

БИОХИМИЯ

УДК 612.82+612.273.2

ПОСТНАТАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЛУТАМИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В МОЗГЕ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ГИПОКСИЮ В ПЛОДНОМ ПЕРИОДЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Л.Б. Гадирова, Т.М. Агаев

Институт физиологии им А.И. Караева НАН Азербайджана

Исследовано влияние гипоксии, перенесенной в плодном периоде пренатального развития у крыс, на изменение активности фермента синтеза главного возбуждающего нейротрансммитера – глутамата. Показано изменение активности фосфат-зависимой глутаминазы в различных областях коры головного мозга, гипоталамусе, мозжечке, среднем и продолговатом мозге крыс в разных периодах постнатального онтогенеза.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, мозг, крыса, фосфат-зависимая глутаминаза.

Введение. Гипоксия, перенесенная самкой в различные сроки беременности, является стрессовым фактором, который может привести к нарушению нормального развития нервной системы потомства в постнатальном онтогенезе. Существенность влияний на мозг во внутриутробном периоде увеличивается в связи с тем, что его рост и развитие идет особенно интенсивно именно в этот период онтогенеза [2]. При этом наиболее резкие изменения в головном мозге происходят при действии неблагоприятных факторов в позднем пренатальном онтогенезе в период интеграции всех звеньев нейроэндокринной системы, что сказывается на формировании адаптивного поведения потомства [8; 10].

В позднем пренатальном периоде в различных структурах развивающегося мозга крыс интенсивно происходит процесс миграции, созревания и дифференцировки нейронов, а также установка межклеточных синапсов. Гипоксия в этот период развития может привести к необратимому нарушению механизмов кратковременной и долговременной памяти у взрослых животных. При этом причиной нарушений когнитивных функций мозга в процессе взросления могут быть изменения биохимических показателей и структурной организации нервной ткани различных отделов мозга [1; 3]. Перенесенная в этот период пренатальная гипоксия у детенышей крыс может вызвать стойкое нарушение взаимоотношений между нейронами коры и подкорковыми структурами, а также изменение синаптического аппарата нейронов мозга [1; 2].

Ряд исследований свидетельствует о том, что пренатальный стресс изменяет состояние нейрохимических механизмов головного мозга у взрослых потомков, при этом, как правило, изучались серотонин- и

катехоламинергические системы мозга [6; 14].

Согласно современным представлениям, нарушения функции нервной системы, связанные с участием глутамата, достаточно многообразны [4]. При этом большинство расстройств могут быть обусловлены нарушениями внутриутробного развития [2]. Изучение роли глутамата имеет большое значение в изучении молекулярных механизмов познавательных функций, обучения и памяти. Синтез глутамата в нейронах мозга катализирует фосфат-зависимая глутаминаза, которая участвует в формировании глутаматергической синаптической передачи, а синтезируемый глутамат участвует в процессах нервной регуляции в качестве главного возбуждающего нейромедиатора пирамидных путей и корково-подкорковых связей центральной нервной системы [4; 11].

В настоящее время нет полных данных о характере протекания реакций превращения нейротрансмиттерного глутамата в нервных структурах развивающегося организма после перенесенной пренатальной гипоксии.

Исходя из этого, целью работы было изучение изменения активности глутаминазы в головном мозге крыс в постнатальном онтогенезе, развившихся в нормальных условиях и после воздействия гипоксии в плодном (на 16 – 21-е дни) периоде. При исследовании показателей метаболизма глутамата в данном исследовании показаны реакции различных корковых областей мозга и подкорковых структур – гипоталамуса, мозжечка, среднего и продолговатого мозга одно- и трехмесячных крыс на гипоксическое воздействие в пренатальный период развития.

Материал и методика. Эксперименты проведены на 120 самцах крыс линии Вистар в возрасте 1 и 3 месяца. Животные опытной группы были рождены самками, подвергнутыми действию гипоксии на 16 – 21-е сутки беременности. Срок беременности устанавливали по наличию сперматозоидов в вагинальном мазке самки. Гипоксию создавали в барокамере, вентилируемой смесью газов 5% O₂ и 95% N₂. Гипоксию проводили ежедневно в течение 30 минут. В качестве контроля использовали потомство самок, содержащихся в камере в аналогичные сроки беременности при нормальной концентрации O₂. Исследование проводили на потомстве контрольных и экспериментальных самок. В течение всего периода эксперимента крыс содержали в обычных условиях вивария.

