4 % метаноловый раствор 5,5' – дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (готовят *ex tempore*).

Ход определения: к 0,5 мл взвеси митохондрий добавляли 0,25 мл 15% раствора сульфосалициловой кислоты. Пробы перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин и температуре +2 °С. Затем 0,4 мл супернатанта переносили в пробирку, содержащую 3,4 мл 0,1 М трис-НСl буфера с 0,01% ЭДТА, рН=8,5. К полученной смеси добавляли 25 мкл раствора ДТНБ. После перемешивания пробы фотометрировали против контроля при длине волны 412 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Контроль готовился аналогично, но, вместо биологического материала, вносилось 0,5 мл среды выделения.

Расчет содержания восстановленного глутатиона производили с помощью калибровочного графика, для построения которого использовали растворы коммерческого препарата восстановленного глутатиона с концентрациями от 0,02 до 2 ммоль/л, проведенные через этапы этой методики. Молярно-экстинкционный коэффициент цветных продуктов реакции при 412 нм, который был получен со стандартным раствором восстановленного глутатиона оказался равным $13450 \text{ м}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Найденное значение молярно-экстинкционного коэффициента для продуктов реакции при данной длине волны оказалось близко к величине $13600 \text{ м}^{-1} \text{ см}^{-1}$, которое приведено в работе J.L. Ellman (1958).

2.7 Определение содержания диеновых конъюгатов в суспензии митохондриальных мембран.

Для определения содержания диеновых конъюгатов использовалась методика предложенная Волчегорским И.А. (Львовская Е.И. с соавт. 1991).

0,5 мл суспензии митохондрий экстрагировали 5 мл смеси гептан-изопропанол (1:1 по объему) при встряхивании в закрытых пробирках в течение 15 мин. Затем после центрифугирования при 10000 об/мин

липидные экстракты сливали и разбавляли 5 мл смеси гептан-изопропанол (1:2 по объему). Последнюю процедуру выполняли с целью достижения оптимальных значений оптической плотности в обеих фазах экстракта. К разбавленным липидным вытяжкам добавляли водный раствор соляной кислоты рН 2,0 в объеме 2 мл для разделения фаз и отмывки от нелипидных примесей. После разделения гептановую фазу отбирали в отдельную сухую пробирку, а к водно-спиртовой фазе добавляли 1 г NaCl для обезвоживания изопропанольного экстракта. После отделения водной фазы изопропанол переносили в отдельную пробирку. Оптические контроли готовили по схеме описанной выше, но вместо митохондрий брали 0,5 мл среды выделения.

Измеряли оптическую плотность каждой фазы против соответствующего контроля при 220 нм (в диапазоне 186 – 225 нм поглощают ультрафиолетовые лучи двойные связи), 232 нм (поглощение отражает содержание диеновых конъюгатов), 278 нм (поглощение зависит от содержания кетодиенов и сопряженных триенов). Рассчитывали содержание продуктов ПОЛ по отношению E_{232}/E_{220} и E_{278}/E_{220} на 1 мг белка суспензии митохондриальных мембран.

2.8. Статистическая обработка результатов исследования

Результаты экспериментов обрабатывали с применением интегрированного пакета статистических программ Statistica 6.1 (StatSoft, USA). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием дисперсионного анализа с последующим применением критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для сравнения трех и более экспериментальных групп и t-критерия Стьюдента для сравнения двух групп. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилкса. В случае невыполнения закона нормального распределения вместо t-критерия Стьюдента использовался знаковый

критерий Вилкоксона. Все статистические исследования проводились для двусторонней гипотезы на уровне статистической значимости - 0,05 (различия считали достоверными при $p < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

3.1. Состояние окислительной и энергопреобразующей функции митохондрий мозга крыс при гипогликемическом судорожном синдроме и различных способах его купирования.

3.1.1 Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга интактных животных

Как известно, дыхательные и фосфорилирующие характеристики митохондрий, выделяемых из тканей в искусственно создаваемых условиях, в значительной мере зависят, как от условий выделения, так и от состава инкубационной среды. Путем повышения, например, концентрации в средах катионов K^+ или ЭДТА, способного хелатировать двухвалентные катионы, можно искусственно создавать условия, весьма отличающиеся от реальных внутриклеточных, при которых в значительной мере будет ингибировано свободное окисление и весь поток электронов пойдет по фосфорилирующему пути. При этом показатели дыхательного контроля и степени сопряжения могут быть весьма высокими и намного превышающими реальные параметры. В литературе описаны методы выделения из ткани головного мозга крыс митохондрий с очень высокими показателями сопряжения и дыхательным контролем (Osawa K. et al., 1966).

Очевидно, что на фоне таких искусственно завышенных параметров бывает очень трудно оценивать эффекты патогенетических факторов, реально влияющих на функционирование дыхательных цепей митохондрий. Наиболее оптимальным является изучение действия патологических факторов при средних значениях показателей сопряжения, ибо в этом случае могут в полной мере проявляться различия между контролем и опытом (Скулачев В.П., 1962).

Подобранные нами параметры химического состава как среды выделения, так и инкубационной среды, позволили у контрольных животных получить показатели дыхания и фосфорилирующей способности митохондрий вполне сопоставимыми с приводимыми в большинстве литературных источников (Н.Б. Козлов с соавт., 1982; Хазанов В.А. с соавт., 2007) (таблица 1, 2).

Таблица 1. Респираторные характеристики митохондрий головного мозга контрольной группы крыс (нг атомов O_2 на 1 мг белка митохондрий).

	V_2	V_3	V_4	Коэффициент усиления (V_3/V_2)	Дыхательный контроль (V_3/V_4 по Чансу)	V_2/V_4
Глутамат n=9	11,3±0,9	38,1±3,0	12,3±1,2	3,4±0,26	3,22±0,27	0,98±0,04
Сукцинат n=9	27,2±2,2	59,6±5,8	26,9±2,9	2,22±0,17	2,24±0,12	1,05±0,07

Из представленных данных видно, что митохондрии мозга контрольных животных при введении в инкубационную среду в качестве субстратов дыхания глутамата или сукцината поглощали кислород (состояние 2 по Чансу и Уильямсу) со скоростью соответственно 11.3 и 27.2 нг атомов O_2 на каждый мг белка суспензии этих органелл. При добавлении АДФ скорость потребления кислорода митохондриями резко возрастала: при глутаматзависимом дыхании в 3.4 раза (коэффициент усиления по Ларди), а при сукцинатзависимом дыхании в 2.2 раза.

После исчерпания добавленного АДФ, интенсивность дыхания митохондрий (состояние V_4) возвращалась практически к исходному уровню, в результате чего отношение коэффициентов дыхательного контроля (по Чансу) и Ларди в обоих случаях оказалось близким к единице.

Таблица 2. Фосфорилирующая способность митохондрий головного мозга контрольной группы крыс и их чувствительность к динитрофенолу.

	АДФ/Δt	P/O	V _{днФ}	V _{днФ} / V ₄
Глутамат n=9	106,0 ±9,7	2,88 ±0,08	30,7 ±2,8	2,57 ±0,22
Сукцинат n=9	106,3 ±7,7	1,79 ±0,09	63,3 ±6,0	2,40 ±0,15

Равенство коэффициентов усиления и дыхательного контроля свидетельствуют о подключении в момент добавления АДФ реакций фосфорилирующего окисления и полного их прекращения после исчерпания добавленного АДФ. Это говорит о том, что в наших условиях исследования дыхания митохондрий, гидролиза нарабатываемого ими АТФ не происходило. Следовательно, митохондрии контрольной группы животных характеризовались высокой способностью сохранять нарабатываемый ими свой собственный потенциал, что подтверждается и отношением V_2/V_4 , которые в обоих случаях близки к единице.

На основании представленных данных можно полагать, что примененная нами процедура выделения митохондрий, как и состав инкубационной среды, позволяли нам получить митохондриальную фракцию ткани мозга с достаточно интактной и вполне функционально способной структурой этих органелл, что отвечало целям и задачам предпринятого нами исследования. Подтверждением этому явилась и высокая фосфорилирующая способность, которой обладали митохондрии мозга контрольных животных. Так, скорость фосфорилирования добавки АДФ (АДФ/Δt), которая, как известно, характеризует интенсивность использования освобождающейся энергии в дыхательной цепи, при применении субстратов дыхания в обоих случаях оказалась равной и составляла 106 нмоль/мин на мг белка.

Коэффициент P/O , показывающий эффективность окисления субстратов митохондриями контрольных животных, оказался равным 2.88 в случае глутаматзависимого дыхания и 1.79 при применении сукцината, что говорит о достаточно высокой степени сопряжения окисления и фосфорилирования.

Митохондрии мозга контрольных животных проявляли определенную чувствительность к разобщающему эффекту протонофора: 2,4-динитрофенола. Под влиянием этого разобщителя скорость поглощения кислорода по отношению к состоянию V_4 возрастала в 2,6 раза при глутаматзависимом дыхании и в 2,4 раза при сукцинатзависимом дыхании.

3.1.2. Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга при гипогликемическом судорожном синдроме.

В ходе исследования установлено, что митохондрии, выделенные из мозга животных, находящихся в гипогликемическом судорожном состоянии, существенно отличались по ряду параметров, характеризующих их дыхание, от митохондрий контрольных животных (данные таблицы 3)

Как видно из представленных в таблице данных, митохондрии мозга этой группы экспериментальных животных более активно поглощали кислород в исходном (V_2) состоянии, хотя для сукцинат зависимого дыхания это различие не носило достоверного характера.

Однако при применении субстратов обоого типа ответ митохондрий на добавку АДФ, стимулирующего их дыхание, был более мощным и высоко достоверным по сравнению с таким же ответом митохондрий контрольной группы животных (на 53% при глутамат зависимом дыхании и на 43% при сукцинат зависимом). Как следствие этого, расчетный

коэффициент усиления (Ларди) у таких животных по сравнению с контролем существенно возрастал (достоверно для сукцинат зависимого дыхания).

Таблица 3. Дыхательная и фосфорилирующая способность митохондрий мозга крыс при инсулиновом шоке (на высоте судорожного состояния).

Исследуемый параметр	Субстрат - глутамат		Субстрат - сукцинат	
	Контроль n=9	Шок n=9	Контроль n=9	Шок n=9
V_2	11,3 ±0,9	16,3 ±1,4 P<0,02	27,2 ±2,2	31,2±2,0
V_3	38,1 ±3,0	58,4 ±4,5 P<0,01	59,6 ±5,8	85,1±5,6 P<0,01
V_4	12,3 ±1,2	14,3 ±1,1	26,9 ±2,9	25,2 ±2,7
$V_{\text{днФ}}$	30,7 ±2,8	36,9 ±2,9	63,3 ±6,0	74,9 ±3,4
V_3/V_2 (Ларди)	3,4 ±0,26	3,78 ±0,21	2,22 ±0,17	2,75 ±0,18 P<0,05
V_3/V_4 (Чанс)	3,22 ±0,27	4,21 ±0,35	2,24 ±0,12	3,74 ±0,61 P<0,05
$V_{\text{днФ}}/V_4$	2,57 ±0,22	2,67 ±0,23	2,40 ±0,15	3,21 ±0,34 P<0,05
$\text{АДФ}/\Delta t$	106,0 ±9,7	178,3 ±4,9 P<0,001	106,3 ±7,7	165,4 ±9,7 P<0,001
P/O	2,88 ±0,08	2,99 ±0,06	1,79 ±0,09	1,92 ±0,04
V_2/V_4	0,98 ±0,04	1,17 ±0,07	1,05 ±0,07	1,32 ±0,12

Здесь и далее: P – статистически достоверные отличия

После исчерпания добавленного АТФ, скорость потребления кислорода митохондриями (V_4) в случае сукцинат зависимого дыхания падала, опускаясь даже несколько ниже исходного значения V_2 . Отражением этого явилось резкое возрастание коэффициента дыхательного контроля по Чансу (V_3/V_4) и его явное превалирование, в отличие от контрольных животных, над коэффициентом усиления по Ларди. Это говорит о том, что у животных данной серии исследования в митохондриях мозга скорость синтеза АТФ значительно преобладала над скоростью гидролиза и дыхательные цепи при этом сохраняли высокую

чувствительность к нарабатываемым макроэргам. О весьма высокой способности митохондрий, даже по сравнению с контролем, удерживать свой энергетический потенциал свидетельствует и факт существенного возрастания коэффициента V_2/V_4 .

Для митохондрий мозга животных, находящихся на данной стадии развития гипогликемической комы, характерным оказалась очень высокая скорость потребления АДФ в единицу времени, которая превышала таковую у контрольных животных на 68% и 56% соответственно примененным субстратам дыхания. При этом несколько повышалась и степень сопряжения окисления и фосфорилирования (P/O), что, однако, проявлялось лишь в виде некоторой тенденции, поскольку не нашло статистически достоверного подтверждения. Вместе с тем нельзя не обратить внимание на то, что у животных данной серии опытов при сукцинат зависимом дыхании возросла чувствительность дыхательных цепей к разобщающему действию протонофора – динитрофенола.

Таким образом, результаты данной серии экспериментов позволяют говорить о том, что у животных, находящихся на судорожном этапе гипогликемической комы, в электронтранспортных цепях митохондрий мозга происходят определенные изменения, результатом которых является повышение их энергопродуцирующей способности. В условиях дефицита восстановленных эквивалентов в ткани мозга это можно было бы рассматривать с позиций проявления определенных адаптивных возможностей данных органелл и реализуемых с непосредственным участием самого введенного инсулина.

К настоящему времени установлено уже достаточно много научных фактов, свидетельствующих о том, что инсулин, являясь анаболическим гормоном, выступает вместе с тем и как регулятор митохондриального окислительного фосфорилирования (Y. Boirie, 2003). В качестве примера подобного рода эффекта можно привести работу Д.А. Суткового и

соавторов (1978 г.) в которой показано, что инсулин, введенный животным за 3 часа до декапитации, резко стимулировал угнетенное в условиях искусственно вызванного у них гипокортицизма окислительное фосфорилирование в митохондриях ткани печени и сердца. При этом в 2,5 раза возрастала скорость фосфорилирования АДФ, существенно увеличивалось значение дыхательного контроля, повышался коэффициент P/O. Исследованиями C.S. Stump et al. (2003) было доказано стимулирующее влияние инсулина на синтез в скелетных мышцах митохондриальных белков через экспрессию кодирующих их генов, а также на способность этих органелл к синтезу АТФ, на активность таких ферментов как цитратсинтаза, цитохром-С-оксидаза.

Можно полагать, что аналогичный ответ на инсулин могут давать и митохондрии других тканей, клеточные структуры которых обладают рецепторами к данному гормону.

Как известно, долгое время в научной литературе господствовало мнение, что головной мозг относится к числу инсулинонезависимых тканей, поскольку не было убедительных экспериментальных доказательств о способности инсулина проникать через гематоэнцефалический барьер. Однако, многочисленными работами конца прошлого столетия, основывающихся на радиологических и иммуноцитохимических методах исследования, было убедительно доказано не только наличие рецепторов к инсулину в различных структурах головного мозга, и особенно в гипоталамусе, но и присутствие в них инсулина панкреатического происхождения (Baskin D.J., et al., 1986, Wozniak M. et al., 1993, Unger W. et al., 1991). Показано также, что действие инсулина и инсулинорецепторного комплекса в клетках головного мозга, протекает по тем же механизмам, что и в периферических тканях при некоторых различиях между нервными и глиальными клетками (Baskin D.J., et al., 1993; Masters B.A. et al., 1987).

