

Клінічна фізіологія та біохімія

УДК 616.831-005.4:577.1

В.П. ПІШАК, В.О. КУРОВСЬКА
Буковинський державний медичний університет

Взаємозв'язок монооксиду нітрогену та метаболізму глюкози як напрям нейропротекції за ішемічних ушкоджень головного мозку (огляд літератури)

Сучасні дослідження розкривають механізми, за участю яких мозкова тканина може захистити себе від ішемії та гіпоксії. Зокрема, з'являються нові повідомлення про шляхи метаболізму глюкози за цих умов. Виявляється, що вона є не тільки безпосереднім джерелом енергії, а й відіграє значну роль у регуляторних процесах мозку. Підвищення рівня її метаболізму пов'язують із регуляцією мозкового кровотоку через механізми з залученням НАДН/НАД⁺, до речі, споживання кисню мозковою тканиною при цьому змінюється лише незначно. Це має зв'язок і з монооксидом нітрогену (NO). Запропонований шлях регенерації НАД⁺, при якому окиснення НАДН зумовлює утворення NO з подальшою активацією мозкового кровотоку. Експерименти на щурах *in vivo* свідчать, що неселективний інгібітор синтезу монооксиду нітрогену L-NAME повністю нівелює цю реакцію [1, 13, 21, 25]. Зв'язок між обміном глюкози та NO простежується за гіпоксичних станів на рівні метаболітів циклу Кребса [2, 3].

Пентозофосфатний шлях окиснення глюкози (ПФШ) також бере участь у релаксації судин [23]. Цей напрям її метаболізму не пов'язаний з утворенням АТФ. Значення його полягає у забезпеченні клітини рибозо-5-фосфатом для біосинтетичних процесів та НАДФН. Пентозофосфатний шлях на 50% забезпечує ним потреби клітини. У зв'язку з цим ПФШ відведена значна роль у механізмах клітинного захисту.

Після експериментальної ішемії окиснення глюкози через ПФШ є найбільшим через 24 год. Від моменту активації ПФШ спостерігається зростання генерації НАДФН [30].

Клінічними дослідженнями виявлено, що пацієнти з ушкодженням мозку мають підвищену концентрацію церебральної глюкози, що зумовлено низьким рівнем кисню і продукуванням лактату. У таких пацієнтів зростає активність ПФШ щодо контрольних показників і залишається підвищеною в межах 48 год після ушкодження [15].

Фактично вхід глюкози в ПФШ є контрольованим через споживання НАДФН всередині клітини. За звичайних умов співвідношення НАДФН/НАДФ⁺ є високим на користь НАДФН і активність ключового ферменту ПФШ глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) пригнічується. При зростанні споживання НАДФН клітиною Г-6-ФДГ вивільняється з-під його інгібування [27]. Безперечно, це явище можливе за ішемії-реперфузії, коли НАДФН використовується NO-синтазами, та інтенсивно — ферментами обміну глутатіону.

Відомо, що і гіпо-, і гіперглікемія є негативними чинниками щодо функціонування головного мозку [22]. Є дані, що нестача глюкози зменшує внутрішньоклітинний рівень НАДФН в культурі астроцитів та продукування NO. Додавання β -НАДФН відновлює синтез монооксиду нітрогену, тобто, власне гіпоглікемія гальмує роботу NO-синтаз через зменшення їхнього кофактора НАДФН [12]. Водночас є повідомлення, що підвищення концентрації глюкози пригнічує pNOS-залежне продукування NO [4]. Високий її рівень також зумовлює інгібування Г-6-ФДГ і, відповідно, призводить до зниження внутрішньоклітинних рівнів НАДФН та зростання окисного стресу [32, 33]. Однак встановлено, що останній, власне, може спричинити експресію ферменту Г-6-ФДГ. Активність Г-6-ФДГ та експресія її білка зростають відповідно зі зменшенням рівнів відновленого глутатіону внаслідок окисного стресу й не змінюються, поки ці рівні не відновлюються. Інгібування глюкозо-6-фосфатдегідрогенази асоційоване зі зниженням рівнів глутатіону й пригніченням активності глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази [17].

