

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ

УДК: 616.831:612.015.39+616.153.455.04:615.31:547.463.3

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЕ СУБСТРАТОВ ГАМК-ШУНТА В МОЗГЕ КРЫС ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ ДОЗ ИНСУЛИНА

П.К.ТЕЛУШКИН, Т.Е.ШИДЛОВСКАЯ

Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г.Ярославль, 5-я Революционная ул.,  
факс (0852) 30-50-13

Исследована активность глутаматдекарбоксилазы, ГАМК, аспартат-, и аланинаминотрансфераз, содержание ГАМК, глутамата, аспартата и аланина в больших полушариях и стволе мозга крыс, находящихся в состоянии гипогликемической комы, а также животных, перенесших 7-9 ком на 2-е сутки после последней комы. В состоянии гипогликемии наблюдается уменьшение содержания в мозге глутамата, аланина и ГАМК и увеличение количества аспартата; активность исследованных ферментов не изменяется. На 2-е сутки после 7-9-й гипогликемической комы обнаружено уменьшение активности глутаматдекарбоксилазы в больших полушариях и количества ГАМК в стволе мозга, что может явиться свидетельством уменьшения образования и выделения ГАМК нервными окончаниями стрио- и паллидонигральных путей. Выявленные изменения являются следствием многократного воздействия гипогликемии на мозг и могут иметь значение в патогенезе постгипогликемической энцефалопатии.

**Ключевые слова:** гипогликемия, метаболизм мозга, ГАМК.

**Введение.** Терапия сахарного диабета, инсулинома поджелудочной железы, ряд заболеваний печени и желудочно-кишечного тракта сопровождаются неоднократно возникающей гипогликемией, которая может служить причиной необратимого повреждения нейронов и приводить к нарушению функций мозга — постгипогликемической энцефалопатии [1-5]. Механизмы возникновения и развития этого патологического состояния в достаточной мере не исследованы.

Нервная ткань отличается исключительной зависимостью от снабжения глюкозой, обмен которой в мозге тесно связан с метаболизмом нейротрансмиттерных аминокислот, осуществляющимся, в частности, в реакциях ГАМК-шунта [3, 6]. Изменение скорости синтеза и распада метаболитов системы ГАМК является существенным моментом в нарушении деятельности центральной нервной системы при различных патологических состояниях.

В настоящей работе исследована активность ферментов и содержание субстратов ГАМК-шунта в мозге крыс при многократном воздействии гипогликемических доз инсулина.

**Методика.** Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 180-220 г. Все животные находились на обычном пищевом рационе и перед опытом голодали в течение 18-24 часов. Воду получали без ограничения. Гипогликемическую кому (концентрация глюкозы в крови  $1,05 \pm 0,08$  ммоль/л; утрата постуральных рефлексов) вызывали внутримышечной инъекцией 40 ЕД инсулина на 1 кг массы тела. Купирование комы осуществляли введением 3 мл 40% раствора глюкозы в желудок.

Исследовали ткани больших полушарий (БП) и ствола мозга (СТ) крыс, находящихся в состоянии гипогликемической комы и животных, перенесших 7-9 гипогликемических ком с интервалом 2 дня на 2-е сутки после купирования последней комы. Контролем служили интактные животные.

Активность ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-АТ, К.Ф.2.6.1.19) и глутаматдекарбоксилазы (ГДК, К.Ф.4.1.1.15) в 10% гомогенатах нервной ткани оценивали соответственно по скорости накопления глутамата и ГАМК [7]. Активность аланинаминотрансферазы (АЛ-АТ, К.Ф.2.6.1.2) и аспаратаминотрансферазы (АС-АТ, К.Ф.2.6.1.1) определяли колориметрически [8]. Содержание аминокислот в инкубационных средах и нервной ткани исследовали с помощью бумажной хроматографии [9]. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Изменений активности ГАМК-АТ, АС-АТ и АЛ-АТ в исследованных отделах мозга при гипогликемии и на 2-е сутки после купирования 7-9-й гипогликемической комы не выявлено. Наблюдается тенденция к уменьшению активности ГДК в БП при гипогликемии (-6%,  $P>0,05$ ), см. таблицу. Содержание глутамата и аланина в исследованных отделах мозга в состоянии гипогликемической комы уменьшается соответственно на 19-21% и 40-50%, а количество аспартата увеличивается на 23-25% (во всех случаях  $P<0,01$ ). Уровень ГАМК при гипогликемии оказался сниженным в БП на 17%, а в СТ на 37% (в обоих случаях  $P<0,05$ ).