В наших условиях эксперимента между введением инсулина и развитием гипогликемического судорожного состояния проходило более 3 часов. Учитывая вышеизложенное, можно полагать, что при условии проникновения такого экзогенного инсулина в ткань мозга, этого времени достаточно для начала проявления его эффектов, реализуемых через экспрессию генов кодирующих митохондриальные белки. Это и может быть причиной выявленных нами изменений в функционировании дыхательных цепей митохондрий мозга. Однако, экспрессия генов предопределяет дополнительные существенные энергетические траты, как на синтез матричных РНК, так и на последующий их трансляционный эффект, что в условиях развивающейся тяжелой гипогликемии, обусловленной избытком инсулина, утрачивает биологическую целесообразность и вряд ли может рассматриваться с позиций адаптационной перестройки метаболизма. Данная ситуация в корне отличается от той, когда дополнительный инсулин выбрасывается в кровь поджелудочной железой в результате гипергликемии, наступающей после приема углеводной пищи. В этом случае, вызываемая инсулином экспрессия генов, кодирующих митохондриальные белки, и стимуляция работы дыхательных цепей позволяет тканям начать активную утилизацию избыточной глюкозы по ее биотрансформации в гликоген, либо в жировые запасы.

3.1.3. Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга после купирования гипогликемического судорожного состояния введением глюкозы.

Из приведенных данных (табл. 4) видно, что купирование гипогликемических судорог введением глюкозы, в ближайшей

перспективе (спустя 1 час) в малой степени отражалось на респираторных показателях, характерных для митохондрий в период судорожного состояния. При этом проявлялась лишь некоторая тенденция к возврату параметров, как глутамат, так и сукцинат зависимого дыхания к контрольным значениям. Митохондрии мозга таких животных, по-прежнему, более активно, чем митохондрии контрольных животных поглощали кислород в состоянии V_3 (АДФ-стимуляция), обладали весьма высоким показателем АДФ/Δt. Следовательно, восстановление исходного уровня глюкозы в крови, ведущее к улучшению энергетического статуса мозга, за одночасовой период не приводит к снятию тех эффектов в дыхательных цепях митохондрий, которые были индуцированы инсулином.

Вместе с тем необходимо отметить, что глутаматзависимое дыхание митохондрий данной серии опытов (таблица 4), в отличие от сукцинатзависимого (таблица 5) характеризовалось более низкой эффективностью использования высвобождающейся энергии (достоверное снижение коэффициента Р/О по отношению к судорожному состоянию) и некоторым снижением способности к удержанию своего энергетического потенциала.

Еще в большей степени указанные различия в глутамат и сукцинатзависимом дыхании проявлялись спустя сутки после купирования судорог введением глюкозы.

Через 24 часа после купирования, несмотря на то, что при использовании сукцината дыхательные цепи митохондрий проявляли наибольшую чувствительность к разобщающему действию динитрофенола, они все же сохраняли свои основные респираторные параметры. Величина дыхательного контроля по Чансу, по-прежнему, явно превалировала над коэффициентом усиления.

Таблица 4. Функциональные параметры митохондрий мозга после купирования судорожного состояния введением глюкозы (субстрат дыхания - глутамат).

	1.Контроль n=9	2.Шок (судорожное состояние) n=9	3.Купирование глюкозой (через 1 час) n=9	4.Купирование глюкозой(спустя сутки) n=9
V_2	11,3 ±0,9	16,3 ±1,4 $P_{2-1}<0,02$	12,9±0,9	8,6 ±0,9
V_3	38,1 ±3,0	58,4 ±4,5 $P_{2-1}<0,01$	52,8±4,1 $P_{3-1}<0,02$	50,6 ±2,1 $P_{4-1}<0,02$
V_4	12,3 ±1,2	14,3 ±1,1	12,8±1,1	14,5 ±1,9
$V_{\text{ДНФ}}$	30,7 ±2,8	36,9 ±2,9	34,2±1,9	40,5 ±4,7
V_3/V_2 (Ларди)	3,4 ±0,26	3,78 ±0,21	4,27±0,45	6,35 ±0,66 $P_{4-1}<0,001$
V_3 /V_4 (Чанс)	3,22 ±0,27	4,21 ±0,35	4,56±0,70	3,80 ±0,33
$V_{\text{ДНФ}}/ V_4$	2,57 ±0,22	2,67 ±0,23	2,84±0,31	2,90 ±0,24
АДФ/Δt	106,0 ±9,7	178,3 ±4,9 $P_{2-1}<0,001$	147,1±3,7 $P_{3-1}<0,05$	137,4 ±8,6 $P_{4-1}<0,05$
P/O	2,88 ±0,08	2,99 ±0,06	2,77 ±0,07 $P_{3-2}<0,05$	2,71 ±0,06 $P_{4-2}<0,001$
V_2/V_4	0,98 ±0,04	1,17 ±0,07	1,06 ±0,11	0,63 ±0,07 $P_{4-1}<0,01$

Здесь и далее: P – статистически достоверные отличия

Иначе воспринимали митохондрии в качестве субстрата – глутамат, что выражалось, с одной стороны, в уменьшении исходной скорости дыхания (V_2), а с другой – в весьма высокой скорости потребления кислорода после исчерпания добавки АДФ (V_4). Результатом этого явилось высоко достоверное снижение (по сравнению с контролем) коэффициента V_2/ V_4 , т.е. параметра, характеризующего способность митохондрий к удержанию своего энергетического потенциала.

Коэффициент усиления Ларди, в отличие от сукцинат зависимого дыхания, более чем в полтора раза превышал величину дыхательного контроля по Чансу.

Все это в сочетании с еще более выраженным и достоверным снижением степени сопряжения окисления и фосфорилирования (P/O) свидетельствует об определенных нарушениях возникающих, по-видимому, не на уровне первичных реакций НАД-зависимого акцептирования водорода, а скорее на начальных участках электротранспортных цепей митохондрий.

Таблица 5. Функциональные параметры митохондрий мозга после купирования судорожного состояния введением глюкозы (субстрат дыхания - сукцинат).

	1.Контроль n=9	2.Шок (судорожное состояние) n=9	3.Купирование глюкозой (через 1 час) n=9	4.Купирование глюкозой(спустя сутки) n=9
V_2	27,2 ±2,2	31,2±2,0	31,4 ±3,2	29,7 ±4,2
V_3	59,6 ±5,8	85,1±5,6 $P_{2-1}<0,01$	81,2 ±8,4 $P_{3-1}<0,05$	80,7 ±8,3 $P_{4-1}<0,05$
V_4	26,9 ±2,9	25,2 ±2,7	24,7 ±1,8	25,5 ±3,0
$V_{\text{ДНФ}}$	63,3 ±6,0	74,9 ±3,4	67,7 ±4,3	87,6 ±5,6 $P_{4-1}<0,02$
V_3/V_2 (Ларди)	2,22 ±0,17	2,75 ±0,18 $P_{2-1}<0,05$	2,65 ±0,18	3,00 ±0,32 $P_{4-1}<0,05$
V_3 /V_4 (Чанс)	2,24 ±0,12	3,74 ±0,61 $P_{2-1}<0,05$	3,37 ±0,35 $P_{3-1}<0,01$	3,31 ±0,27 $P_{4-1}<0,01$
$V_{\text{ДНФ}}/ V_4$	2,40 ±0,15	3,21 ±0,34 $P_{2-1}<0,05$	2,82 ±0,23	3,61 ±0,24 $P_{4-1}<0,001$
$\text{АДФ}/\Delta t$	106,3 ±7,7	165,4 ±9,7 $P_{2-1}<0,001$	162,9 ±18,5 $P_{3-1}<0,02$	152,2 ±18,3 $P_{4-1}<0,05$
P/O	1,79 ±0,09	1,92 ±0,04	1,96 ±0,06	1,85 ±0,06
V_2/V_4	1,05 ±0,07	1,32 ±0,12	1,28 ±0,10	1,17 ±0,11

Таким образом, результаты данных серий показывают, что купирование гипогликемических судорог введением глюкозы, приводящее к явному улучшению состояния животных, в ближайшей одночасовой перспективе в малой степени отражается на тех изменениях в функциональном состоянии митохондрий мозга, которые были характерны для самого гипогликемического состояния. Индуцируемая инсулином

повышенная функциональная способность митохондрий мозга и не имеющая особого биологического смысла в условиях гипогликемии становится весьма целесообразной при нормогликемии после купирующего эффекта глюкозы. Выявляемые же спустя сутки после купирования судорог негативные изменения в глутаматзависимом дыхании митохондрий по сравнению с сукцинатзависимым, позволяют говорить о вероятности структурно-функциональных нарушений, постепенно развивающихся в возникающих в электронтранспортных цепях на уровне первого дыхательного комплекса.

3.1.4. Дыхание и фосфорилирующая способность митохондрий мозга крыс после купирования гипогликемического судорожного состояния введением глутамата натрия в сочетании с вдыханием воздуха в смеси с углекислым газом.

В отличие от купирующего эффекта глюкозы, купирование судорожного состояния введением глутамата натрия, в сочетании с вдыханием гиперкапнической газовой смеси, возвращало практически к исходным значениям измененные под влиянием гипогликемии параметры дыхания митохондрий - V_2 и V_3 (данные таблиц 6 - 7).

Скорость же дыхания после исчерпания добавки АДФ - V_4 при применении как глутамата, так и сукцината опускалась даже несколько ниже контрольных значений.

Вследствие этого дыхательный коэффициент по Чансу, как и на стадии судорожного состояния, все так же явно превалировал над коэффициентом усиления по Ларди. Следовательно, в результате купирования судорог данным способом, несмотря на снижение интенсивности дыхания в ответ на добавление субстратов и возврату их

параметров к контрольным значениям, митохондрии по-прежнему проявляли высокое сродство к перерабатываемому ими АТФ.

Таблица 6. Функциональные параметры митохондрий головного мозга крыс после купирования судорожного состояния глутаматом в сочетании с углекислым газом (субстрат дыхания - глутамат).

Серия опытов	1. Контроль n = 9	2. шок (судорожное состояние) n=9	3. Купирование глутаматом + CO ₂ n = 9	4. Купирование глутаматом + CO ₂ , спустя сутки n = 9
V ₂	11,3 ±0,9	16,3 ±1,4 P ₂₋₁ <0,02	9,8±0,8 P ₃₋₂ <0,001	12,9±1,7
V ₃	38,1 ±3,0	58,4 ±4,5 P ₂₋₁ <0,01	34,3±3,1 P ₃₋₂ <0,001	61,9±4,0 P ₄₋₁ <0,001
V ₄	12,3 ±1,2	14,3 ±1,1	9,5±0,9 P ₃₋₂ <0,01	17,9±1,3 P ₄₋₁ <0,01
V _{днф}	30,7 ±2,8	36,9 ±2,9	24,2 ±2,0 P ₃₋₂ <0,01	51,9±3,1 P ₄₋₁ <0,001
Ларди V ₃ / V ₂	3,4 ±0,26	3,78 ±0,21	3,59±0,34	5,48±0,75 P ₄₋₁ <0,02
Чанс V ₃ / V ₄	3,22 ±0,27	4,21 ±0,35	3,73±0,36	3,60±0,34
V _{днф} /V ₄	2,57 ±0,22	2,67 ±0,23	2,65±0,21	2,94±0,15
АДФ/Δt	106,0 ±9,7	178,3 ±4,9 P ₂₋₁ <0,001	93,8±9,9 P ₃₋₂ <0,001	175,2±5,3 P ₄₋₁ <0,001
P/O	2,88 ±0,08	2,99 ±0,06	2,73±0,09 P ₃₋₂ <0,02	2,63±0,08 P ₄₋₁ <0,05 P ₄₋₂ <0,01
V ₂ / V ₄	0,98 ±0,04	1,17 ±0,07	1,1±0,12	0,71 ±0,06 P ₄₋₁ <0,01

При этом они обладали столь же выраженной способностью к сохранению своего энергетического потенциала (параметр V₂/V₄ для сукцинатзависимого дыхания достоверно превышал контрольный показатель), возможно вследствие превалирования скорости синтеза АТФ над скоростью его гидролиза. Вместе с тем, энергетические параметры функционирования дыхательных цепей митохондрий так же изменялись.

Это выражалось в возврате к контрольным значениям скорости утилизации АДФ ($\text{АДФ}/\Delta t$) при применении обоих субстратов дыхания и достоверном снижении коэффициентов P/O , которые опускались даже несколько ниже контрольных цифр.

Результатом купирования судорог глутаматом с углекислым газом явилось достоверное понижение, несколько возросшей при шоке, чувствительности дыхательных цепей к разобщающему действию протонифора – динитрофенола.

Таким образом, оба способа купирования гипогликемического судорожного состояния, дающие одинаковый качественный эффект по снятию судорог и объективному улучшению состояния животных, весьма отличались по эффектам, оказываемым на дыхательные цепи митохондрий: купирование глутаматом в сочетании с CO_2 возвращало практически к контрольным значениям параметры их дыхания и фосфорилирующей способности, тогда как купирование глюкозой, по существу, не отражалось на показателях функционального состояния митохондрий, свойственных самому судорожному состоянию. Эти различия в купирующих эффектах являются дополнительным подтверждением того, что функциональные изменения в дыхательных цепях митохондрий, выявленные на судорожном этапе гипогликемической комы, не носят адаптивного характера, направленного на поддержание энергетического статуса нервной клетки в новых, т.е. гипогликемических условиях. Они являются, как уже отмечалось, по-видимому, одним из обычных метаболических эффектов введенного инсулина. Эти эффекты, в отличие от купирования шока глюкозой, в какой-то мере ослабляются глутаматом и углекислым газом, что, однако, не мешает купированию судорожного состояния и выходу животного из комы.

Вместе с тем, совершенно очевидно, что независимо от способа купирования шока, объективное улучшение состояния животных может

быть прежде всего результатом улучшения биоэнергетического статуса ткани мозга. Купирующий эффект глюкозы очевиден, поскольку этот основной энергетический субстрат, вступая в катаболические процессы, начинает обеспечивать восстановленными коферментами не только дыхательные цепи митохондрий, но и биосинтетические процессы.