За умов ішемії-реперфузії активність Г-6-ФДГ важлива і тому, що виявлено її прямиї антиоксидантний ефект. Традиційно вважають, що глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа є типовим ферментом, який регулює виключно співвідношення НАДФН/НАДФ⁺. Але є дані, що цей фермент високорегульований і відіграє важливу роль у багатьох клітинних процесах. Він має трансрипційний, трансляційний та посттрансляційний контроль [14]. Деградація Г-6-ФДГ асоційована зі зростанням клітинної загибелі, апоптозом, втратою тілових білків, а надекспресія ферменту підвищує опірність клітин за умов вільнорадикального стресу [7], власне NO активує Г-6-ФДГ [24].

Глюкоза з крові до мозку надходить шляхом транспортування через ендотеліальні клітини гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) та всередину нейронів і глії. Відомо декілька ізоформ транспортерів глюкози: *GLUT1*, який визначений у високій концентрації, локалізований у ГЕБ, *GLUT3* — у нейронах, *GLUT5* — у мікроглії. Інші члени родини транспортерів *GLUT2,4,7* також визначені у мозку, але з нижчими рівнями експресії [31]. Транспортери *GLUT1* і *GLUT3* — інсулінезалежні й постійно транспортують глюкозу, як результат, зовнішньоклітинна гіперглікемія зумовлює внутрішньоклітинну гіперглікемію [20].

На відміну від астроцитів, які переважно експресують тільки *GLUT1*, нейрони експресують як *GLUT1*, так і *GLUT3*. Останні володіють більшою спорідненістю з глюкозою, ніж *GLUT1* і тому споживання глюкози нейронами можливе за нижчої її концентрації [10].

Гіпоксія/ішемія зумовлює в астроцитах індукцію iNOS. Для встановлення взаємозв'язку між ПФШ і активністю NO-синтаз виконано низку досліджень.

Оскільки найбільш відомою функцією ПФШ є генерація рибози та відновлення глутатіону, культуру клітин інкубували з додаванням рибози (5mM) та моноетилестеру глутатіону (500µM) впродовж 30 хв і це не мало ефекту щодо пригнічення експресії гена iNOS і продукування NO. Отже, рибоза і глутатіон не залучаються до глюкозозумовленої індукції iNOS.

Також досліджено впливи позаклітинної концентрації глюкози на внутрішньоклітинні рівні АТФ після 36 год інкубації з різними її концентраціями. У групі з відсутністю глюкози внутрішньоклітинні рівні АТФ були нижчими. Додавання глюкози збільшувало рівні АТФ, але не було суттєвої різниці між 1,3 і 6 мг/л. Ці спостереження показують, що внутрішньоклітинні рівні АТФ не корелюють зі зростанням індукції iNOS. Глюкоза активує iNOS не через енергетичний шлях.

Інкубація клітин з дегідроепіандростероном (*DHEA*) — інгібітором глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (10, 50, 100 µM) — не тільки пере-

шкодить зростанню НАДФН/НАДФ⁺ співвідношення, а й зменшує продукування NO і експресію гена iNOS дозозалежно [29]. Отже, саме ПФШ є ланкою, що взаємопов'язує метаболізм глюкози та монооксиду нітрогену.