Таблица

Активность ферментов ГАМК-шунта (мкмоль/час/г ткани) и содержание аминокислот (мкмоль/г ткани) в состоянии гипогликемической комы и на 2-е сутки после 7-9-й гипогликемической комы ( $M\pm m$ )

Показатели	Отдел мозга	Контроль	Гипогликемическая кома	2-е сутки после 7-9-й ком
ГЛ-ДК	БП	14,27±0,32 (7)	13,38±0,37 (8)	12,75±0,36 (8)*
	СТ	16,43±1,02 (10)	15,68±1,26 (6)	16,50±1,25 (7)
ГАМК-АТ	БП	32,12±1,27 (6)	32,85±1,96 (7)	30,81±1,33 (9)
	СТ	40,80±2,45 (5)	39,16±1,34 (7)	38,68±2,00 (9)
АЛ-АТ	БП	171±8 (13)	165±9 (6)	184±6 (19)
	СТ	217±11 (13)	210±9 (7)	212±8 (19)
АС-АТ	БП	424±23 (6)	432±18 (7)	421±17 (9)
	СТ	493±28 (6)	478±14 (7)	469±6 (9)
Глутамат	БП	9,19±0,28 (12)	7,46±0,35 (6)*	8,84±0,24 (10)
	СТ	6,06±0,12 (12)	4,82±0,23 (6)*	5,94±0,15 (10)
ГАМК	БП	1,60±0,07 (5)	1,33±0,07 (6)*	1,50±0,15 (5)
	СТ	2,52±0,22 (5)	1,60±0,23 (5)*	1,78±0,17 (5)*
Аланин	БП	1,18±0,03 (9)	0,61±0,04 (6)*	1,21±0,06 (6)
	СТ	0,92±0,03 (9)	0,56±0,07 (5)*	1,03±0,06 (5)
Аспартат	БП	3,90±0,07 (7)	4,80±0,15 (5)	3,52±0,09 (6)*
	СТ	3,47±0,19 (9)	4,35±0,11 (4)*	3,28±0,27 (5)

Примечание: В скобках — количество опытов в каждой серии. Звездочкой обозначены статистически достоверные изменения ( $P<0,05$ ).

На 2-е сутки после купирования 7-9-й гипогликемической комы выявлено уменьшение активности ГДК в БП (-11%,  $P<0,01$ ) и уровня ГАМК в СТ (-29%,  $P<0,05$ ), а также снижение количества аспартата в БП (-10%,  $P<0,01$ ).

Уменьшение количества глутамата, аланина и ГАМК в мозге в состоянии гипогликемической комы является как следствием снижения образования их из глюкозы, так и результатом использования этих аминокислот в качестве эндогенных субстратов окисления в нервной ткани при гипогликемии [3, 5].

Большое количество тел ГАМК-эргических нейронов находится в базальных ганглиях БП. Их аксоны формируют стрионигральные и паллидонигральные пути, образуя синапсы на телах нейронов черной субстанции и отдавая коллатерали к нейронам других ядер среднего мозга [10]. ГАМК, выполняя в мозге медиаторную функцию, является также субстратом энергетического обмена и ГДК локализуется во всех нейронах, а не только в ГАМК-эргических. Вместе с тем содержание ГАМК в нервных окончаниях ГАМК-эргических нейронов на порядок выше, чем в телах нейронов [6]. Уменьшение уровня ГДК в БП, по-видимому, удалось продемонстрировать потому, что в базальных ганглиях находится основная масса тел ГАМК-эргических нейронов, а возможные изменения активности ГДК в нервных окончаниях ГАМК-эргических путей в СТ маскируются ГДК-активностью других нейронов этого отдела мозга.

Купирование гипогликемической комы приводит к нормализации уровня исследованных аминокислот уже через 15 мин с момента введения глюкозы [11]. Активность ГДК в мозге крыс также не изменяется как в состоянии гипогликемической комы, так и при купировании ее глюкозой [12]. Вместе с тем содержание ГАМК в СТ на 2-е сутки после купирования 7-9 гипогликемической комы существенно снижено. Можно предположить, что падение уровня ГАМК в СТ связано с сокращением медиаторного пула ГАМК, в частности, выделяющейся окончаниями стрио- и паллидонигральных путей.

Однократная тяжелая и продолжительная гипогликемия (30 мин изоэлектрической ЭЭГ) вызывает избирательную гибель нейронов в базальных ядрах БП и поля СА1 гиппокампа [3]. Выявленное в настоящем исследовании уменьшение активности ГДК в БП позволяет предположить, что даже относительно умеренная, но неоднократная гипогликемия также может служить причиной повреждения нейронов.