В отличие от глюкозы, вводимый глутамат может оказывать двойственный эффект. С одной стороны, эта аминокислота, амидируясь, может активно связывать аммиак, накопление которого в ткани мозга в судорожном периоде идет особенно интенсивно. Именно с этим эффектом, как уже отмечалось ранее, связывал благоприятное действие глутамата при купировании шока автор данного метода (Козлов Н.Б., 1960). С другой стороны, глутамат, вступая в реакцию трансаминирования с оксалоацетатом, превращается в α -кетоглутарат. Это дает возможность клеткам запустить заторможенный цикл Кребса и превратить его из трикарбонового в дикарбоновый, что и позволяет в какой-то мере восполнить дефицит энергии. Но результатом такого вовлечения экзогенного глутамата в катаболический процесс будет являться еще большее накопление в ткани мозга аспартата, что может приводить и к негативным последствиям. Если бы глутамат окислялся и напрямую превращался в α -кетоглутарат под действием глутаматдегидрогеназы, то митохондрии могли бы получать на 1 молекулу НАДН или НАДФН даже больше. Однако, в этом случае цикл не смог бы функционировать и в усеченном виде, поскольку все заканчивалось бы нелимитированным накоплением в митохондриальном матриксе оксалоацетата. Принимая во внимание кислотные свойства данного метаболита, последствия этого в ближайшей перспективе были бы более трагичны для нейронов, по сравнению с накоплением аспартата, как возбуждающей аминокислоты. Увеличение содержания в ткани мозга аспартата, в условиях

гипогликемической комы, является общеизвестным фактом, доказанным многими исследователями (Sutherland G.R. et al., 2008).

Более сложным представляется объяснение роли углекислого газа в данном способе купирования гипогликемического шокового состояния. Возможно, что вдыхание гиперкапнической газовой смеси ослабляет эффект развивающегося тканевого метаболического алкалоза. Вместе с тем, нельзя не принимать во внимание и приписываемые углекислому газу антиоксидантные свойства, что может иметь уже и прямое отношение к оксидантному статусу митохондриальных структур в конкретных метаболических условиях.

Спустя сутки, в отличие от одночасового интервала, независимо от способа купирования шока, принципиальных различий в функциональном состоянии митохондрий выявлено не было.

Через 24 часа после купирования судорожного гипогликемического состояния глутаматом в сочетании с CO_2 скорость дыхания митохондрий под стимулирующим влиянием АДФ, как и скорость фосфорилирования, т.е. $\text{АДФ}/\Delta t$ вновь оказались на достоверно более высоком уровне и, при том, близком к судорожному состоянию. Данный эффект был однотипен, как для глутамат, так и сукцинатзависимого дыхания митохондрий. Коэффициент P/O при этом в случае глутаматзависимого дыхания еще больше понижался, достоверно опускаясь ниже контрольных цифр. При сукцинатзависимом дыхании данный коэффициент, напротив, несколько возрастал, но по-прежнему не отличался от исходного контрольного значения (таблица 7).

Через сутки после купирования шока отмечено также повышение чувствительности митохондрий к разобщающему действию протонофора – динитрофенола, о чем свидетельствует увеличение таких параметров как V_{DNP} и отношения V_{DNP} / V_4 . Этот эффект характерен для обоих способов купирования шока. Следует отметить, что в ближайший час после

купирования шока глутаматом, в отличие от купирования его глюкозой, чувствительность мембран митохондрий к разобщающему действию динитрофенола не повышалась, а напротив, падала.

Таблица 7. Функциональные параметры митохондрий головного мозга крыс после купирования инсулинового шока глутаматом в сочетании с углекислым газом (субстрат дыхания – сукцинат)

Серия опытов	1.Контроль n = 9	2. Шок (судорожное состояние) n=9	3.Купирование глутаматом + CO ₂ n = 9	4.Купирование глутаматом +CO ₂ , спустя сутки n = 9
V ₂	27,2 ±2,2	31,2±2,0	26.0±1.8	34.4±1.3 P ₄₋₁ <0,02
V ₃	59,6 ±5,8	85,1±5,6 P ₂₋₁ <0,01	63,3±8,0 P ₃₋₂ <0,05	92,2±3,9 P ₄₋₁ <0,001
V ₄	26,9 ±2,9	25,2 ±2,7	19.7±1.8	32,9±3,3 P ₄₋₃ <0,01
V _{днф}	63,3 ±6,0	74,9 ±3,4	54,4±4,2 P ₃₋₂ <0,01	92.7±5.3 P ₄₋₁ <0,001
Ларди V ₃ / V ₂	2,22 ±0,17	2,75 ±0,18 P ₂₋₁ <0,05	2.4±0.017	2,73±0,17 P ₄₋₁ <0,05
Чанс V ₃ / V ₄	2,24 ±0,12	3,74 ±0,61 P ₂₋₁ <0,05	3,21±0,21 P ₃₋₁ <0,001	3,00±0,26 P ₄₋₁ <0,02
V _{днф} /V ₄	2,40 ±0,15	3,21 ±0,34 P ₂₋₁ <0,05	2.84±0.13	3,01±0,28
АДФ/Δt	106,3 ±7,7	165,4 ±9,7 P ₂₋₁ <0,001	110,5±15,1 P ₃₋₂ <0,01	171,9±7,2 P ₄₋₁ <0,001
P/O	1,79 ±0,09	1,92 ±0,04	1.68±0.09 P ₃₋₂ <0,05	1,83±0,06
V ₂ / V ₄	1,05 ±0,07	1,32 ±0,12	1.35±0.07 P ₃₋₁ <0,01	1.11±0.09 P ₄₋₃ <0,05

Спустя сутки после купирования шока у 100% животных данной серии экспериментов коэффициент усиления (дыхательный контроль по Ларди) при глутаматзависимом дыхании митохондрий превалировал над показателем контроля по Чансу. Это указывает на высокую скорость

гидролиза образующегося АТФ и снижение сродства дыхательных цепей к данному макроэргу.

Об этом говорит и факт статистически достоверного снижения в этой серии опытов по отношению к контролю показателя V_2 / V_4 - параметра, который, как уже неоднократно отмечалось, характеризует способность митохондрий удерживать свой энергетический потенциал. При сукцинатзависимом дыхании митохондрий данный эффект в такой степени не проявлялся.

Таким образом, результаты проведенных исследований и представленных в этой главе, показывают, что дыхательные цепи митохондрий вовлекаются в общую ответную реакцию нервной ткани на гипогликемический шок, повышая свою дыхательную и фосфорилирующую способность, адаптивный характер которой в условиях, когда все редокс-системы находятся в окисленном состоянии, представляется в определенной мере сомнительным. Эффект купирования судорожного состояния глутаматом натрия в сочетании с углекислым газом, в отличие от классического купирования глюкозой, нивелирует эти изменения в работе дыхательных цепей митохондрий. Однако, несмотря на принципиальные различия в способах купирования судорожного состояния, спустя сутки функциональное состояние митохондрий оказывается существенно измененным. Ряд параметров, характеризующих дыхание митохондрий (повышение чувствительности к разобщающему действию динитрофенола, снижение коэффициента P/O и показателя V_2/V_4 , явное превалирование дыхательного контроля по Ларди над значениями дыхательного контроля по Чансу) позволяют говорить о постепенно наступающих неблагоприятных изменениях в митохондриальных мембранах и в большей степени отражающихся на функционировании первого дыхательного комплекса.

Как известно, многие исследователи связывают нарушение фосфорилирующей способности митохондрий при тех или иных патологических состояниях с повреждением структурных компонентов их мембран продуктами избыточной липопероксидации, являющихся эффективными природными разобщителями. Это относится и тяжелым гипогликемическим состояниям, при которых, если судить по данным литературы, хотя и весьма противоречивым, происходит интенсификация свободнорадикальных окислительных процессов.

С учетом этого мы провели собственные исследования по изучению состояния свободнорадикальных реакций в организме животных в наших конкретных условиях экспериментов.

3.2 Состояние липопероксидации в митохондриях головного мозга при гипогликемическом судорожном синдроме и после различных способов его купирования.

Способность липидов митохондриальных мембран к переокислению оценивалась нами на основании метода Fe^{2+} -индуцированной хемилюминисценции взвеси митохондрий, выделенных из ткани мозга в среде, не содержащей ЭДТА, способного хелатировать двухвалентные катионы. Параметры такой хемилюминисценции, активированной родамином «Ж» для всех групп экспериментальных животных отражены в таблице 8.

Как следует из приведенных данных, параметры хемилюминисцентных вспышек взвеси митохондрий, выделенных из мозга животных, находящихся в гипогликемическом судорожном состоянии, мало отличались от контрольных значений. Выявлено лишь некоторое увеличение амплитуды быстрой вспышки, что указывает на

незначительную тенденцию к росту концентрации гидроперекисей в липидной фазе митохондрий в условиях гипогликемии.

Купирование судорожного состояния введением глюкозы не приводило, однако, к нормализации содержания гидроперекисей. Напротив, спустя 1 час после купирующего эффекта глюкозы, концентрация гидроперекисей уже на одну треть превышала контрольные значения. Тем не менее этот эффект лишь приблизился к границе достоверности.

На протяжении последующих суток данная тенденция к росту содержания гидроперекисей сохранялась, и спустя 24 часа их уровень в митохондриях мозга, высоко достоверно, уже на 78% превышал контрольные значения.

Вместе с тем обращает на себя внимание тот факт, что при более высоком исходном содержании гидроперекисей липидов по сравнению с контролем, купирующий эффект глюкозы сочетался со снижением, как амплитуды, так и особенно светосуммы медленной вспышки при некотором сокращении ЛАГ – периода. Это говорит о том, что несмотря на некоторое снижение окислительной резистентности липидов митохондрий (сокращение ЛАГ - периода), скорость их автокаталитического окисления падает, вероятно, в результате достаточно активного обрыва боковых цепей разветвления компонентами антиоксидантной системы данных органелл.

Таблица 8. Параметры Fe^{2+} -индуцированной хемилюминисценции взвеси митохондрий мозга при гипогликемическом судорожном синдроме и после его купирования.

	контроль n=8	судорожное состояние n=8	Купирование глюкозой		Купирование глутаматом	
			Через 1 час n=8	Через 1 сутки n=8	Через 1 час n=8	Через 1 час n=8
Амплитуда быстрой вспышки (ГПЛ), отн.ед.	37,4±6,5	44,8±6,2	51,8±3,5	66,6±9,1 P ₄₋₁ <0,02	99,8±9,7 P ₅₋₁ <0,001 P ₅₋₃ <0,001	64,4±7,4 P ₆₋₅ <0,02 P ₆₋₁ <0,02
Лаг период,сек	16±2,3	15±2,3	16±4,2	12±1,3	16±1,2	14±1,4
Амплитуда медленной вспышки, отн.ед	17,0±1,5	16,2±1,7	11,7±1,9 P ₃₋₁ <0,05	13,3±1,5	21,7±2,3 P ₅₋₃ <0,01	17,7±2,0
tg угла наклона медленной вспышки	1,60±0,40	0,87±0,12 P ₂₋₁ <0,05	0,89±0,16	1,37±0,14 P ₄₋₂ <0,02	1,43±0,30	1,77±0,29 P ₆₋₂ <0,01
Светосумма медленной вспышки, отн.ед	305±25	336±38	218±22 P ₃₋₁ <0,02 P ₃₋₂ <0,02	233±20 P ₄₋₁ <0,05	424±65 P ₄₋₁ <0,05	309±44

Примечание: P – на основании непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Столь высокий подъем уровня гидроперекисей липидов после купирования судорожного состояния глутаматом натрия и CO₂ на фоне объективного улучшения состояния животных (исчезновения судорог, восстановление рефлексов), побудил нас исследовать в аналогичной серии экспериментов содержание в липидных экстрактах мембран митохондрий других начальных продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов. По методу Н. А. Волчегорского из взвеси митохондрий получали гептан-изопропанольные экстракты липидов и измеряли их светопоглощение в УФ-части спектра при 220, 232 и 278 нм. Как известно, именно в эту фазу, как более полярную, в основном переходят фосфолипидные компоненты мембран, которые являются важнейшими субстратами ПОЛ.

Таблица 9. Содержание продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидных экстрактов из митохондрий мозга спустя 1 час после купирования гипогликемических судорог глутаматом натрия в сочетании с CO₂.

	E220,нм	E232,нм	E232/E220	E278,нм	E278/E220
интактные животные (контроль) n=9	0,360± 0,046	0,109± 0,027	0,30±0,03	0,032± 0,005	0,09± 0,01
после купирования судорог n=8	0,371± 0,073	0,149± 0,060	0,40±0,05	0,96± 0,052 P<0,05	0,26± 0,05 P<0,02

Примечание: E – значение экстинкций при соответствующих длинах волн, отнесенное к 1 мг белка взвеси митохондрий

P – достоверность на основании парного критерия Вилкоксона – Манна – Уитни.

Из приведенных в таблице 9 данных видно, что средние значения экстинкций изопропанольной фазы при 220 нм (на эту длину волны приходится максимум поглощения изолированных двойных связей в липидах), отнесенное к 1 мг белка, содержащегося во взвеси митохондрий, подвергнутых липидной экстракции, в обеих группах животных были

практически идентичными. Это говорит о том, что по общему содержанию липидов и степени их ненасыщенности митохондриальные мембраны как контрольной, так и опытной групп животных практически не отличались друг от друга. Это находит свое подтверждение в обстоятельной работе Agardh C.D. et al. (1981), показавшим ранее, что даже более длительная тяжелая гипогликемия не отражается на общем содержании полиеновых жирных кислот и их соотношении.

Поглощение изопропанольными экстрактами лучей с длиной волны 232 нм (отражает содержание диеновых конъюгатов), рассчитанное как на 1 мг митохондриального белка, так и по отношению к поглощению 220 нм, в опытной группе в обоих случаях на треть превалировало над контролем. Эти изменения, однако, не носили достоверного характера. В отличие от сказанного, параметры поглощения экстрактами лучей с длинной волны 278 нм, которое зависит от содержания кетодиенов и сопряженных триенов, рассчитанное на 1 мг митохондриального белка, так и по отношению к поглощению при 220 нм, статистически достоверно и более чем в 2 раза превышали контрольные значения.

Полученные данные этой дополнительной серии экспериментов, согласуясь с результатами люминисцентного анализа, свидетельствуют о существенном превышении содержания, по сравнению с контролем, начальных продуктов ПОЛ в митохондриальных мембранах в ближайшей перспективе восстановительного периода после купирования гипогликемического судорожного состояния глутаматом натрия в сочетании с углекислым газом.

Спустя сутки после такого способа купирования гипогликемических судорог, в течение которых животные имели свободный доступ к воде и пище, ситуация с липопероксидацией несколько улучшилась. Об этом говорит возвращение параметров хемилюминисцентной медленной вспышки к контрольным значениям, и существенное снижение содержания

гидроперекисей в липидах мембран митохондрий, хотя их уровень, как и в случае с купирующим эффектом глюкозы, достоверно и более чем на 70% все же превышал контрольные цифры.

Таким образом, проведенное исследование показало, что метаболическая перестройка, которая неизбежно происходит при ограничении поступления в нервную ткань энергетических ресурсов на начальных этапах развития коматозного состояния, существенно не отражается на биорадикальном статусе ее энергопреобразующих органелл. На основании полученных данных это утверждение, вероятно, справедливо только по отношению к интегральной совокупности митохондрий выделяемых из всех отделов мозга. С учетом исключительной гетерогенности ткани мозга, ситуация в отдельных его структурах, вероятно, могла быть и иной.