Стимулювання синтезу NO корелює зі зменшенням позаклітинної глюкози і збільшенням її утилізації та метаболізму. Зазначено, що при інкубації клітин з ліпополісахаридом (ЛПС) дозою 1 µg/ml зростає вміст NO₂⁻ у середовищі культури дозозалежно. Цей ефект поєднаний зі зростанням споживання глюкози і рівнів мРНК транспортерів глюкози *GLUT1* і *GLUT3*. Інкубація зі специфічним інгібітором iNOS AMT (50 µm) повністю запобігає ЛПС-зумовленому збільшенню N₂⁻ і частково (близько 45%) споживанню 2-деоксиглюкози і не має ефекту на експресію транспортерів глюкози. Додавання донора NO DETA (100 µm) помірно збільшує споживання 2-деоксиглюкози [10]. Водночас інкубація культури астроцитів щурів з ліпополісахаридом характеризується збільшенням Г-6-ФДГ активності (1,74 разу) і частоги входу глюкози в ПФШ (6,12 разу). Пригнічення iNOS не порушує ЛПС-зумовлене збільшення експресії мРНК Г-6-ФДГ чи активності ПФШ [16].

Як нестача глюкози, так і гіпоксія є добре відомими чинниками активації нуклеарного фактора *κB* (*NF-κB*) у нейронах. Блокада *NF-κB* гальмує експресію як iNOS мРНК, так і мРНК Г-6-ФДГ. Очевидно, вони коіндуковані загальним транскрипційним шляхом, до якого залучена активація *NF-κB* [16]. Пригнічення *NF-κB* зменшує експресію *GLUT1* і *GLUT3* [10].

Про спільний механізм активації обох ферментів свідчать й інші дані. Стимульоване *iL-1β* продукування NO позитивно корелює зі зростанням активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, причому *iL-1β* не спричинює суттєві зміни у ферментативній активності інших НАДФН-продукуючих ферментів. Водночас *iL-1β*-зумовлене продукування NO суттєво зменшується за пригнічення Г-6-ФДГ чи експресії мРНК Г-6-ФДГ [28].

Серед інших факторів, які регулюють iNOS, відомі *Fos/jun*, *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP-δ)*, інтерферон-γ, *C/EBP-δ*, як і *NF-κB*, регулюються гіперглікемією. Активація *C/EBP-δ* глюкозою відбувається паралельно з експресією iNOS [29].

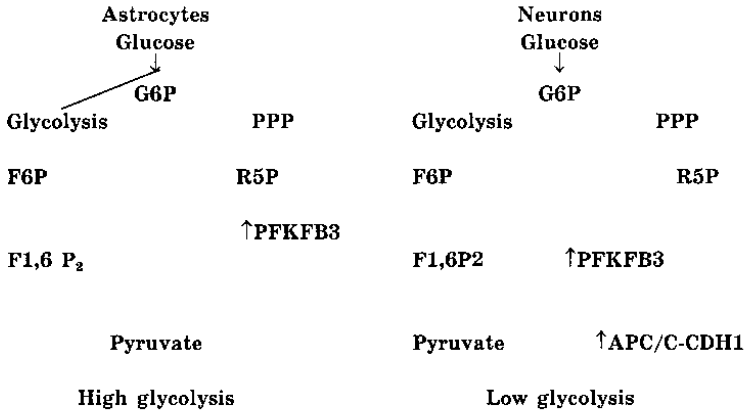
Нейрони є особливо чутливими до реактивних кисневих і азотних радикалів через їхній слабкий антиоксидантний захист і низьку спроможність компенсувати енергетичний гомеостаз. Однак, з'ясовано, що нітративний стрес через стимуляцію пентозофосфатного шляху може компенсувати їхню низьку антиоксидантну ємність [7].

Однією з ланок гліколізу є 6-фосфофрукто-1-кіназна реакція (*Pfk-1*), яка перетворює фруктозо-6-фосфат (*F6P*) у фруктозо-1,6-біфосфат (*F1,6P2*). *Pfk-1* регулюється фруктозо-2,6-біфосфатом (*F2,6P2*). *F2,6P2* утворюється з *F6P* за допомогою 6-фосфофрукто-2-кіназо/фруктозо-6-фосфатази (*Pfkfb*), яка має 4 ізоформи. Ізоформа 3 (*Pfkfb3*) найбільш експресована кіназою і переважає у клітинах мозку [26].