Головной мозг после декапитации крыс был извлечен из черепной коробки, промыт в физиологическом растворе и в условиях гипотермии разделен на структуры согласно стереотаксическому атласу мозга крыс [9; 15]. Гомогенат готовился на 0,32М сахарозе. Фракцию исходных митохондрий выделяли методом дифференциального центрифугирования [7]. Активность глутаминазы (КФ 3.5.1.2) определяли прямым фенол-гипохлоритным методом [5]. Ферментативную активность измеряли в мкмоль образовавшегося N-NH₃ за 1 час инкубации/мг белка митохондрий. Содержание общего белка измеряли по методу Бредфорд [13]. Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считались достоверными при p<0,05.

Результаты и обсуждение. Как показали результаты экспериментов (таблица), в мозге крыс Вистар наибольшая активность фосфатзависимой глутаминазы наблюдается в корковых областях, тогда как в мозжечке и среднем мозге выявлена значительно меньшая активность фермента.

Таблица

Изменение удельной активности глутаминазы в митохондриях различных областей мозга крыс после гипоксии на E16 – E21 (мкмоль N-NH₃ час / мг белка, M±m; n=8)

Структуры мозга	Месячные крысы		Трехмесячные крысы	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Сенсомоторная кора	21,95±2,04	14,47±1,84 P<0,01	29,1±2,98	23,35±1,88 P<0,05
Зрительная кора	22,83±2,59	17,79±2,45 P<0,05	30,2±2,61	27,11±2,79 P>0,05
Орбитальная кора	18,42±1,49	22,23±2,83 P<0,05	26,5±2,79	33,92±3,15 P<0,05
Лимбическая кора	24,56±2,79	29,18±2,35 P<0,05	27,0±1,34	24,40±2,45 P>0,05
Гипоталамус	17,26±1,36	15,71±1,84 P>0,05	24,2±1,45	17,74±2,40 P<0,05
Мозжечок	10,77±1,68	14,64±2,75 P<0,05	13,54±4,50	14,78±2,76 P>0,05
Средний мозг	11,70±2,26	12,51±1,84 P>0,05	15,45±3,19	15,87±2,45 P>0,05
Продолговатый мозг	15,36±1,68	16,75±1,93 P>0,05	19,98±2,57	18,27±2,84 P>0,05

Согласно полученным результатам, у месячных детенышей крыс, перенесших гипоксию в плодный период пренатального развития, в митохондриях различных структур головного мозга наблюдаются разнонаправленные изменения активности глутаминазы. Так, в митохондриях орбитальной, лимбической коры и мозжечка наблюдается возрастание активности фосфат-зависимой глутаминазы на 21%, 18% и 36% (p<0,05), соответственно, по сравнению с контролем. В зрительной и сенсомоторной коре отмечается снижение ферментативной активности на 22% (p<0,05) и 35% (p<0,01) по сравнению с контрольной группой животных. В гипоталамусе, среднем и продолговатом мозге изменения статистически недостоверны (p>0,05).

В трехмесячном периоде постнатального онтогенеза у крыс, перенесших гипоксию на 16 – 21-е сутки пренатального развития, наблюдается изменение удельной активности фосфат-зависимой глутаминазы, при этом в

некоторых структурах мозга отмечается тенденция к стабилизации ферментативной активности (таблица). Обнаружено повышение глутаминовой активности в орбитальной коре на 28% ($P < 0,05$), снижение в сенсомоторной коре на 20% ($P < 0,05$) и гипоталамусе – на 27% ($P < 0,05$). В мозжечке, среднем и продолговатом мозге, зрительной и лимбической коре наблюдаемые показатели активности фермента приближаются к данным контрольной группы животных.

Учитывая, что в мозге млекопитающих глутамат обладает нейромедиаторной активностью, понижение глутаминовой активности указывает на снижение потенциальных возможностей глутаматергической передачи в исследованных структурах мозга пренатально гипоксированных крыс. Кроме того, вызванные пренатальной гипоксией сдвиги показателей глутаминовой активности влияют на метаболизм глутамата, участвующего в биосинтезе ГАМК, аспартата и глутатиона, а также в энергетическом обмене клетки [12].

Исходя из полученных данных, наблюдаемое наибольшее повышение активности глутаминазы в мозжечке опытных крыс может быть связано с активацией как глутамат-, так и ГАМК-ергической систем и является адаптационно-компенсаторной реакцией мозга.