Ограничение энергетических возможностей нейронов и дефицит восстановленных эквивалентов в условиях гипогликемии, по-видимому, создают предпосылки к нарушению естественного баланса между оксидантным и антиоксидантным статусом митохондрий уже в начале восстановительного периода, т.е. вскоре после выхода из судорожного состояния. Причем этот баланс остается нарушенным в восстановительном периоде, как в условиях нормогликемии (после купирования судорог глюкозой), так и при сохраняющейся гипогликемии (после купирования судорог глутаматом с CO_2).

В связи со сказанным, вполне закономерным является вопрос: можно ли говорить о развитии в условиях эксперимента тканевого оксидативного стресса? Известно, что одним из основных его маркеров считается малоновый диальдегид, по накоплению которого принято оценивать интенсивность перекисных процессов.

К настоящему времени исследователи не пришли к единому мнению о том, как меняется содержание МДА в ткани головного мозга под

влиянием тяжелой гипогликемии. Ряд исследователей (Patočkove J. et al., 2003) указывают на то, что при тяжелой гипогликемии (концентрация глюкозы в крови ниже 1 ммоль/л) наблюдается увеличение концентрации малонового диальдегида в ткани головного мозга. По данным же Телушкина П.К. (2009), в условиях единичной гипогликемической комы не происходит каких-либо изменений в уровне МДА в исследованных отделах мозга. Только лишь у животных, перенесших серию гипогликемических ком, через 48 часов после купирования последней комы в стволе мозга обнаруживалось увеличенное содержание малонового диальдегида. В исследованиях Шестаковой С.А. с соавторами (2009) в опытах на крысах, как в условиях гипогликемической комы, так и после ее купирования, также не было обнаружено изменений в уровне МДА в различных отделах мозга. Исключение составил лишь гипокамп, где концентрация МДА снижалась на 22% в условиях комы, но восстанавливалась после ее купирования глюкозой.

Для того, чтобы уточнить влияние тяжелой гипогликемии на процессы ПОЛ в митохондриальных мембранах, нами было предпринято собственное исследование по определению концентрации МДА в указанных органеллах в наших условиях эксперимента.

Как видно из данных, приведенных ниже (таблица 10), развитие судорожного состояния у животных приводит к некоторому увеличению уровня этого метаболита в митохондриях, но не достигающих границ достоверности.

Через 1 час после купирования судорог, независимо от применяемого способа, уровень МДА снижался, опускаясь даже несколько ниже контрольного значения. Через сутки после купирования судорожного состояния глюкозой содержание МДА в митохондриях оставалось неизменным, тогда как после купирующего эффекта глутамата и CO_2 , спустя также сутки, уровень МДА оказался достоверно более низким по

сравнению с уровнем, характерным для начального восстановительного периода.

Таблица 10. Содержание малонового диальдегида (ТБК-позитивный тест) в митохондриях мозга при гипогликемическом судорожном состоянии и после его купирования (нмоль/мг митохондриального белка).

	Контроль n=8	Судорожное состояние n=8	Купирование Глюкозой		Купирование глутаматом	
			Через 1 час n=8	Через 1 сутки n=8	Через 1 час n=8	Через 1 сутки n=8
МДА	1,9± 0,386	2,5± 0,35	1,6±0,16	1,6±0,19	1,5±0,16	0,9±0,09 P ₆₋₄ ≤0.05 P ₆₋₅ ≤0.05

Некоторое снижение концентрации МДА в митохондриальных мембранах в восстановительном периоде, вместо казалось бы ожидаемого прироста, не является фактом, ставящим под сомнение полученные нами данные о повышении содержания более ранних продуктов ПОЛ в цепных процессах липопероксидации.

Здесь надо принять во внимание два обстоятельства. Во-первых, в клеточных структурах, в отличие от биологических жидкостей, МДА может и не быть конечным продуктом липероксидации, поскольку может метаболизироваться дальше их ферментными системами. А во-вторых, выход МДА в реакциях перекисного окисления бывает более чем на порядок низким, чем расходуемые в этом цепном процессе жирные кислоты и потребляемый кислород (Владимиров Ю.А. с соавт., 1972).

Установленные нами факты повышения концентрации в условиях эксперимента начальных продуктов ПОЛ (гидроперекисей, кетодиенов и сопряженных триенов) еще не позволяют говорить об интенсификации процесса липопероксидации в мембранах митохондрий, так как стационарная концентрация любого метаболита зависит от соотношения интенсивности его образования и распада. Поэтому при недостаточно эффективном обрыве ведущей и боковых цепей перекисного процесса с

участием антиоксидантов, как ферментативной, так и неферментативной природы, концентрация гидроперекисей в мембранах будет повышенной, даже если перекисное окисление будет идти с обычной скоростью.

Принимая во внимание данные литературы о том, что ферменты антиоксидантной системы нервной ткани в условиях тяжелой гипогликемии и в восстановительном периоде существенно не изменяют своей активности (J. Patockove, 2004; С.А. Шестакова, 2009), мы провели исследование по изучению общей антиоксидантной активности взвеси митохондрий ткани мозга в наших условиях эксперимента. Антиоксидантную емкость суспензии митохондрий оценивали на основании их угнетающего эффекта на интенсивность медленной хемилюминисцентной вспышки стандартной желточной липопропротеидной системы.

В ходе этих исследований ни в одной из серий опытов нами не было выявлено статистически достоверных отклонений в антиоксидантной способности митохондрий, по сравнению с контрольной группой животных (таблица 11).

Таблица 11. Антиоксидантная емкость митохондриальных мембран мозга при гипогликемическом судорожном синдроме и после его купирования (по степени тушения медленной хемилюминисцентной вспышки стандартной желточной липопропротеидной системы в отн.ед).

	Контроль n=8	Судорожное состояние n=8	Купирование Глюкозой		Купирование глутаматом	
			Через 1 час n=8	Через 1 сутки n=8	Через 1 час n=8	Через 1 сутки n=8
АОЕ	38,1± 7,23	30,9±5,91	39,0±7,78	38,9±5,97	19,75±7,52 0,1<P<0,05	41,8±5,43

Тем не менее, обращает на себя внимание довольно существенное снижение этого показателя у животных спустя 1 час после купирования судорожного состояния глутаматом в сочетании с углекислым газом, которому, как было показано ранее, приписывают антиоксидантные

свойства. Этот факт, хотя он лишь подошел к границе статистического подтверждения, однако важен, поскольку у этой группы экспериментальных животных была выявлена максимальная концентрация гидроперекисей и отмечено существенное изменение параметров хемилюминисцентной вспышки.

Все это имело место на фоне все той же предельно низкой концентрации глюкозы в крови (менее 1 ммоль/л), несмотря на объективное улучшение состояния животных. Очевидно, что некоторое увеличение энергетических возможностей митохондрий за счет вовлечения в катаболический процесс глутамата, в отличие от основного субстрата – глюкозы, не позволяло им достаточно эффективно противостоять этим негативным процессам. И лишь спустя сутки после купирования судорог глутаматом с CO_2 , в течение которых животные имели свободный доступ к пищевому рациону, антиоксидантные возможности этих органелл возвращались к исходным параметрам, что сочеталось с некоторым улучшением состояния липопероксидации. Об этом говорит, как было показано выше, возвращение параметров медленной хемилюминисцентной вспышки контрольным значениям, хотя и при достаточно высоком еще содержании гидроперекисей. Отсутствие факта накопления конечных продуктов ПОЛ, на фоне весьма заметно высоких уровней образования первичных продуктов перекисного окисления, позволяет говорить о сохранении достаточно высокой емкости системы антиоксидантной защиты. Известно, что важнейшим ее компонентом является восстановленный глутатион, уровень которого в митохондриях считается одним из решающих факторов нормального функционирования этих органелл. Многие исследователи указывают на тесную связь между развитием различных патологических состояний и значительным уменьшением и/или окислением митохондриального пула GSH.

Принимая во внимание сказанное, представлялось важным исследовать содержание восстановленного глутатиона в тех сериях опытов, где нами был зарегистрирован достоверно высокий уровень гидроперекисей липидов после обоих способов купирования судорожного состояния – т.е. через сутки после выхода из гипогликемической комы (таблица 12).

Таблица 12. Содержание восстановленного глутатиона в митохондриях ткани головного мозга спустя сутки после купирования гипогликемического судорожного состояния (нмоль/мг белка).

	1. Контроль	2. Купирование глюкозой (1 сутки)	Купирование глутаматом+ CO ₂ (1 сутки)
GSH	15,5±3,69	14,73±2,13	15,7±3,85

Как видно из результатов, отраженных в таблице 12, содержание восстановленного глутатиона в митохондриях, спустя сутки после купирования обоими способами гипогликемических ком, сохранялась на уровне контрольных значений.

Таким образом, совокупно оценивая представленные в данном разделе данные, можно полагать, что даже довольно тяжелые гипогликемические состояния животных на начальных этапах и вплоть до развития судорожного состояния не отражаются на биорадикальном статусе всей совокупности митохондрий, выделяемых из ткани головного мозга. Однако истощение энергетических ресурсов и переход восстановленных эквивалентов в окисленное состояние, влекущее за собой постепенное снижение потребления кислорода дыхательными цепями митохондрий, что неизбежно должно приводить к возрастанию парциального давления кислорода в их матриксе, снижение энергизации мембран, повышение концентрации АДФ и являются, по-видимому, теми пусковыми факторами, которые приводят к интенсификации процесса липопероксидации в последующий период. Накопление первичных

продуктов ПОЛ начинает происходить уже на начальных этапах восстановительного периода. В большей степени это проявляется при применении в качестве купирующего средства глутамата с углекислым газом. Выход из коматозного состояния и восстановление жизненных функций с последующим переходом на обычный рацион питания не останавливает процесса избыточной липопероксидации, что выявляется и спустя сутки. Однако, сохранение антиоксидантных возможностей митохондрий ткани мозга не позволяет этим процессам, по отношению к целостной его структуре, приобрести катастрофический и губительный характер для нейронов. Вместе с тем, накопление начальных продуктов избыточной липопероксидации в мембранах митохондрий, даже при условии успешного обрыва ведущих цепей компонентами антиоксидантной защиты, могут быть причиной тех изменений в электронтранспортных цепях данных органелл, которые приводят к изменению их дыхательной и фосфорилирующей способности. В связи с полученными результатами о состоянии липопероксидации в митохондриях мозга при гипогликемии и в постгипогликемическом периоде естественным становится вопрос о том, являются ли выявленные изменения специфичными только для ткани мозга или они есть отражение общей биорадикальной тенденции, складывающейся в организме. Такая постановка вопроса, очевидно правомерна, поскольку тяжелая гипогликемия, вызываемая экзогенным инсулином и ограничивающая энергетические ресурсы, предопределяет общую метаболическую перестройку во всех органах и тканях.

Для оценки состояния общего биорадикального статуса в тех же условиях экспериментов нами было предпринято хемилюминисцентное исследование сыворотки крови животных с целью определения содержания в ней гидроперекисей липидов и состояния ее общей антиоксидантной емкости (таблица 13).

Таблица 13. Содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ), общая антиоксидантная емкость сыворотки крови (АОЕ) различных групп экспериментальных животных (отн.ед.).

	Контроль n=8	Судорожное состояние n=8	Купирование глюкозой		Купирование глутаматом	
			Через 1 час n=8	Через 1 сутки n=8	Через 1 час n=8	Через 1 час n=8
ГПЛ	88,6±8,2	85,2±4,6	81±4,5	87±4,2	78±5,4	86±2,5
АОЕ	12,7±3,32	18,1±4,28	15,6±2,9	18,2±2,9	17,2±3,49	17,8±3,03

Проведенное исследование показало, что тяжелая гипогликемия не приводит к увеличению содержания гидроперекисей липидов в сыворотке крови. Напротив, была отмечена слабо выраженная тенденция к снижению этого параметра. После же купирования судорожного состояния обоими способами эта тенденция к снижению содержания гидроперекисей в ближайший восстановительный период становилась более существенной, что, однако, не носило статистически достоверного характера.

Антиоксидантная емкость сыворотки крови у этих групп экспериментальных животных, напротив, имела некоторую тенденцию к увеличению. Спустя сутки после купирования судорог концентрация гидроперекисей липидов в сыворотке крови возвращалась к контрольным значениям, тогда как ее антиоксидантная емкость так и оставалась несколько повышенной. Выявленные незначительные изменения не получили статистического подтверждения. Это позволяет сделать вывод о том, что однократная гипогликемическая кома в исследованные временные сроки, несмотря на общую метаболическую перестройку в организме, не отражается на его общем биорадикальном статусе. Интенсификация же свободнорадикальных реакций в митохондриях головного мозга при гипогликемических состояниях в конечном итоге есть результат, по-видимому, его специфических метаболических особенностей,

минимизирующих возможность использования других, нежели глюкоза, энергетических субстратов, таких как жирные кислоты, ацетоновые тела.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема гипогликемического состояния чрезвычайно важна, как в сугубо медицинском аспекте, так и в общебиологическом плане. Именно поэтому изучению состояния метаболизма в нервной ткани при гипогликемии посвящено огромное количество научных работ. Снижение поступления глюкозы, основного энергетического субстрата, в головной мозг неизбежно вызывает в его ткани каскад метаболических перестроек, носящих на начальных этапах, несомненно, адаптационный характер и направленных на поддержание энергетического статуса мозга в новых условиях.

Любая адаптационная метаболическая перестройка несет в себе негативные побочные эффекты. Естественно, что по мере исчерпания адаптационных возможностей параллельно происходит как бы суммирование этих негативных моментов, в результате чего клетка приобретает качественно новое и при том сугубо патологическое состояние, неизбежным итогом которого является не только утрата клеткой в той или иной степени ее функций, но даже ее гибель. Все это является общебиологической закономерностью. Однако, в случае инсулининдуцируемой гипогликемии адаптационная метаболическая перестройка, идущая в тканях, осложняется анаболическими эффектами самого гормона, требующими дополнительных энергетических и субстратных затрат. Ведь не случайно, что выброс инсулина в кровь β -клетками поджелудочной железы не контролируется нервной системой и происходит только в ответ на увеличение уровня глюкозы в крови. Природа предусмотрела, чтобы анаболические эффекты данного гормона реализовывались только тогда, когда клетки органов и тканей имеют возможность дополнительно получать гексозы из сосудистого русла.

Как известно, на начальном этапе гипогликемии потребление кислорода мозгом не уменьшается параллельно тому, как падает

поступление глюкозы из сосудистого русла в его ткань и скорость ее катаболизма. Это говорит о том, что мозг перестраивается на утилизацию других эндогенных энергетических субстратов: метаболитов гликолиза, цикла Кребса, пептидов и аминокислот.

Постепенное ухудшение энергетического статуса мозга, приводящее к развитию коматозного состояния, при довольно длительном сохранении исходного уровня потребления кислорода может указывать либо на увеличение потребности его ткани в энергии (например, для реализации тех же анаболических эффектов экзогенно введенного инсулина в случае инсулининдуцированной гипогликемии), либо на снижение энергоэффективности работы дыхательных цепей митохондрий, т.е. на разобщение окисления и фосфорилирования. Такие изменения в работе дыхательных цепей митохондрий мозга на поздних этапах тяжелой гипогликемии (30-60 минут после полной утраты спонтанной энцефалографической активности) были доказаны в обстоятельных исследованиях Agardh et al. еще в 1981 году. Однако, принципиально важно, что ухудшение работы дыхательных цепей митохондрий носило необратимый характер даже в восстановительном периоде, т.е. после купирования гипогликемической комы введением глюкозы. В этой связи возникает много вопросов.