Общие механизмы нарушения жизнедеятельности нервных клеток при различных патологических состояниях все чаще объясняют эксайтотоксическим эффектом аминокислот. Связанному с НМДА-рецепторами действию аспартата и глутамата отводится важная роль в повреждении нейронов при гипогликемии и ишемии [3, 5]. ГАМК предохраняет пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа от гибели при ишемии [13] и оказывает защитное действие при их гиперактивации [14]. Снижение уровня ГАМК в СТ, вызванное неоднократной гипогликемией, может явиться причиной уменьшения резистентности нейронов этого отдела мозга к другим неблагоприятным воздействиям и способствовать их повреждению. Этому может содействовать и угнетение интенсивности гликогенолиза в СТ, продемонстрированное в тех же условиях эксперимента ранее [15].

Черная субстанция СТ играет ключевую роль в развитии судорожных припадков различной этиологии [16]. Угнетение ГАМК-эргических тормозных воздействий на структуры СТ может приводить к увеличению судорожной готовности нейронов в восстановительном периоде после неоднократно перенесенной гипогликемии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Генес С.Н. Гипогликемия. Гипогликемический симптомокомплекс. — М., 1970.
2. Лукьянчиков В.С., Балаболкин М.М. Гипогликемический синдром: (Этиология, патогенез, диагностика, лечение). — М., 1987. — Вып. 1.
3. Auer R.N., Siesjo B.K. // *Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1993. — V. 7. — N. 3. — P. 611-625.
4. Marks V., Teale J.D. // *Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1993. — V. 7. — N. 3. — P. 705-729.
5. Siesjo B.K. // *Diabetes/Metab. Rev.* — 1988. — V. 4. — P. 113-141.
6. Хухо Ф. Нейрохимия. Основы и принципы. — М., 1990. — С. 229-231.
7. Промыслов М.Ш., Соловьева Т.В., Анискина Р.И. // *Вопр. мед. химии.* — 1968. — N 6. — С. 619-622.
8. Методы биохимических исследований: Липидный и энергетический обмен / Под ред. М.И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 246-250.
9. Пасхина Т.С. // *Современные методы в биохимии* / Под ред. В.Н. Ореховича. — М., 1964. — С. 162-180.
10. Бархатова В.П. Нейротрансмиттеры и экстрапирамидная патология. — М., 1988.
11. Филиппов С.П. // *Вопр. мед. химии.* — 1980. — N 4. — С. 455-457.
12. Wyssmyk-Cybula U., Albrecht J. // *Neuropatol. pol.* — 1981. — V. 19. — N. 3. — P. 369-376.
13. Johansen F.F., Christensen T., Jensen M.S., Valente E. // *Exp. Brain. Res.* — 1991. — V. 86. — N. 1. — P. 529-537.
14. Ylinen A.M.A., Miettinen R., Pitkanen A., Gulyas A.I. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1991. — V. 88. — N. 17. — P. 7650-7653.
15. Телушкин П.К., Потапов И.П. // *Пробл. эндокринологии.* — 1994. — N 5. — С. 53-54.
16. Moche S.L., Sperber E.F., Velisek L. // *Physiol. Res.* — 1993. — V. 42. — N. 3. — P. 145-154.

#### ENZYMATIC ACTIVITY AND CONTENT OF GABA-CHUNT SUBSTRATES IN RAT BRAIN DURING REPEATED EXPOSURE TO HYPOLYCEMIC DOSES OF INSULIN

P.K. Telushkin, T.E. Shidlovskaya

Yaroslavl State Medical Academy, 5 ST.Revolutsyonny, Yaroslavl, 150000, Russia, fax (0852) 30-50-13

The activity of glutamate decarboxylase, GABA-, aspartate- and alanineaminotransferases, the content of GABA, glutamate, aspartate and alanine were studied in the brain hemispheres and stem of rats that were undergoing the hypoglycemic coma as well as those rats had undergone 7-9 comas on the second day after the last coma. In hypoglycemia, the brain's content of glutamate, alanine and GABA decreased and content of aspartate increased; the activity of enzymes investigated did not change. On the second day after 7-9th hypoglycemic coma, the decrease of activity of glutamate decarboxylase in hemispheres and the decrease of GABA amount in brain stem were detected. This can be an evidence of decrease of GABA amount produced and secreted by nerve ends of the pathways leading from striata to substantianigra. The detected changes result from multiple influence of hypoglycemia to the brain and may be important in the development of posthypoglycemic encephalopathy.

Key Words: Brain metabolism, hypoglycemia, GABA.