За умов пригнічення мітохондріального дихання нейрони швидше гинуть, тоді як астроцити можуть генерувати АТФ гліколітичним шляхом (див. рисунок). Внаслідок досліджень цього феномена виявлено, що нейрони неспроможні підвищити гліколіз, тому що не мають *Pfkfb3*. У нейронах *Pfkfb3* постійно деградується через *E3* циклосому (*APC/c-CDH1*) і, таким чином, глюкоза тут метаболізується переважно через ПФШ [6]. Є дані, що саме NO активує *Pfkfb3* [26].

Водночас астроцити містять більше глутатіону, ніж нейрони, і метаболізм глюкози через ПФШ у них вищий порівняно з нейронами. Відповідно завдяки більшій антиоксидантній ємності астроцити можуть суттєво допомагати нейронам [5, 8, 9, 19]. Залученням у ці механізми

виявився і пероксинітрит. У астроцитах після 30 хв інкубації з донором пероксинітриту SIN 1 (1 mM) спостерігається незначне підвищення концентрації НАДФН, яке статистично зростає в 1,2 разу за 24 год. На відміну від астроцитів, нейрональна концентрація НАДФН прогресивно збільшується з першої хвилини інкубації з SIN 1, зростаючи в 5,2 разу за 30 хв і 11 разів після 40 год інкубації. Відповідно існує думка, що пероксинітрит може активувати Γ -6-ФДГ, зумовлюючи вивільнення її в цитозоль із структурних внутрішньоклітинних елементів [11]. Свідчить про такий зв'язок і те, що пероксинітрит може поповнювати запаси *L*-аргініну — донора NO [24].



Відмінності метаболізму глюкози в астроцитах та нейронах [6]

Із зазначеного випливає, що монооксид нітрогену модулює баланс між споживанням глюкози через гліколіз у астроцитах і ПФШ у нейронах, підвищує її метаболізм у мозковій тканині, зокрема надходження глюкози до клітини через стимуляцію *GLUT1* і *GLUT3* транспортерів [18].

Таким чином, зважаючи на тісний зв'язок глюкози з молекулою NO, очевидно, що вона відіграє значну роль у регуляторних функціях. Розкриття цих механізмів дає змогу виявити нові протекторні підходи щодо деяких патологічних процесів, зокрема за ішемічних ушкоджень головного мозку.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Власенко А.Г. Молекулярные основы регуляции мозгового кровотока / А.Г. Власенко, М.А. Минтон // Неврол. журн. — 2007. — № 1. — С. 38–44.
2. Кургалюк Н.М. Вплив інтермедіатів циклу трикарбонових кислот на систему оксиду азоту за гострої гіпоксії організму / Н.М. Кургалюк // Укр. біохім. журн. — 2002. — Т. 74, № 4. — С. 85–90.
3. Кургалюк Н.М. Модифікація продукції оксиду азоту за умов гострої гіпоксії під впливом екзогенних інтермедіатів циклу Кребса / Н.М. Кургалюк, А.В. Коцюрuba, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. — 2005. — Т. 51, № 4. — С. 20–28.
4. Barnes M. Nitric oxide's role in glucose homeostasis / M. Barnes, J. Beverly // Amer. Journ. of physiol. Regulatory, integrative and comparative physiol. — 2007. — Vol. 293. — № 2. — P. R590–R591.
5. Bolanos J. Modulation of astroglial energy metabolism by nitric oxide / J. Bolanos, A. Almeida // Antioxidants&Redox signaling. — 2006. — Vol. 8, № 5–6. — P. 955–965.
6. Bolanos J. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? / J. Bolanos, A. Almeida, S. Moncada // Trends in biochemical sciences. — 2010. — Vol. 35, Is. 3. — P. 145–149.
7. Bolanos J. The pentose-phosphate pathway in neuronal