На каком этапе развития гипогликемического коматозного состояния возникают изменения в работе дыхательных цепей митохондрий, какого характера, и почему несмотря на выход из гипогликемической комы введением глюкозы и восстановление основных жизненных функций выраженные изменения в энергетическом обмене сохраняются весьма долго? Какую роль в этом может играть состояние процессов липопероксидации в этих органеллах, данные о которых столь не однозначны в научной литературе? Почему можно купировать гипогликемическую кому введением глутамата натрия в сочетании с

вдыханием воздуха с добавлением CO_2 при сохраняющемся предельно низком уровне глюкозы в крови? Если глутамат можно считать альтернативным энергетическим субстратом для ткани мозга, то какова роль при этом CO_2 – естественного неорганического метаболита? Множество вопросов, на которые пока нет однозначных ответов, несмотря на столь обширную научную литературу, краткий обзор которой предоставлен в соответствующей главе

Вопросы всегда стимулируют научную мысль. Отсутствие же на них ответов не только затрагивает понимание глубинных основ сущности метаболических перестроек в измененных тканевых условиях, но и остается неутешительным для практикующих врачей.

В связи с вышеизложенным, изучение функционального состояния митохондрий мозга и их антиоксидантных возможностей при гипогликемической коме, особенно на ранних ее этапах, а также в различные сроки (часы, сутки) восстановительного периода представляет значительный научный интерес прежде всего с точки зрения углубления и конкретизации существующих представлений о динамике развития этого специфического метаболического стресса. Такого рода научные данные важны также и в плане понимания возможного вклада биоэнергетического статуса этих органелл в развитие в последующем постгликемических нейродегенеративных процессов в ткани мозга. Все это касается не только купирования комы глюкозой, но и другим альтернативным субстратом – глутаматом, т.е. способом предложенным и апробированным в условиях клиники весьма давно, но не изученным до сих пор.

Сказанное и явилось предпосылкой к проведению предпринятого исследования. Было изучено состояние окисления и фосфорилирования в митохондриях, выделенных из ткани мозга как здоровых животных (контроль), так и крыс с инсулин-индуцированной гипогликемической комой на высоте судорожного состояния, а также спустя один час, либо

сутки, после ее купирования как классическим способом – т.е. глюкозой, так и глутаматом с вдыханием гиперкапнической газовой смеси (воздух + 7% CO₂). Мы отказались от забоя животных через равные промежутки времени после введения инсулина, поскольку, по нашему мнению, судорожному состоянию должен соответствовать достаточно однотипный метаболический статус нервной ткани в меньшей степени зависящий от их индивидуальных особенностей. Учитывая противоречивость данных литературы о состоянии липопероксидации, мы исследовали в тех же условиях экспериментов интенсивность перекисных процессов, как в организме в целом (в сыворотке крови), так и в мембранах митохондрий.

Проведенными исследованиями было установлено, что в митохондриях ткани мозга животных уже на этапе судорожного состояния инсулин-индуцированной комы выявляются изменения, свидетельствующие о повышении их дыхательной и энергопреобразующей способности. Это выражалось (при некоторых различиях в глутамат- и сукцинатзависимом дыхании митохондрий) в более активном поглощении ими кислорода в исходном состоянии, в большей чувствительности к АДФ-стимуляции, в более высоком потреблении АДФ в единицу времени, некотором возрастании эффективности окисления субстратов, увеличении дыхательного контроля.

Спустя 1 час после купирования гипогликемических судорог введением глюкозы и нормализации уровня глюкозы в крови функциональные показатели митохондрий мозга почти не изменялись, особенно при сукцинатзависимом дыхании: они так же активно поглощали кислород в состоянии V₃ (АДФ стимуляция), обладали высокой скоростью поглощения АДФ в единицу времени, эффективно удерживали свой энергетически потенциал. Примечательно, что повышенная дыхательная активность митохондрий мозга выявлялась и спустя сутки после

купирования шока глюкозой и последующего пребывания животного в условиях вивария.

Изменения в окислительной и фосфорилирующей способности митохондрий мозга при гипогликемическом судорожном синдроме, в первом приближении, можно рассматривать с позиции адаптации этих органелл к условиям нарастающего дефицита энергетических субстратов. Однако, по нашему мнению, выявленные изменения скорее являются результатом геномных эффектов самого вводимого инсулина. Вполне вероятно, что проникая в ткани мозга, возможность чего на основании данных литературы была обоснована выше, и, воздействуя на собственные рецепторные структуры нейронов, инсулин приводит к экспрессии генов, кодирующих митохондриальные белки, стимулируя их синтез. Это в конечном итоге, по-видимому, и приводит к повышению функциональной способности митохондрий, которая сохраняется, как показали наши исследования, по крайней мере, в течение суток. Время в 3-4 часа от момента введения инсулина до развития судорожного состояния, очевидно, являлось достаточным для проявления указанных геномных эффектов.

Данные эффекты инсулина, при условии его адекватной продукции, являются целесообразными при гипергликемии, поскольку способствуют быстрой утилизации излишков гексоз. Однако, в условиях нормогликемии и больших дозах инсулина, его геномные эффекты приобретают негативный характер, требуя для анаболических целей дополнительных энергетических и субстратных ресурсов, которыми ткани в достаточных количествах не располагают. Вместе с тем очевидно, что повышенная функциональная способность митохондрий, индуцированная инсулином, может вносить свой значительный вклад в тот хорошо известный магический эффект по быстрому снятию судорожного состояния и выходу из гипогликемической комы вслед за внутривенным введением глюкозы.

Как и в случае с глюкозой, купирование гипогликемического шока альтернативным способом, т.е. введением глутамата натрия с последующим вдыханием гиперкапнической воздушной газовой смеси также выводило животных из судорожного состояния и вело к восстановлению утраченных рефлексов. Однако, если объективное улучшение состояния животных при введении глюкозы происходило на фоне восстановления практически исходного уровня ее содержания в крови, то при применении глутамата в сочетании с CO_2 это улучшение состояния отмечалось при все той же предельно низкой концентрации глюкозы в крови (менее 1 ммоль/л).

Очевидно, что независимо от способов купирования шока, улучшение состояния животных может быть прежде всего результатом восстановления биоэнергетического статуса мозга. Купирующий шок эффект глюкозы, как основного энергетического субстрата мозга, предсказуем. Вступая в катаболические процессы, она в должной мере обеспечивает восстановленными коферментами, как дыхательные цепи митохондрий, так и реакции биосинтетического характера. Что же касается глутамата, то будучи альтернативным субстратом для ткани мозга, через реакцию трансаминирования с оксалоацетатом, превращаясь в α -кетоглутарат, он также может способствовать восстановлению его энергетического статуса. При этом цикл Кребса начинает функционировать в усеченном виде, нарабатывая в качестве как бы побочного продукта аспартат. Не последнюю роль в эффектах глутамата может также играть, как его способность посредством амидирования связывать аммиак, лавинообразное образование которого имеет место при судорожных состояниях, так и использовании данной аминокислоты для восполнения уровня биологически активных пептидов, богатых глутаматом. Известно, что уровень таких пептидов в ткани мозга существенно падает при гипогликемической коме.

Характерно, что при качественно одинаковых внешних эффектах купирования судорожного состояния, изменения, происходящие в дыхательных цепях митохондрий под влиянием купирующих средств, существенно отличались.

В отличие от глюкозы, купирование судорог глутаматом с CO_2 уже через 1 час характеризовалось подавлением повышенной дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий и возвратом их параметров к по существу контрольным значениям.

Представляется маловероятным, чтобы глутамат в сочетании с CO_2 каким-то образом мог бы нивелировать геномные эффекты инсулина. Очевидно, что при данном способе купирования гипогликемических судорог в большей степени, чем под влиянием купирующего эффекта глюкозы, на работу дыхательной цепи стали оказывать влияние иные факторы, негативно воздействующие на их мембранные структуры.

Максимально неблагоприятное воздействие этих факторов проявлялось спустя сутки после купирования судорожного состояния, причем независимо от способа купирования. На фоне повышенной дыхательной активности митохондрий это выражалось в высокой чувствительности их дыхательных цепей к разобщающему действию динитрофенола, в снижении энергоэффективности окисления субстратов, в падении способности органелл к удержанию своего энергетического потенциала, в явном превалировании коэффициента усиления над дыхательным контролем.

Известными причинами изменений в функциональной активности этих органелл могут быть изменение проницаемости их мембран для протонов и других заряженных частиц, перегруппировка структурных мембранных липопротеидов. Такого рода изменения во многом могут зависеть от состояния перекисных процессов в этих субклеточных структурах.

Хемилюминисцентное исследование сыворотки крови показало, что однократная гипогликемическая кома как до, так и после ее купирования не отражается на общем биорадикальном статусе организма в целом. Иные же результаты были получены при исследовании как липидных экстрактов, так и самой суспензии митохондриальных мембран, выделенных из ткани мозга экспериментальных животных.

Установленный нами факт повышения концентрации в этих биологических объектах таких первичных продуктов ПОЛ как гидроперекисей, кетодиенов и кетотриенов на фоне практически неизменной исходной концентрации малонового диальдегида, позволяют говорить об интенсификации процессов липопероксидации уже в начале восстановительного периода, особенно при купировании судорожного состояния глутаматом в сочетании с CO_2 .

Восстановление жизненно важных функций при выходе из судорожного состояния и перевод животных на обычный рацион питания не останавливает процесса избыточной липопероксидации и спустя одни сутки.

Вместе с тем, хемилюминисцентное исследование показало, что инсулин-индуцированное гипогликемическое состояние в указанные временные сроки все же позволяли митохондриям мозга сохранять свои антиоксидантные возможности. Подтверждением этому является и факт сохранения исходного уровня восстановленного глутатиона, как важнейшего компонента антиоксидантной системы.

Очевидно, что накопление начальных продуктов избыточной липопероксидации в мембранах митохондрий в условиях тяжелой инсулиновой гипогликемии, несмотря на сохраняющуюся возможность этих органелл не допускать развития каскада цепных окислительных реакций, может быть причиной выявленных нами негативных изменений в

их электрон-транспортных цепях, накладывающихся на адаптивные процессы в этих органеллах.

Принимая во внимание исключительную морфологическую, функциональную и метаболическую гетерогенность ткани головного мозга, можно полагать, что результаты наших исследований, полученные на интегральной совокупности митохондрий, применительно к отдельным его структурам, могут носить и более выраженный деструктивный характер и быть причиной повреждения нейронов даже в условиях однократной тяжелой гипогликемии. Вполне вероятно, что повторные гипогликемические состояния, приводя к интеграции негативных изменений в митохондриальных мембранах, могут вносить существенный вклад в развитие в последующем энцефалопатических состояний.

ВЫВОДЫ

1. Судорожный этап инсулининдуцированной гипогликемической комы характеризуется повышением дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий ткани головного мозга.
2. Купирование судорожного состояния животных введением глюкозы даже спустя сутки не приводит к возврату показателей дыхательной и фосфорилирующей активности митохондрий мозга к нормальным значениям, при этом глутаматзависимое дыхание митохондрий, в отличие от сукцинатзависимого, энергетически становится менее эффективным.
3. Эффект купирования судорожного состояния глутаматом натрия в сочетании с углекислым газом, в отличие от классического купирования глюкозой, в одночасовой перспективе, нивелирует изменения в дыхательных цепях митохондрий мозга, индуцированные инсулином, что сочетается со снижением энергоэффективности их работы.
4. Несмотря на принципиальные различия в способах купирования судорожного состояния, в обоих случаях спустя сутки функциональное состояние митохондрий оказывается существенно измененным. Повышение чувствительности их дыхательных цепей к разобщающему действию динитрофенола, снижение энергоэффективности их работы, превалирование коэффициента усиления над дыхательным контролем, снижение способности к удержанию своего энергетического потенциала свидетельствует о постепенно наступающих неблагоприятных изменениях в митохондриальных мембранах.
5. Уже с начала восстановительного периода в митохондриальных мембранах интенсифицируются процессы липопероксидации, о чем свидетельствует увеличение содержания в них таких начальных продуктов ПОЛ, как предобразованных гидроперекисей, кетодиенов, кетотриенов, особенно при купировании судорог глутаматом в сочетании с CO_2 .

6. Антиоксидантные возможности митохондрий мозга, если судить по их антиоксидантной емкости, уровню восстановленного глутатиона на фоне удержания исходных концентраций малонового диальдегида, остаются не исчерпанными, что позволяет им терминировать ПОЛ на уровне первичных продуктов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин, М.И. Сахарный диабет / М.И. Балаболкин. - М.: Медицина, 1994. – 384 с.
2. Болдырев, А.А. Парадоксы окислительного метаболизма мозга / А.А. Болдырев // Биохимия. - 1995. - Т. 60, № 9. - С. 1536-1542
3. Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты вчера, сегодня, завтра / Е.Б. Бурлакова // Сборник трудов V Международн. конфер. «Биоантиоксиданты». – М., 1998. - С. 3–6
4. Вангейм, К.А. О влиянии глютаминовой кислоты на судороги, осложняющие инсулиновую гипогликемию / К. А. Вангейм, Ю. Ф. Двалидзе, Г. А. Пиленкова, Н. А. Удинцев // Сов. Мед-на. – 1962. - № 11. – С. 89-94
5. Владимиров, Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологического процесса / Ю.А. Владимиров // Патол. физиол. – 1989. – № 4. – С. 7–19.
6. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров// Сорос. образоват. журнал. – 2000. – С. 13–19.
7. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А.Владимиров, А.И.Арчаков. - М.: Наука, 1972. – 252 с.
8. Владимиров, Ю.А. Оценка антиокислительной и антирадикальной активности веществ и биологических объектов с помощью железоинициированной хемилюминисценции / Ю.А. Владимиров, М.П Шерстнев, Т.К. Азимбаев // Биофизика. – 1992. – Вып. 6, № 37. – С. 1041–1047.
9. Генес, С.Н. Гипогликемия. Гипогликемический симптомокомплекс / С.Н. Генес - М.: Медицина, 1970. - 236с.
10. Голубев, А. Г. Смерть нейрона / А.Г. Голубев // Международн. мед. обзор. - 1994. - Т.2, №2. - С.134-140

