

УДК 616.8-005:577.175

## ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В МОЗГЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

Н.П. Канунникова, Н.З. Башун, Е.Ф. Радута, Ж.И. Балаш,  
Д.В. Гупенец\*

УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купаль»

\*ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАНБ»

*Были изучены изменения процессов образования энергии, метаболизма нейроактивных аминокислот и изменений активности системы глутатиона в мозге крыс на фоне нейродегенеративных изменений, обусловленных ишемией мозга, действием ротенона или хлористого алюминия. Показано, что процессы нейродегенерации включают в себя сдвиги активности про- и антиоксидантных систем, а также нарушения энергетического метаболизма в ткани мозга, что свидетельствует о необходимости использования средств метаболической терапии, способствующих поддержанию систем антиоксидантной защиты и процессов образования энергии в мозге.*

**Ключевые слова:** ишемия мозга, ротеноновая интоксикация, алюминиевый нейротоксикоз, нейроактивные аминокислоты, глутатион.

*The changes of energy formation, neuroactive amino acid metabolism and glutathione metabolism in rat brain following brain ischemia, rotenone intoxication and aluminium neurotoxicity have been studied. It has been showed that neurodegeneration leads to disturbances of both the pro- and antioxidant systems, as well as disturbances of energy formation in the brain. So, metabolic drugs for slackening of the changes of energy formation and glutathione disturbances in the brain must be used in treating of neurodegenerative diseases.*

**Key words:** brain ischemia, rotenone intoxication, aluminium neurotoxicity, neuroactive amino acids, glutathione.

Нейродегенеративные заболевания занимают всё более значимое место среди причин снижения трудоспособности и повышения смертности населения. Однако до настоящего времени механизмы метаболических нарушений, приводящих к необратимым повреждениям ткани мозга, изучены далеко не в полной мере. Общие принципы лечения поврежденной ткани мозга направлены на устранение дефицита макроэргических фосфатов и экзайтотоксических эффектов возбуждающих аминокислот, ограничение ПОЛ и поддержание антиоксидантных систем, в первую очередь, системы глутатиона [1, 2, 8, 11]. В то же время, мало известно об особенностях метаболических нарушений при разных видах нейродегенерации, что затрудняет поиски адекватных подходов к их специфической метаболической терапии. Исходя из этого, целью наших исследований явилось изучение изменений процессов образования энергии, метаболизма нейроактивных аминокислот и изменений активности системы глутатиона в мозге на фоне нейродегенеративных изменений. В качестве экспериментальных моделей нейродегенерации нами были выбраны модели ишемии мозга, паркинсонических повреждений и алюминиевого нейротоксикоза.

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах линии Wistar CRL: (WI)WUBR массой 180-220 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Моделирование ишемии мозга осуществляли на фоне тиопенталового наркоза (50 мг/кг, в/бр) путем наложения двусторонней лигатуры на общие сонные артерии. Изучение биохимических показателей проводили после 6 ч ишемии. Паркинсонизм моделировали путем введения ротенона (2 мг/кг, в/бр), растворенного в диметилсульфоксиде (ДМСО), на 1, 2, 5 и 6 сутки 1 раз в сутки, с декапитацией животных на 7 сутки эксперимента. В качестве экспериментальной модели болезни Альцгеймера была использована модель алюминиевого нейротоксикоза, в которой на 1 и 3 сутки эксперимента крысам вводили хлористый алюминий

(190 мг/кг, в/бр). Декапитацию животных производили на 14-й день эксперимента.

Для оценки выраженности окислительного стресса измеряли исходный уровень и наработку субстратов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РС) [5]. Восстановленный глутатион (GSH) определяли в реакции с 5, 5'-дителиобис-(2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) по классическому методу [12]. Активность глутатионтрансферазы (ГТ), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПО) измеряли, соответственно, по нижеуказанным методам [6, 12]. Для определения нарушений энергетического метаболизма и метаболизма нейроактивных аминокислот измеряли активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК), ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-Т) и дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ) флуориметрическими методами [7, 9]. Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ) и ГДГ определяли спектрофотометрическими методами [3, 4]. Активности ферментов аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) определяли спектрофотометрически в митохондриальной и цитозольной фракциях ткани мозга по наборам. Белок в гомогенате измеряли по методу Hartree [10]. Достоверность различий оценивали при помощи *t* – критерия Стьюдента.