survival against nitrosative stress / J. Bolanos, A. Almeida // *IUBMB life*. — 2009. — Vol. 24. — P. 341–353. 8. *Chen Y.* Astrocytes and brain injury / Y. Chen, R. Swanson // *Journ. of cerebral blood flow&metabolism*. — 2003. — Vol. 23. — P. 137–149. 9. *Dienel G.* Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia / G. Dienel, L. Hertz // *Glia*. — 2005. — Vol. 50. — P. 362–388. 10. *Expression of glucose transporter GLUT 3 by endotoxin in cultured rat astrocytes: the role of nitric oxide* / P. Cidat, P. Garcia-Nogales, A. Almeida et al. // *Journ. of neurochemistry*. — 2001. — Vol. 79, N. 1. — P. 17–24. 11. *Garcia-Nogales P.* Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis: a key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection / R. Garcia-Nogales, A. Almeida, J. Bolanos. // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278 (2). — P. 864–874. 12. *Glucose deprivation decreases nitric oxide production via NADPH depletion in immunostimulated rat primary astrocytes* / Ch. Shin, J. Choi, J. Ryu et al. // *Glia*. — 2002. — Vol. 37, I. 3. — P. 268–274. 13. *Ido Y.* NADH augments blood flow in physiologically activated retina and visual cortex / Y. Ido, K. Chang, J. Williamson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2004. — Vol. 101. — P. 653–658. 14. *Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death* / W.-N. Tian, L. Braunstein, K. Apse et al. // *Am. J. physiol. cell physiol.* — 1999. — Vol. 276, N. 5. — P. 1121–1131. 15. *Increased pentose phosphate pathway flux after clinical traumatic brain injury: a [1,2-13C2] glucose labeling study in humans* / J. Dusick, T. Glenn, W. Lee et al. // *J. cereb. blood flow metab.* — 2007. — Vol. 27, № 9. — P. 1593–1602. 16. *Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes* / P. Garcia-Nogales, A. Almeida, E. Fernandez et al. // *Journ. of neurochemistry*. — 1999. — Vol. 72, N. 4. — P. 1750–1758. 17. *Leopold J.* Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells / J. Leopold, J. Loscalzo // *Am. J. Physiology heart circ physiol.* — 2000. — Vol. 279, N 5. — P. 2477–2485. 18. *Linking glycolysis with oxidative stress in neural cells: a regulatory role for nitric oxide* / J. Bolanos, A. Herrero-Mendez, S. Fernandez-Fernandez et al. // *Biochem. society transactions*. — 2007. — Vol. 35, part 5. — P. 1224–1227. 19. *Liu X.* The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning / X. Liu, R. Sheng, Z. Qin // *Acta pharmacol. sin.* — 2009. — Vol. 30, № 8. — P. 1071–1090. 20. *Martini S.* Hyperglycemia in acute ischemic stroke: a vascular perspective / S. Martini, T. Kent // *Journ. of cerebral blood flow&metabolism*. — 2007. — Vol. 27. — P. 435–451. 21. *NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle and other tissues* / Y. Ido, K. Chang, T. Woolsey // *The FASEB journal*. — 2001. — Vol. 15. — P. 1419–1421. 22. *Patel P.* Brain protection — the clinical reality / P. Patel // *Revista Mexicana de Anestesiologia*. — 2007. — Vol. 30, S. 1. — P. 101–107. 23. *Pentose phosphate pathway coordinates multiple redox-controlled relaxing mechanisms in bovine coronary arteries* / S. Gupte, M. Arshad, S. Viola et al. // *Am. J. Physiol. heart circ physiol.* — 2003. — Vol. 285. — P. 2316–2326. 24. *Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system y(+) in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine* / V. Vega-Agapito, A. Almeida, M. Hatzoglu et al. // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277 (33). — P. 29753–29759. 25. *Regulation of blood flow in activated human brain by cytosolic NADH/NAD+ ration* / A. Vlassenko, M. Rundie, M. Raichle et al. // *PNAS*. — 2006. — Vol. 103, № 6. — P. 1964–1969. 26. *Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival* / J. Bolanos, M. Delgado-Esteban, A. Herrero-Mendez et al. // *Biochimica et biophysica acta*. — 2008. — Vol. 1777, Is. 7–8. — P. 789–793. 27. *Spolarics Z.* Endotoxemia, pentose cycle and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid / Z. Spolarics // *Journ. of leukocyte biology*. — 1998. — Vol. 63. — P. 534–541. 28. *Suppression of interleukin- β -induced nitric oxide production in R1Nm5F cells by inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase* / Li Guo, Z. Zhang, K. Green et al. // *Biochemistry*. — 2002. — N 41(50). — P. 14726–14733. 29. *The involvement of glucose metabolism in the regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in glial cells: possible role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and CCAAT/enhancing binding protein* / J. Won, Y. Jm, L. Key et al. // *The journ. of neuroscience*. — 2003. — Vol. 23(20). — P. 7470–7478. 30. *Upregulation of pentose phosphate pathway and preservation of tricarboxylic acid cycle flux after experimental brain injury* / B. Bartnik, R. Sutton, M. Fukushima et al. // *Journ. of neurotrauma*. — 2005. — Vol. 22, № 10. — P. 1052–1065. 31. *Vannucci S.* Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia / S. Vannucci, F. Maher, I. Simpson // *Glia*. — 1997. — Vol. 21, Is. 1. — P. 2–21. 32. *Xu Y.* Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of protein kinase A which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex / Y. Xu, B. Osborne, R. Stranton // *Am. J. physiology renal physiology*. — 2005. — Vol. 289(5). — P.1040–1047. 33. *Zhang Zh.* High glucose inhibit glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and β -cell apoptosis / Zh. Zhang, Ch. Liew, D. Handy // *The FASEB journal*. — 2010. — Vol. 24. — P. 1497–1505.