11. Дамбинова, С.А. Нейрорецепторы глутамата / С. А. Дамбинова. - Л.: Наука, 1989. - 114 с.
12. Дедов, И.И. Эндокринология / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко, В.В. Фадеев. - М., Медицина.-2000.- С.423-515.
13. Деменьтьева, И.И. Оценка реперфузионного повреждения миокарда свободными радикалами кислорода у пациентов с ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения / И.И. Деменьтьева, В.И. Мильчаков, С.Л. Дземешкевич // Анес. и реанимтол. – 1993. – № 3. – С. 14–18.
14. Журавлёв, А.И. Развитие идей Б.Н.Тарусова о роли цепных процессов в биологии. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии / А.И. Журавлев – М.: Наука, 1982. – С. 3–37.
15. Зенков, Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Успехи соврем. Биологии. – 1993. - Т. 113, вып. 3. – С. 286–296.
16. Зинчук В.В., Глебов А.Н., Мальцев А.Н. Механизмы поддержания прооксидантно–оксидантного состояния при окислительном стрессе. // Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека». – Смоленск, Россия, 19–22 сентября 2001., Сборник тезисов. - С. 32–33.
17. Ивков, И.Н. Изучение функционального состояния митохондрий печени нормальных крыс / И.Н. Ивков, Л.Ф. Панченко // Структура и функции биологических мембран / Тр. 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова. – М., 1971. – С. 94-103
18. Касаткина, Э.П. Сахарный диабет у детей и подростков / Э.П. Касаткина. - М.: Медицина, 1996. - 240с.
19. Коган, А.Х. Свойство углекислого газа ингибировать генерацию супероксидного анион-радикала клетками и его биомедицинское значение / А. Х. Коган, С. В. Грачев, С. В. Елисеева, С. Болевич // Вопр. мед. химии. – 1996 - Т. 42, №3. - С. 193-202

20. Кожевников, Ю.Н. О перекисном окислении липидов в норме и патологии / Ю.Н. Кожевников // *Вопр. мед. химии.* – 1985. – № 5. – С. 2–7.
21. Козлов, Н. Б. Об участии аммиака в развитии инсулинового шока / Н.Б. Козлов // *Вопр. мед. химии.* - 1960. – т.6, №4. - С. 396.
22. Козлов, Н.Б. Влияние перегревания и защитного действия ионола на окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга крыс / Н.Б. Козлов, А.Н. Шаров // *Нейрохимия.* - 1982. - т. 1. - С.269-274.
23. Козлов, Ю.П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах / Ю.П. Козлов. – Изд. Моск. Университета. 1973. – 268 с.
24. Кондрашева, М.Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани / М.Н. Кондрашева// *Биохимия.* – 1991. - т. 56, №3. – С. 388-402
25. Львовская, Е.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов / Е.И.Львовская, И.А. Волчегорский, С.Е. Шемяков, Р.И. Лифшиц // *Вопр. мед. химии.* – 1991. – №4. – С. 92–94.
26. Мартинсон, Э.Э. О взаимоотношении макроструктуры белков и обмена веществ в головном мозге в связи с его функцией / Э.Э. Мартинсон, Л.Я. Тяхепыльд. - *Проблемы нейрохимии.* – Изд. Наука М.-Л., 1966. – 246 с.
27. Подопригорова, В.Г. Оксидативный стресс и язвенная болезнь / В.Г. Подопригорова. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2004. – 172 с.
28. Прихожан, В.М. Поражения нервной системы при сахарном диабете / В.М. Прихожан. - М.: Медицина, 1981. - 296 с.
29. Скулачев, В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло / В.П. Скулачев // *Соросовский образоват. журн.* – 1996. - № 3. – С. 4–10

30. Скулачев, В.П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи / В.П. Скулачев. - М.: Изд-во АН СССР, 1962. - 156 с.
31. Сутковой, Д.А. Влияние инсулина на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени и сердца адреналэктомированных крыс / Д.А. Сутковой, А.Н. Алферов, В.Н. Летов // Украинский биохимический журнал. - 1978. - т.50. - №3. - С. 60 - 63
32. Телушкин, П.К. Интенсивность процессов пероксидного окисления, активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ и протеаз в мозге крыс при многократном воздействии инсулина / П.К. Телушкин // Пробл. эндокринологии. - 1998. - т. 44, № 3. - С. 320-323
33. Телушкин, П.К. Гипогликемия и мозг: метаболизм и механизмы повреждения нейронов / П. К. Телушкин, А.Д. Ноздрачев // Успехи физиол. наук. - 1999. - Т. 30, № 4. - С. 14-27
34. Телушкин, П.К. Инсулиновая гипогликемия и метаболизм мозга: автореф. дисс. ...докт. биол. наук: 03.00.13 / Телушкин Павел Константинович. - СПб, 2009. - 33 с.
35. Телушкин, П.К. Активность ферментов энергетического обмена в мозге крыс при многократном воздействии гипогликемических доз инсулина / П.К. Телушкин, А.Д. Ноздрачев, С.П. Филиппов // Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии. - СПб.: Издательство СПбГМУ, 1998. - Т.2. - С. 320-323
36. Телушкин, П.К. Интенсивность гликолиза и активность ферментов энергетического обмена в мозге крыс при многократном воздействии гипогликемических доз инсулина / П.К. Телушкин, П.П. Потапов // Пробл. эндокринологии. - 1994. - Т. 40, №5. - С.53-54
37. Телушкин, П.К. Активность НАДФ – зависимых дегидрогеназ и уровень восстановленности пиридиновых нуклеотидов в мозге крыс при инсулиновой гипогликемии и в восстановительном периоде / П.К. Телушкин, П.П. Потапов // Вопр. мед. химии. - 1995. - Т. 41, №3. - С. 26-28

38. Телушкин, П.К. Взаимодействие активных форм кислорода и азота в развитии патологии у человека / П.К. Телушкин, П.П. Потапов // Новости медицины и фармакологии Яривест медикал. – 1997 - №2. - С. 33-35
39. Телушкин, П.К. Активность ферментов и содержание субстратов цикла Кребса мозга крыс при инсулиновой гипогликемии и в восстановительном периоде / П.К. Телушкин, С.П. Филиппов // Вопр. мед. химии. - 1988. - Т. 44, №3. - С. 94 – 96
40. Телушкин, П.К. Активность ферментов и содержание субстратов ГАМК-шунта в мозге крыс при многократном воздействии гипогликемических доз инсулина / П.К. Телушкин, Т.Е. Шидловская // Вопр. мед. химии. - 1995. - Т. 42, №4. - С. 306-308
41. Хазанов, В.А. Влияние силимарина, янтарной кислоты и их комбинации на биоэнергетику головного мозга при экспериментальной энцефалопатии / В.А. Хазанов, А.И. Венгеровский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – № 12. – С. 657–660.
42. Чаргейшвили, Ю.П. Взаимоотношение гипогликемии и состояния нервной системы в генезе комы при инсулинотерапии шизофрении: автореф дисс...канд. мед.наук/ Чаргейшвили Ю.П. – Днепропетровск, 1963. – 24 с.
43. Шерстнев, М.П. Методика регистрации активированной родамином Ж хемилюминисценции плазмы и сыворотки крови в присутствии ионов двухвалентного железа / М.П. Шерстнев // Вопр. хемилюминисценции. – 1990. – № 1. – С. 19–20.
44. Шестакова, С.А. Оксидантный статус ткани головного мозга крыс при острой инсулиновой гипогликемии и после ее купирования / С.А. Шестакова, С.А. Александрова, И.В. Александров // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова – 2009. - том 16, №.1. - С. 25-28

45. Abood, L.G. Breakdown of proteins and lipids during glucose-free perfusion of the cat brain / L.G. Abood, A. Geider // *Am. J. Physiol.* – 1955. - № 182. – P. 557-560
46. Adam-Vizi, V. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts / V. Adam-Vizi, A.A. Starkov // *J. Alzheimers Dis.* - 2010. - №20, Suppl. 2 – P. 413-426.
47. Agadarh, C.-D. Cerebral metabolic changes in profound insulin-induced hypoglycemia and the recovery period following glucose administration / C.-D. Agadarh, J. Folbergrova, B.K. Siesjo // *J. Neurochem.* - 1978. - V. 31, № 5. - P. 1135-1142
48. Agadarh, C.-D. EEG and SER after hypoglycemic coma in the rat: correlation with cerebral metabolism / C.-D. Agadarh, I. Rosen, B.K. Siesjo // *Neurosci. Lett.* - 1979. - V. 13, №3. - P. 45.
49. Agadarh, C.-D. Hypoglycemic brain injury. I. Metabolic and light microscopic findings in rat cerebral cortex during profound insulin-induced hypoglycemia and the recovery period following glucose administration / C.-D. Agadarh, H. Kalimo, Y. Olsson, B.K. Siesjo // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. – 1980. - V.50, №1-2. - P. 31-41
50. Agadarh, C.-D. Hypoglycemic brain injury: Metabolic and structural findings in rat cerebellar cortex during profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration / C.-D. Agadarh, H. Kalimo, Y. Olsson, B.K. Siesjo // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1981 - № 1. – P. 71-84.
51. Agadarh, C.-D. Endogenous substrate utilized by rat brain in severe insulin-induced hypoglycemia / C.-D. Agardh, A.G. Chapman, B. Nilsson, B.K. Siesjo // *J. Neurochem.* - 1981 - № 36. – P. 490-500
52. Agadarh, C.-D. Influence of severe hypoglycemia on mitochondrial and plasma membrane function in rat brain / C.-D. Agadarh, A.G. Chapman, D. Pelligrino, B.K. Siesjo // *J. Neurochem.* - 1982. - V. 38, №3. - P. 662-668.

53. Alford S., Collingrige G.L. From excitatory amino acid receptors to long-term potentiation: an insight into the role of Ca²⁺ // Excitatory amino acids and second messenger system / Eds. Teichberg V.I. and Turski L. Berlin: Springer Verlag, 1992. V. 3. P. 43-53
54. Amiel, S.A. Hypoglycemia in insulin-dependent diabetes mellitus: facts for 1990s / S.A. Amiel, A. Maran // Diabete Metab. - 1993. - V.19, №4. - P. 332-339.
55. Aral, Y.Z. Role of excitatory amino acids in neonatal hypoglycemia / Y.Z. Aral, K. Gücüyener, Y. Atalay, A. Hasanoğlu et al // Acta Paediatr. Jpn. - 1998 – V.40, №4. – P. 303-306.
56. Avogadro, A. Substrate availability other than glucose in the brain during euglycemia and insulin-induced hypoglycemia in dogs. Alternative substrates other than glucose could be used by the brain / A. Avogadro, R. Nosadini, A. Doria // Metabolism. - 1990. - V. 39. №1. - P.46-50
57. Auer, R. N. Hypoglycemic brain damage / R.N. Auer // Stroke. - 1986. - V.17, №4. - P. 699-708
58. Auer, R. N. Hypoglycemic brain damage / R.N. Auer // Metabolic brain disease – 2004. – V.19, № 3-4. – P. 169-175.
59. Auer, R.N. Neuropathologic findings in three cases of profound hypoglycemia / R.N. Auer, J. Hugh, E. Cosgrove, B. Curry // Clin. Neuropathol. - 1989. - № 8. – P. 63-68.
60. Auer, R.N. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light and electron microscopic findings in the rat cerebral cortex / R.N. Auer, H. Kalimo, Y. Olsson, B.K. Siesjö // Acta Neuropathol. (Berl.) – 1985. - V. 67, № 1-2. - P.13-24.
61. Auer, R.N. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light and electron microscopic findings in the rat hippocampus / R.N. Auer, H. Kalimo, Y. Olsson, B.K. Siesjö // Acta Neuropathol (Berl.). – 1985. - V. 67, № 1-2. - P.25-36

62. Auer, R.N. The dentate gyrus in hypoglycemia. Pathology implicating excitotoxin-mediated neuronal necrosis / R.N. Auer, H. Kalimo, Y. Olsson, T. Wieloch // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. – 1985. - V. 67, № 3-4. - P.279-288.
63. Auer, R.N. Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: a quantitative study / R.N. Auer, Y. Olsson, B.K. Siesjö // *Diabetes*. - 1984. - V. 33, № 5. - P.1090-1098.
64. Auer, R.N. Hypoglycaemic brain neurochemistry and neuropathology / R.N. Auer, B.K. Siesjö // *Baillieres. Clin. Endocrinol. Matab.* - 1993. - V. 7, № 3. - P. 661 – 625
65. Auer, R.N. The distribution of hypoglycemic brain damage / R. N. Auer, T. Wieloch, Y. Olsson, B.K. Siesjö // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. – 1984. - V.64, №3. - P. 177-191.
66. Ballesteros, J.R. Alterations in Cerebral Mitochondria during Acute Hypoglycemia / J.R. Ballesteros, O.P. Mishra, J.E. McGowan // *Biol. Neonate*. -2003. – V. 84, № 159. – P. 163
67. Baker, J.E. Detection of free radicals by direct ESR during myocardial cell injury – a critical evaluation / J.E. Baker, C.C. Felix, B. Kalyanaraman // *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*. – N.Y.: Liss, 1988. – P. 343–351.
68. Balsells, M. Insulin antibody response to a short course of human insulin therapy in women with gestational diabetes / M. Balsells, R. Corcoy, D. Maurico // *Diabetes Care*. - 1997. - Vol.20. – P.1172-1175.
69. Barja, G. Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? / G. Barja // *Free Radic. Res. Commun.* – 1993. - Vol. 18. – P. 63–70.
70. Bargnoux, A.S. Carbonyl stress and oxidatively modified proteins in chronic renal failure. Groupe de travail de la SFBC: Biologie des fonctions renales et de l'insuffisance rénale / A.S. Bargnoux, M. Morena, S. Badiou, A.M. Dupuy et al // *Ann Biol Clin (Paris)*. – 2009. – V. 67, № 2. – P. 153-158.

71. Baskin, D.G. Quantitative autoradiographic evidence for insulin receptors in the choroid plexus of the rat brain / D.G. Baskin, B. Brewitt, D.A. Davidson // *Diabetes*. – 1986. – V. 35, №2 - P.246 – 249
72. Baskin, D.G. Immunocytochemical detection of insulin – receptor substrate – 1 (IRS - 1) in rat brain – colocalisation with phosphotyrosine / D.G. Baskin, A.T. Sipols, M.W. Schwartz, M.F. White // *Regulatory peptides*, 1993, 1ss 1-2, P. 226 -257
73. Beal, M.F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? / M.F. Beal // *Ann. Neurol.* – 1992. - V. 31. - P. 119-130
74. Beal, M.F. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic disease / M.F. Beal // *FASEB J.* - 1992. - V. 6, № 15. - P.3338-3344
75. Bell, G.I. Structure and function of mammalian facilitative glucose transporters / G.I. Bell, C.F. Burant, J. Takeda, G.W. Gould // *J. Biol. Chem.* – 1993. – № 268. - 19161 – 19164
76. Bengtsson, F. Extracellular pH in the rat brain during hypoglycemic coma and recovery / F. Bengtsson, F. Boris-Möller, A.J. Hansen, B.K. Siesjö // *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. – 1990. – V. 10, № 2. – P. 262-269.
77. Boes, M. Degradation of membrane phospholipids by direct nucleophilic action of superoxide anion / M. Boes, C. Debye, J. Pincemail // *Free Radicals, Lipoproteins and Membrane Lipids*.– N.Y.: Plenum Press, 1989. – P. 105–113.
78. Boirie, Y. Insulin regulation of mitochondrial proteins and oxidative phosphorylation in human muscle / Y. Boirie // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2003. – V.14, № 9. – P. 393-394.
79. Boirie, Y. Tissue-specific regulation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin / Y. Boirie, K. R. Short, B. Ahlman, M. Charlton et al // *Diabetes*. – 2001. – V. 50. – P. 2652–2658.