Гипоксия, перенесенная в плодный период, впоследствии, на разных этапах онтогенеза, нарушая нейромедиаторную деятельность сенсомоторной коры, может привести к изменению развития двигательного поведения в первый месяц постнатального онтогенеза, а изменения в орбитальной и лимбической коре могут сказаться на когнитивных функциях молодых и взрослых (половозрелых) крыс.

Таким образом, пренатальная гипоксия влияет на функциональное состояние нервных клеток, что в конечном итоге приводит к ряду изменений в обмене нейромедиаторного глутамата в раннем постнатальном онтогенезе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Журавин И.А. Структурные изменения в нервной ткани новой коры в онтогенезе крыс после гипоксии на разных сроках эмбриогенеза // Эволюционная биохимия и физиология. 2008. Т. 44, №3. С.258 – 266.
2. Граф А.В., Гончаренко Е.Н., Соколова Н.А., Ашмарин И.П. Антенатальная гипоксия: участие в развитии патологий ЦНС в онтогенезе // Нейрохимия. 2008. Т. 25. С.11 – 16.
3. Журавин И.А., Дубровская Н.М., Туманова Н.Л. Постнатальное физиологическое развитие крыс после острой пренатальной гипоксии // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89, №5. С.522 – 532.
4. Курбат М.Н. L-Глутамат: современный взгляд на известную аминокислоту // Нейрохимия. 2009. Т.26, №3. С.202 – 207.
5. Магарламов А.Г., Заикин А.А., Беляева Л.В. Прямой фенолгипохлоритный метод определения глутаминовой активности // Украинский биохимический журн. 1979. Т. 51, №5. С.549 – 551.

6. Маслова М.В., Граф А.В., Маклакова А.С. Сравнительный анализ изменений содержания биогенных аминов в ЦНС и поведения у взрослых крыс, перенесших прогестационную гипоксию: коррекция комбинацией пептидов // Нейрохимия. 2004. Т. 21, №1. С.39 – 43.
7. Осадчая Л.М. Выделение субклеточных фракций из мозга крыс // Методы биохимических исследований. Л., 1982. С.36 – 37.
8. Резников А.Г. Перинатальная модификация развития нейроэндокринной системы: феномены и механизмы // Проблемы эндокринологии. 2004. Т. 50, №4. С.42 – 48.
9. Светухина В.М. Цитоархитектоника новой коры мозга в отряде грызунов // Архив анатомии, эмбриологии и гистологии. 1968. Т. 42, №2. С.31 – 45.
10. Шаляпина В.Г., Зайченко И.Н., Ордян Н.Э., Батуев А.С. Изменение нейроэндокринной регуляции приспособительного поведения крыс после стресса в позднем пренатальном онтогенезе // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2001. Т. 57, № 9. С. 1193 – 1201.
11. Daikhin Y., Yudkoff M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia // J. of Nutrition. 2000. V. 130. P. 1026 – 1031.
12. Holten A.T., Gundersen V. Glutamine as a precursor for transmitter glutamate, aspartate and GABA in the cerebellum: a role for phosphate-activated glutaminase // J. Neurochemistry. 2008. V. 104. P. 1032 – 1042.
13. Kruger N.J. The Bradford method for protein quantitation // The Protein Protocols Handbook / Ed J.M. Walker. NY, 2002. P. 15 – 21.
14. Moyer J.A., Herrenkohl L.R., Jacobowitz D.M. Stress during pregnancy: effect on catecholamines in discrete brain regions of offspring as adults // Brain Res. 1978. V. 144, №1. P. 173 – 178.
15. Pellegrino L.J., Pellegrino A.S., Cushman A.J. A stereotaxic atlas of the rat brain. NY, 1979.

**POSTNATAL CHANGES OF GLUTAMINASE ACTIVITY
IN THE BRAIN OF RAT EXPOSED TO HYPOXIA
IN FETAL PERIOD OF PRENATAL ONTOGENESIS**

L.B. Gadirova, T.M. Agayev

Garayev Institute of Physiology of Azerbaijan National Academy of Science

The impact of prenatal hypoxia in fetal period on activity of enzyme producer of the main exciting neurotransmitter – glutamate is investigated. Change of phosphate-activated glutaminase activity in various areas of cerebral cortex, hypothalamus, cerebellum, mesencephalon and myelencephalon of rats at different stages of postnatal development is revealed.

Key words: prenatal hypoxia, brain, rat, phosphate-dependent, phosphate-activated glutaminase.