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ОКСИДА АЗОТА И МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ
КАК НАПРАВЛЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКИХ
ПОВРЕЖДЕНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

В.П. ПИШАК, В.О. КУРОВСКАЯ

В статье представлены механизмы взаимовлияний оксида азота и метаболизма глюкозы при ишемии головного мозга. Отмечено, что в условиях окислительного стресса активация глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NO-синтаз имеет общие механизмы из-за экспрессии одинаковых генов. Собственно NO повышает утилизацию глюкозы клетками мозга и активирует пентозофосфатный путь. Ингибция глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы сопровождается снижением активности NO-синтаз. Кроме того, NO модулирует баланс между использованием глюкозы путём гликолиза в астроцитах и пентозофосфатный путь в нейронах.

Ключевые слова: глюкоза, оксид азота, пентозофосфатный путь, ишемия, головной мозг.

**INTERCONNECTION OF NITRIC OXIDE AND GLUCOSE METABOLISM
AS A DIRECTION OF NEUROPROTECTION UNDER THE ISCHEMIC
DAMAGES OF BRAIN
(REVIEW)**

V. PISHAK, V. KUROVS'KA

The article presents mechanisms of interaction between nitric oxide and glucose metabolism under the ischemia of brain. During oxidative stress the activation of glucose-6-phosphatedehydrogenase and NO-synthases is realized by the common pathway through the expression of the same genes. NO increases glucose utilization by brain cells and activates the pentose phosphate pathway. Inhibition of glucose-6-phosphatedehydrogenase causes the decrease of NO-synthesis activity. Fothermore, NO can modulate balance between glucose utilization through glycolysis in the astrocytes and pentose phosphate pathway in the neurons.

Key words: glucose, nitric oxide, pentose phosphate pathway, ischemia, brain.