80. Borg, M. Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats / M. Borg, R. Sherwin, W. Borg // *J. Clin. Invest.* - 1997. - Vol. 99. - P. 361-367.
81. Borg, W. Local ventromedial hypothalamus glycopenia triggers counterregulatory hormone release / W. Borg, R. Sherwin, M. During // *Diabetes.* - 1995. - Vol. 44. - P. 180-187.
82. Brady, N.R. A Wave of Reactive Oxygen Species (ROS)-Induced ROS Release in a Sea of Excitable Mitochondria / N.R. Brady, A. Hamacher-Brady, H.V. Westerhoff, R.A. Gottlieb // *Antiox. Redox Signal.* - 2006. - V. 8, № 9-10. - P. 1651 - 1665
83. Brierley, J.B. The nature and time course of the neuronal alterations resulting from oligemia and hypoglycemia in the brain of *Macaca mulatta* / J.B. Brierley, A.W. Brown, B.S. Meldrum // *Brain Res.* - 1971. - № 25. - P. 483-499.
84. Brennan, A.M. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation / A.M. Brennan, S.W. Suh, S.J. Won, P. Narasimhan et al // *Nat. Neurosci.* - 2009 V. 12, № 7. P. 857-863.
85. Brunk, U.T. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis / U.T. Brunk, C.B. Jones, R.S. Sohal // *Mutat. Res.* - 1992. - Vol. 275. - P. 395-403.
86. Bulger, E.M. Antioxidants in critical illness / E.M. Bulger, R.V. Maier // *Arch. Surg.* - 2001. - Vol. 136. - P. 1201-1207.
87. Cabrera, C. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure / C. Cabrera, D. Bohr // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1995. - Vol. 206. - P. 77-81.
88. Cadet, J.L. Free radicals and pathology of brain dopamine system / J.L. Cadet, C. Brannock // *Neurochem.Int.* - 1992. - V. 2, №2. - P. 229-232

89. Chance, B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization / B. Chance, G.R. Williams // *J. Biol. Chem.* – 1955. – V. 217, № 1. – P. 383-393
90. Chapman, A.G. Metabolism of purine and pyrimidine nucleotides during hypoglycemia and recovery / A.G. Chapman, E. Westerberg, B.K. Siesjo // *J. Neurochem.* - 1981. - V. 36, №1. - P. 179-185.
91. Chan, P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain / P.H. Chan // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2001. – V. 21, №2 – P.14
92. Chatterjea, E. Phosphorylation-state-dependent regulation of NMDA receptor short-term plasticity modifies hippocampal dendritic Ca²⁺ transients / D. Chatterjea, E. Hamid, J.P. Leonard, S. Alford // *J. Neurophysiol.* – 2010. – V. 104, № 4. – P.2203-2213.
93. Chénais, B. Impact of endogenous nitric oxide on microglial cell energy metabolism and labile iron pool / B. Chénais, H. Morjani, J.C. Drapier // *J. Neurochem.* – 2002. – V. 81, № 3. – P. 615-623.
94. Chinopoulos, C. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme / C. Chinopoulos, V. Adam-Vizi // *FEBS J.* – 2006. – V. 273, № 3. – P. 433 -450
95. Choi, I.Y. In vivo measurements of brain glucose transport using the reversible Michaelis-Menten model and simultaneous measurements of cerebral blood flow changes during hypoglycemia / I.Y. Choi , S.P. Lee, S.G. Kim, R. Gruetter // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2001. – № 21. – P. 653–663
96. Choudhary, P. Hypoglycaemia: current management and controversies / P. Choudhary, S.A. Amiel // *Postgrad Med. J.* – 2011. – V.87, (1026). – P. 298-306.
97. Cristol, J.P. Oxidative stress and lipid abnormalities in renal transplant recipients with or without chronic rejection / J.P. Cristol, C. Vela, M.F. Maggi et al. // *Transplantation.* – 1998. – Vol. 65. – P. 1322–1328.

98. Davis, J.M. Hypoglycemia and development changes in free amino acid of rat brain / J.M. Davis, W.A. Himwich, V.C. Pedersen // *J. Appl. Physiol.* – 1970. - № 29. – P. 219-222
99. Darley-Usmar, V. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance / V. Darley-Usmar, H. Wiseman, B. Halliwell // *FEBS Letters.* - 1995. - V. 369. - P. 131-135
100. DiRoocco, R.J. Measurement of cerebral glucose transport and metabolism during physiologic and pathologic states / R.J. DiRoocco // *Expl. Biol. Med.* - 1986. - V. 11, №1. - P. 70-121
101. Drapier, J. C. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in l-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells / J. C. Drapier, J.B. Hibbs JR. // *J. Immunol.* - 1988. - V.40, № 11. - P. 2829-2938
102. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge // *Physiol. Rev.* – 2002– Vol. 82. – P. 47–95.
103. Dykens, J.A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration / J.A. Dykens // *J. Neurochem.* – 1994. - № 63. – P. 584–591.
104. Ellman, G.L. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans / G.L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1958. – V.74. – P. 443-450.
105. Facci, L. Hypoglycemic neurotoxicity in vitro: involvement of excitatory amino acid receptors and attenuation by monosialoganglioside GM1 / L. Facci L, A. Leon, S. D. Skaper // *Neuroscience.* – 1990. – V.37, № 3. – P. 709-716.
106. Fanelli, C. Post-hypoglycemic hyperketonaemia does not contribute to brain metabolism during insulin-induced hypoglycaemia in humans / C.

- Fanelli, A. Di Vincenzo, F. Modarelli // *Diabetologia*. - 1993. - V. 36, № 11. - P. 1191-1197
107. Fanelli, C.G. Relative roles of insulin and hypoglycaemia on induction of neuroendocrine responses to, symptoms of, and deterioration of cognitive function in hypoglycaemia in male and female humans / C. G. Fanelli, S. Pampanelli, L. Epifano // *Diabetologia*. - 1994. - V. 37. - P. 797-802.
108. Feise, G. Effects of insulin hypoglycemia upon cerebral energy metabolism and EEG activity in the rat / G. Feise, K. Kogure, P. Scheinberg, O.M. Reinmuth // *Brain Res.* – 1977. - V.126, №2. - P. 263 – 280
109. Ferrand-Drake, M. Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intra-cellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia / M. Ferrand-Drake, C. Zhu, G. Gidö, A. Hansen et al. // *J. Neurochem.* – 2003. - № 85. – P. 1431–1442
110. Ferrendelli, J.A. Brain metabolism during hypoglycemia. Effect of insulin on regional central nervous system glucose and energy reserves in mice / J.A. Ferrendelli, M.M. Chang // *Arch. Neorol.* - 1973. - V. 28, №3. - P. 173 – 177
111. Fonnum, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain / F. Fonnum // *J Neurochem.* - 1984. - V. 42, №1. - P. 1-11
112. Ghajar, J.B.G. Regional acetylcholine hypoglycemia and recovery / J.B.G. Ghajar, G.E. Gibson, T.E. Duffy // *J. Neurochemistry.* – 1985. - № 44. P. 94-98
113. Gjedde, A. Autoradiographic determination of regional brain glucose content / A. Gjedde, N.H. Diemer // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 1983. - № 3. – P. 303-310
114. Gorell, J.M. Regional levels of glucose, amino acids, high energy phosphates, and cyclic nucleotides in the central nervous system during hypoglycemic stupor and behavioral recovery/ J.M. Gorell, P.H. Dolkhart, J.A. Ferrendelli // *J. Neurochem.* - 1976. - V. 27, №5. - P. 1043-1049.

115. Gorell, J.M. Levels of cerebral cortical glycolytic and citric acid cycle metabolites during hypoglycemic stupor and its reversal / J.M. Gorell, M.M. Law, O.H. Lowry, J.A. Ferrendelli // *J. Neurochem.* - 1977. - V. 29, №1. - P. 187-191.
116. Gundersen, V. Redistribution of Neuroactive Amino Acids in Hippocampus and Striatum During Hypoglycemia: A Quantitative Immunogold Study / V. Gundersen, F. Fonnum, O.P. Ottersen, J. Storm-Mathisen // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* - 2001. - № 21. - P. 41-51
117. Gupte, S.A. Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries / S.A. Gupte // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2005. - V. 288. - P. 13-21
118. Haces, M.L. Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions / M.L. Haces, K. Hernández-Fonseca, O.N. Medina-Campos, T. Montiel et al. // *Exp. Neurol.* - 2008. - V. 211, № 1. - P.85-96.
119. Hall, E.D. Hydroxyl radical production and lipid peroxidation parallels selective post-ischemic vulnerability in gerbil brain / E.D. Hall, J.M. Braugher, K.E. Pazara // *J. Neurosci. Res.* - 1993. - Vol. 34. - № 1. - P. 107-112.
120. Halliwell, B. Reactive oxygen species and central nervous system / B. Halliwell // *J. Neurochem.* - 1992. - V. 59, №5. - P. 1609-1623.
121. Halliwell, B. The antioxidants of human extracellular fluids / B. Halliwell, M. Vasil, M. Grootveld // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1990. - Vol. 280. - P. 1-8.
122. Hernández-Fonseca, K. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in

- cultured hippocampal neurons / K. Hernández-Fonseca, L. Massieu // *J. Neurosci Res.* – 2005. – V. 82. – P. 196–205
123. Hernández-Fonseca, K. Neuroprotective Role of Estradiol against Neuronal Death Induced by Glucose Deprivation in Cultured Rat Hippocampal Neurons / K. Hernández-Fonseca, L. Massieu, S. García de la Cadena, C. Guzmán et al. // *Neuroendocrinology.* – 2012. – V. 96, № 1. – P. 41-50.
124. Hernández-Fonseca, K. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons / K. Hernández-Fonseca, N. Cárdenas-Rodríguez, J. Pedraza-Chaverri, L. Massieu // *J. Neurosci Res.* – 2008. – V. 86, № 8. – P. 1768-1780.
125. Hill, B.G. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology / B.G. Hill, B.P. Dranka, S.M. Bailey, J.R. Lancaster et al. // *J. Biol. Chem.* - 2010. – V. 25, № 285(26). – P. 19699-19704
126. Hino, K. L-carnitine inhibits hypoglycemia-induced brain damage in the rat / K. Hino, M. Nishikawa, E. Sato, M. Inoue // *Brain Res.* – 2005. – V. 16, № 1053(1-2). P. 77-87.
127. Hinzen, D.H. Energist off wechesel und Funktion des Kaninchengehims wahrend Insulin hypoglykamie / D.H. Hinzen, U. Muller // *Pflugers Arch.* - 1971. - Bd. 322, №1. - S. 1-14
128. Honegger, P. Alteration of amino acid metabolism in neuronal aggregate cultures exposed to hypoglycaemic conditions / P. Honegger, O. Braissant, H. Henry // *J. Neurochem.* - 2002. - V. 81, № 6. - P. 1141–1151.
129. Ichord, R.N. MK801 decreases glutamate release and oxidative metabolism during hypoglycemic coma in piglets / R.N. Ichord, M.V. Johnston, R.J. Traystman // *Brain Res. Dev. Brain Res. (Netherlands).* – 2001. – V. 128, № 2. – P. 139-148.

130. Imai, T. Cerebral energy metabolism in insulin-induced hypoglycemia in newborn piglets: in vivo ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy / T. Imai, M. Kondo, K. Isobe // *Acta Paediatr. Jpn.* - 1996. - V.38, №4. - P. 343-347
131. Isaev, N. K. Cellular mechanisms of brain hypoglycemia / N. K. Isaev, E. V. Stel'mashuk, E. Belyaeva, D. B. Zorov // *Reception and Intracellular Signalization. Pushchino, 2005.* - P. 130-132.
132. Isaev, N. K. Cellular mechanisms of brain hypoglycemia / N. K. Isaev, E. V. Stel'mashuk, D. B. Zorov // *Biochem.* - 2007. - V. 72, № 5. - P. 586-595
133. Isaev, N. K. Glucose starvation stimulates Zn²⁺ toxicity in cultures of cerebellar granule neurons / N.K. Isaev, E.R. Lozier, S.V. Novikova, D.N. Silachev et al. // *Brain Res. Bull.* – 2012. – V. 87, № 1. – P. 80-84.
134. Isaev, N. K. Mitochondrial free radical production induced by glucose deprivation in cerebellar granule neurons / N.K. Isaev, E.V. Stelmashook, U. Dirnagl, E.Y. Plotnikov et al. // *Biochemistry (Mosc).* – 2008. – V. 73, № 2. – P.149-55.
135. Kalaria, R.N. The glucose transporter of the human brain and blood-brain barrier / R.N. Kalaria, S.A. Gravina, J.W. Schmidley, G. Perry et al. // *Ann Neurol.* – 1988. - № 24. – P. 757-764
136. Kalimo, H. Effect of severe hypoglycemia on the human brain / H. Kalimo, Y. Olsson // *Acta Neurol. Scand.* – 1980. – V. 62. – P. 345-356.
137. Kehrer, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease / J.P. Kehrer // *Crit. Rev. Toxicol.* – 1993. – Vol. 23. – P. 21–48.
138. King, P. The effect of intravenous lactate on cerebral function during hypoglycemia / P. King, H. Parking, I.A. Macdonald et al. // *Diabet Med.* - 1997. - V. 14, №1.- P.19-28
139. Knauff, H. G. On the amino acid components of brain proteins / H. G. Knauff, G. Mayer, D. Mark // *Zeitschrift für Physiolog. Chemie.* – 1961. – V.326. – P. 78-88

140. Kohler, E. Inhibition of NADP dependent oxidoreductases by the 6-aminonicotinamide analogue of NADP / E. Kohler, H. Barrach, D. Neubert // FEBS Lett. – 1970. - № 6. – P. 225–228
141. Lafon-Cazal, M. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity / M. Lafon-Cazal, S. Pietri, M. Culcasi, J. Bockaert // Nature. - 1993. - V. 364. - P. 535-537
142. Lardy, H.A. Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates / H.A. Lardy, H. Wellman // J. Biol. Chem. – 1952. – V. 195, №1. – P. 215-224
143. Lesnefsky, E.J. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure / E.J. Lesnefsky, S. Moghaddas, B. Tandler, J. Kerner et al. // J. Mol. Cell Cardiol. – 2001. – V. 33, № 6. – P. 1065-89.
144. Lewis, L.D. Changes in carbohydrates substrates, amino acids and ammonia in the brain during insulin-induced hypoglycemia / L.D. Lewis, B. Ljunggren, K. Norberg, B.K. Siesjo // J. Neurochem. - 1974. - V. 23, № 4. - P.659-671
145. Lewis, L.D. Cerebral energy state in insulin-induced hypoglycemia, related to blood glucose and to EEG / L.D. Lewis, B. Ljunggren, R.A. Ratcheson, B.K. Siesjo // J. Neurochem. - 1974. - V. 23, №4. - P. 673-679
146. Lindvall, O. Mechanisms of hypoglycemic brain damage. Evidence against a significant role of the noradrenergic locus coeruleus system / O. Lindvall, R.N. Auer, B.K. Siesjo // Exp. Brain Res. - 1988. - V.73, №. P. – P. 219-223
147. Liu, Y. Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells / Y. Liu, W. Liu, X. D. Song, J. Zuo // Mol. Cell. Biochem. – 2005. – V. 268. – P. 45-51