Было установлено, что ишемия мозга длительностью 6 ч приводила к заметным нарушениям про- и антиоксидантных систем в мозге, которые в данной модели наиболее выражено проявлялись в больших полушариях (табл. 1). При этом наблюдалось повышение исходного уровня ТБК-РС более чем в 2 раза, что сопровождалось достоверными изменениями активности ферментов системы глутатиона: активацией ГПО на 14% и ГР в два раза. Это свидетельствует об активации ПОЛ и усилении метаболизма глутатиона на фоне ишемии мозга. Достаточно серьезные изменения происходили при данной длительности ишемии и в интенсив-

**Таблица 1** – Изменения активности ПОЛ и системы глутатиона в больших полушариях мозга крыс после 6 ч ишемии (n=6; \* - p<0,05)

Показатели	Контроль	Ишемия
ТБК-РС, нмоль/мг белка	2,39 ± 0,41	6,95 ± 1,75*
GSH, мкмоль / г ткани	1,37 ± 0,02	1,35 ± 0,06
ГПО, нмоль / мин*мг белка	43,30 ± 1,28	49,47 ± 2,31*
ГТ, нмоль / мин*мг белка	260 ± 10	270 ± 20
ГР, нмоль / мин*мг белка	21,14 ± 0,19	50,19 ± 1,52*

**Таблица 2** – Изменения активности ферментов энергетического метаболизма и метаболизма глутамата в больших полушариях мозга крыс после 6 ч ишемии (n=6; \* - p<0,05)

Показатели	Контроль	Ишемия
ГДК, нмоль / ч*мг белка	24,13 ± 2,21	32,18 ± 1,43*
ГАМК-Т, нмоль / ч*мг белка	302,9 ± 38,1	221,1 ± 13,4*
ЯПА-ДГ, нмоль / ч*мг белка	720,3 ± 56,0	648,6 ± 45,6
ГДГ, нмоль/мин*мг белка	47,78±1,48	46,66±1,02
СДГ, нмоль/мин*мг белка	22,45±0,81	30,67±1,11*
ОГДГ, нмоль/мин*мг белка	5,21±0,32	9,07±0,18*
м АСТ, нмоль / мин*мг белка	15,18±0,52	24,20±0,15*
ц АСТ, нмоль / мин*мг белка	54,79±1,25	64,34±0,96*
м АЛТ, нмоль / мин*мг белка	2,88±0,15	3,18±0,11
ц АЛТ, нмоль / мин*мг белка	6,44±0,08	4,57±0,09*

ности энергетического метаболизма (табл. 2).

Так, наблюдалось повышение активности ГДК, СДГ, ОГДГ и обеих форм АСТ, тогда как активность цитозольной формы АЛТ и активность ГАМК-Т уменьшились на фоне неизменной активности ГДГ и ЯПА-ДГ. Очевидно, эти изменения можно расценить как проявления активации метаболизма глутамата и интенсивности метаболизма в ЦТК, направленные на поддержание процессов образования энергии в условиях окислительного стресса.

В модели паркинсонизма, обусловленной действием ротенона, уже при первом введении ротенона наблюдались выраженные поведенческие реакции, свидетельствующие о нарушениях метаболизма и высокой токсичности ротенона в использованных нами дозах. Было обнаружено достоверное увеличение активности глутатионредуктазы при введении как ротенона, так и DMSO на фоне отсутствия достоверных изменений активности глутатионпероксидазы и уровня глутатиона в ткани мозга (табл. 3).

Значительно увеличилась также активность ГДК и СДГ, тогда как тенденция к снижению активности ферменты катаболизма ГАМК – ГАМК-Т и ЯПА-ДГ, проявили тенденцию к снижению, а ГДГ достоверно снизила свою активность (табл. 4). Исследование активности трансаминаз показало, что если один DMSO не вызвал изменений их активности, то ротенон повысил активность митохондриальной АСТ, но затормозил ее цитозольную изоформу, практически не оказав влияния на АЛТ.

По-видимому, эти изменения также свидетельствуют об активации ЦТК и усилении энергетичес-

**Таблица 3** – Изменения активности ПОЛ и системы глутатиона в мозге крыс при действии ротенона (n=6; \* - p<0,05)

Показатели	Контроль	DMCO	Ротенон
GSH, мкмоль / г ткани	1,28 ± 0,069	1,37 ± 0,016	1,42 ± 0,043
ГПО, нмоль / мин*мг белка	34,0±2,18	31,74±3,76	32,88±4,64
ГТ, нмоль / мин*мг белка	240 ± 6	220 ± 11	230 ± 7
ГР, нмоль / мин*мг белка	21,83 ± 4,26	32,52±3,53*	33,79 ± 5,44*

**Таблица 4** – Изменения активности ферментов энергетического метаболизма и метаболизма глутамата в мозге крыс при действии ротенона 2 мг/кг, в/бр (n = 6; \* - p<0,05)

Показатели	Контроль	DMCO	Ротенон
ГДК, нмоль / ч*мг белка	1,98±0,12	2,29±0,39	2,63±0,24*
ГДГ, нмоль/мин*мг белка	124,80±6,21	106,00±4,17*	92,45±2,84*
СДГ, нмоль/мин*мг белка	10,61±0,17	12,37±0,57*	14,76±0,46*
ОГДГ, нмоль/мин*мг белка	2,51±0,59	2,19±0,02	1,58±0,5

кого метаболизма при действии ротенона при меньшей степени нарушений антиоксидантной активности в мозге.