148. Liu, Y. Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line / Y. Liu, X.D. Song, W. Liu, T.Y. Zhang et al. // *J. Cell Mol. Med.*- 2003. – V. 7, № 1. – P. 49-56.
149. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V.193, № 1 – P. 265–275.
150. Lucas, D.R. The toxic activity of sodium-L-glutamate on the inner layers of the retina / D.R. Lucas, J.P. Newhouse // *Arch Opthamol.* – 1957. – V. 58. – P. 193-201.
151. Lund – Andersen, H. Transport of glucose from blood to brain / H. Lund-Andersen // *Physiol. Rev.* - 1979. – V. 59. – P. 305-302
152. Madl, J.E. Glutamate in synaptic terminals is reduced by lack of glucose but not hypoxia in rat hippocampal slices / J.E. Madl, S.M. Royer // *Neuroscience.* – 1999. - V. 94. – P. 417-430.
153. Maher, F. Glucose transporter isoforms in brain: absence of GLUT-3 from blood-brain barrier / F. Maher, S.J. Vanucci, I.A. Simpson // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 1993. - № 13. – P. 342-345
154. Mantych, G.J. Cellular localization and characterization of GLUT3 glucose transporter isoform in human brain / G.J. Mantych, D.E. James, H.D. Chang, S.U. Devaskar // *Endocrinology.* – 1992. – V. 131. – P. 1270-1278
155. Masters, B.A. Insulin receptors and insulin action in dissociated brain cells / B.A. Masters, J. Shemer, J.H. Judkins, M. Raizada // *Brain Res.* – 1987. – V. 417. - P. 247 -256
156. McGowan, J.E. Increased mitochondrial reactive oxygen species production in newborn brain during hypoglycemia / J.E. McGowan, L. Chen, D. Gao, M. Trush et al. // *Neurosci. Lett.* – 2006. – V. 399. – P. 111 – 114
157. McIlwain, H. Biochemistry and central nervous system / H. McIlwain, H.S. Bachelard. - Churchill Livingstone, Edinburg, London, 1971. - 346p.

158. Mellergard, P. Acid-base homeostasis in the mammalian brain / P. Mellergard // Lund, 1993 - P. 52-53
159. Monaghan, D. T. Diversity and organization of excitatory amino acid receptors in the CNS: excitatory amino acids and second messenger systems/ D. T. Monaghan, J.A. Beaton. - Eds. Teichberg V.I. and Turski L. Berlin: Springer Verlag., 1992. - V. 3. - P. 1-15
160. Monyer, H. Glucose deprivation neuronal injury in cortical culture / H. Monyer, M.P. Goldberg, D.W. Choi // Brain research. – 1989. – V. 483, № 2. – P. 347-354.
161. Monyer, H. Glucose deprivation neuronal injury in vitro is modified by withdrawal of extracellular glutamine / H. Monyer, D.W. Choi // Journal of cerebral blood flow and metabolism. – 1990. – V. 10, № 3. – P. 337-342.
162. Monnier, L. Regulation of oxidative stress by glycaemic control: evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy / L. Monnier, C. Colette, E. Mas, F. Michel et al. // Diabetologia. – 2010. – V. 53, № 3. – P. 562-571.
163. Nadler, J.V. Comparative toxicity of kainic acid and other acidic amino acids toward rat hippocampal neurons / J.V. Nadler, D.A. Evenson, G.J. Cuthbertson // Neuroscience. - 1981. - V. 6, № 12. - P.2505-2517
164. Nakaki, T. Inhibition by nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells / T. Nakaki, M. Nakayama, R. Kato // Eur.J. Pharmacol. - 1990. - V. 1889, №2. - P. 347-353
165. Niizuma, K. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival / K. Niizuma, H. Endo, P.H. Chan // J. Neurochem. – 2009. – V. 109, Suppl. 1. – P. 133-138. Review.
166. Norberg, K. Oxidative metabolism of the cerebral cortex of the rat in severe insulin-induced hypoglycemia / K. Norberg, B.K. Siesjo // J. Neurochem. - 1976. - V. 26, №2. - P. 345-352

167. Olney, J.W. Excitotoxic cell death / J.W. Olney, M.J. Ishimaru. - Koliatsos VE, Ratan RR (eds.). Cell Death and Diseases of the Nervous System. Humana Press, Totowa NJ, 1999. - P. 197-220.
168. Osawa, K. The effect of magnesium on brain mitochondrial metabolism / K. Osawa, K. Seta, H. Handa // J. Biochem. – 1966. – V. 60, № 3. – P. 268–273.
169. Ottersen, O.P. Excitatory amino acid antagonists / O.P. Ottersen. - Ed. Meldrum B.S. Oxford: Blackwell Scientific, 1991. - P. 14-38
170. Pamplona, R. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms / R. Pamplona, G. Barja // Biogerontology. – 2011. – V. 12, № 5. – P. 409-435.
171. Páramo, B. Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons / B. Páramo, K. Hernández-Fonseca, A.M. Estrada-Sánchez, N. Jiménez // Neuroscience. – 2010. – V. 167, № 4. – P. 1057-1069
172. Pardridge, W.M. Brain metabolism: A perspective from the blood-brain barrier / W.M. Pardridge // Physiol. Rev. – 1983. - № 63. – P. 1481 -1535
173. Pardridge, W.M. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier / W.M. Pardridge, R.J. Boado, C.R. Farrel // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265. – P. 18035-18040
174. Pardridge, W.M. Transport of metabolic Substrates through the blood-brain barrier / W.M. Pardridge, W.H. Oldendorf // J Neurochem. - 1977. - V.28, №1. - P.5-12
175. Patocková, J. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia / J. Patocková, P. Marhol, E. Tůmová, M. Kršiak et al. // Physiol Res. – 2003. – V. 52, № 1. – P. 131-135.

176. Pelligrino, D. Effects of insulin-induced hypoglycemia on intracellular pH and impedance in the cerebral cortex of the rat / D. Pelligrino, L.O. Almquist, B.K. Siesjö // *Brain Res.* – 1981. – V. 221, № 1. – P. 129–147
177. Pelligrino, D. Regulation of extra- and intracellular pH in the brain in severe hypoglycemia / D. Pellegrino, B.K. Siesjo // *J. Cerebral Bl. Flow.* – 1981. - № 1. - P. 85-96
178. Pessin, J.E. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation / J.E. Pessin, G.I. Bell // *Annu. Rev. Physiol.* – 1992. – V. 54. – P. 911-930
179. Poli, G. Oxidative stress and cell signaling / G. Poli, G. Leonarduzzi, F. Biasi, E. Chiarpotto // *Current Med. Chem.*–2004. – Vol. 11. – P. 1163–1182.
180. Redmond, E.M. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells / E.M. Redmond, P.A. Cahill, R. Hodges // *J. Cell. Physiol.* – 1998. – Vol. 166. – P. 469–479.
181. Roberts, E. Amino acid transmitters. *Basic Neurochemistry* / E. Roberts, R. Hammerschlag. - Eds. Alberts R.W., Siegel G.J. Katzman R., Agranoff B. W. Boston Brown and Co., 1972. - P. 131-168
182. Saad, S.F. Further observations on the role of γ -aminobutyric acid in insulin-induced hypoglycemic convulsions / S.F. Saad // *Europ. J. Pharmacol.* – 1972. - V. 17, №1. - P. 152-156
183. Sandberg, M. Metabolically derived aspartate. Elevated extracellular levels in vivo in iodoacetate poisoning / M. Sandberg, B. Nystrom, A. Hamberger // *J. Neurosci. Res.* – 1985. - V. 13, №3. - P. 489-495
184. Sandberg, M. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus / M. Sandberg, S.P. Butcher, H. Hagberg // *J. Neurochem.* - 1986. - V. 47, №1. - P. 178-184

185. Schulz, J.B. Involment of free radicals in excitotoxicity in vivo / J.B. Schulz, D.R. Henshaw, D. Siwek // *J. Neurochem.* - 1995. - V. 64, №5. - P. 2239-2247
186. Schulz, J.B. Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against exitotoxicity in vivo / J.B. Schulz, W.O. Matthews Jr., B.G. Jenkins et al. // *J. Neurosci.* - 1995. - V. 15, № 12. - P. 8419-8423
187. Sensi, S.L. Preferential Zn²⁺ influx through Ca²⁺ permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production / S.L. Sensi, H.Z. Yin, S.G. Carriedo, S.S. Rao et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – P. 2414 – 2419
188. Sensi, S.L. Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn²⁺ pools / S.L. Sensi, D. Ton-That, P.G. Sullivan, E.A. Jonas et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 100. – P. 6157 -6162
189. Siegel, G.J. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6th edition / Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., et al., editors; Philadelphia: [Lippincott-Raven](#), 1999. – 1183p.
190. Siesjö, B. *Brain energy metabolism* / B. Siesjö. - John Wiley and Sons; New York, 1978. - 630 p.
191. Siesjö, B. Regional differences in vascular autoregulation in the rat brain in severe insulin-induced hypoglycemia / B. Siesjö, M. Ingvar, D. Pelligrino // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1983. – V.3, № 4. – P. 478-485.
192. Siesjö, B. Neurocytotoxicity: pharmacological implications / B. Siesjö, H. Memezawa, M.L. Smith // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 1991. – V. 5, № 9. – P. 755-767.
193. Simpson, I.A. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction / I.A. Simpson, D. Dwyer, D. Malide, K.H. Moley et al.// *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2008. – V. 295, № 2. – P. 242-53.
194. Stelmashook, E.V. Glutamine effect on cultured granule neuron death induced by glucose deprivation and chemical hypoxia / E.V. Stelmashook,

- S.V. Novikova, N.K. Isaev // *Biochemistry (Mosc)*. - 2010. – V. 75, № 8. – P. 1039-44.
195. Stump, C.S. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts / C.S. Stump, K.R. Short, M.L. Bigelow, J.M. Schimke et al. // *PNAS*. – 2003. - V. 100, № 13. - P. 7996–8001
196. Suh, S. W. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase / S. W. Suh, E. T. Gum, A.M. Hamby, P. H. Chan et al. // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V. 117. – P. 910-918
197. Sutherland, G.R. Truncation of the krebs cycle during hypoglycemic coma / G.R. Sutherland, R.L. Tyson, R.N. Auer // *Med. Chem.* – 2008. – V. 4, № 4. – P. 379-85.
198. Tarr, M. Cerebral high-energy phosphates during insulin hypoglycemia / M. Tarr, D. Brada, F.E. Samson // *Amer. J. Physiol.* – 1962. - V. 203, №4. - P. 690-692
199. Tasker, R.C. The regional vulnerability to hypoglycemia-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal culture: protection by early tetrodotoxin or delayed MK-801 / R.C. Tasker, J.T. Coyle, J.J. Vornov // *J. Neurosci.* – 1992. – V. 12. – P. 4298-4308
200. Teh, M.M. Evolution and resolution of human brain perfusion responses to the stress of induced hypoglycemia / M.M. Teh, J.T. Dunn, P. Choudhary, Y. Samarasinghe et al. // *Neuroimage*. – 2010. – V. 53, № 2. – P. 584-592.
201. Telushkin, P.K. Metabolism alteration in the rat brain during repeated hypoglycemic doses of insulin exposure / P.K. Telushkin, A.D. Nozdrachev // *J. Neurochem.* - 1998. - V. 71. (Suppl.). – P.80
202. Tews, J.K. Chemical changes in the brain during insulin hypoglycemia and recovery / J.K. Tews, S.H. Cater, W.E. Stone // *J. Neurochem.* - 1965. - V. 12, №8. - P. 679-683.

203. Vanucci, S.J. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain / S.J. Vanucci // *J. Neurochem.* – 1994. – V. 62. – P. 240-246
204. Vergun, O. Glucose deprivation produces a prolonged increase in sensitivity to glutamate in cultured rat cortical neurons / O. Vergun, Y. Y. Han, I. J. Reynolds // *Experimental neurology.* – 2003. – V. 183, № 2. – P. 682-694.
205. Unger, J. W. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signaling mechanisms and functional aspects / J. W. Unger, J. Livingston, A. M. Moss // *Prog. Neurobiol.* – 1991. - V. 36. – P. 343-362
206. Wallace, D.C. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease / D.C. Wallace // *Am. Heart. J.* – 2000. - V. 139, № 2-3. – P.70-85.
207. Wieloch, T. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist / T. Wieloch // *Science.* - 1982. - V. 230. - P. 681-683
208. Wieloch, T. The amino acid antagonist 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid mitigates neuronal damage in the striatum due to hypoglycemia / T. Wieloch // *Acta Physiol. Scand.* - 1985. - V. 124, (Suppl. 542). - P. 397
209. Wieloch, T. Lesions of glutamatergic cortico-striatal projections in the rat ameliorate hypoglycemic brain damage in the striatum / T. Wieloch, B. Engelsen, E. Westerberg, R. Auer // *Neurosci. Lett.* - 1985. - V. 58, №1. - P. 25-30
210. Won, S.J. Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats / S.J. Won, B.H. Yoo, T.M. Kauppinen, B.Y. Choi et al. // *J. Neuroinflammation.* – 2012. - V. 9, № 1. – P. 182.

211. Wozniak, M. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system / M. Wozniak, B. Rydzewsky, S. P. Baker, M. K. Raizada, // *Neurochem. Int.* – 1993. – V. 22. – P. 1-10
212. Youdium, M.B.H. Iron in brain function and dysfunction with emphasis on Parkinson's disease. *Advances in Neurology* / M.B.H. Youdium, D. Ben-Shachar, P. Riederer. - Eds. Narabayashi H., Nagatsu T., Yanagisawa N., Mizuno Y. New York: Raven Press, 1993. - V.60. - P. 259-266
213. Youdium, M.B.H. Neurotoxicity of nitric oxide and decompartmentation of ferritin iron / M.B.H. Youdium, P. Riederer // *J. Neurochem.* - 1993. - V.61 (Suppl). – P.53
214. Zeevalk, G.D. Lactate prevents the alterations in tissue amino acids, decline in ATP, and cell damage due to aglycemia in retina / G.D. Zeevalk, W.J. Nicklas // *J. Neurochem.* - 2000. - V. 75. - P. 1027–1034.
215. Zorov, D.V. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes / D.V. Zorov, C.R. Filburn, L.O. Klotz, J.L. Zweier, et al.// *J. Exp. Med.* – 2000. V.192. – P. 1001 – 1014
216. Zorov, D.V. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review / D.V. Zorov, M. Jahaszova, S.J. Sollott // *Boichim. Biophys. Acta.* – 2006. - V. 1757. – P. 509 -517