Изучение активности ПОЛ и системы глутатиона при действии хлористого алюминия показало, что исходный уровень ТБК-РС и его наработка увеличились, тогда как уровень глутатиона и активность глутатионпероксидазы практически не изменились после введения данного препарата (табл. 5).

**Таблица 5** – Изменения активности ферментов энергетического метаболизма и метаболизма глутамата в мозге крыс при введении хлористого алюминия 190 мг/кг, в/бр (n=6; \* - p<0,05)

Показатели	Контроль	AlCl3
ТБК-РС, нмоль/мг белка	3,63 ± 0,19	5,23 ± 0,3*
Наработка ТБК-РС, нмоль/мг белка	19,93 ± 0,98	24,6 ± 1,19*
ГДК, нмоль / ч*мг белка	29,65 ± 1,32	20,77 ± 1,90*
ГАМК-Т, нмоль / ч*мг белка	376,4 ± 31,7	467,4 ± 43,1*
ЯПА-ДГ, нмоль / ч*мг белка	666,5 ± 45,2	607,6 ± 66,0
м АСТ, нмоль ЩУК/мин*мг белка	16,70±0,31	11,62±0,21*
ц АСТ, нмоль ЩУК/мин*мг белка	21,90±0,87	31,17±0,87*
м АЛТ, нмоль ЩУК/мин*мг белка	3,11±0,09	3,48±0,12
ц АЛТ, нмоль ЩУК/мин*мг белка	6,16±0,05	6,01±0,21

В то же время, активность ГДК оказалась сниженной, а активность ГАМК-Т повышенной при отсутствии изменений активности глутаматдегидрогеназы. Как и при действии ротенона, не произошло сдвигов активности обеих форм АЛТ, тогда как активность митохондриальной изоформы АСТ уменьшилась на 31%, а цитозольной повысилась на 42%.

Следовательно, при действии хлористого алюминия также происходит накопление продуктов ПОЛ, но система глутатиона при этом не задействована. Более слабыми оказались влияние на метаболизм нейроактивных аминокислот и процессы образования энергии.

Таким образом, процессы нейродегенерации, как правило, включают в себя сдвиги активности про- и антиоксидантных систем, а также нарушения энергетического метаболизма в ткани мозга, что свидетельствует о необходимости использования средств метаболической терапии, способствующих поддержанию систем антиоксидантной защиты и процессов образования энергии в мозге, особенно в условиях хронической интоксикации и длительного действия повреждающих факторов.

### Литература

- Болдырев А.А. Механизмы возбуждения, повреждения и гибели нейронов // Природа. – 1998. – № 7. – С. 3-13.
- Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина. – 2001. – 328 с.
- Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г. Определение количества янтарной кислоты и активности СДГ // Методы биохим. исследований. – Л.: изд-во ЛГУ. – 1982. – С. 207-212.
- Караедова Л.М., Островский Ю.М. Погрешности феррицианидного метода определения активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы // Клинич. лабор. диагностика. – 1993. – № 2. – С. 30-35.
- Куклей М.Л., Стволинский С.Л., Шаврацкий В.Х. и др. Перекисное окисление липидов в мозге крыс при ишемии // Нейрохимия. – 1995. – Т. 12, № 2. – С. 28-35.
- Моин И.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 724-727.
- DeBoer Th., Bruinvels J. Assay and properties of GABA-transaminase and SSA-DH rat brain tissue // J. Neurochem. – 1977. – Vol. 28, № 3. – P. 471-478.
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. // Progress in Neurobiology. – 2000. – Vol. 62. – P. 649-671.
- Graham L.T., Aprison M.Y. Distribution of some enzymes associated with the metabolism of glutamate, aspartate, GABA and glutamine in cat spinal cord // J. Neurochem. – 1969. – Vol. 16. – P. 559-566.
- Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. 1972. – Vol. 48. – P. 422-427.
- Łazarewicz J., Salinska E. Exscytotoksycznosc jako mechanizm neurodegeneracji i cel dla strategii terapeutycznych // Neuroprotekcja. XX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN. – 2003. – S. 9-27.
- Rice-Evance CA, Diplock AT, Symons MC. Techniques in free radical research. Elsevier, Amsterdam. – 1991.

Поступила 08.04.09