УДК 616.8-005:577.175

Н.З. Башун

Ферменты метаболизма ГАМК в мозге при экспериментальной ишемии и реперфузии

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 [1, 2]. Изменение скорости синтеза и распада метаболитов системы ГАМК является существенным моментом в нарушении деятельности ЦНС при различных патологических состояниях [3].

ГАМК (γ-аминомасляная кислота) – высокоспецифическое для мозговой ткани соединение, концентрация которого в разных областях мозга колеблется в пределах от 2 до 10 мкмоль/г ткани. Не менее 50% синаптических контактов мозга являются ГАМК-ергическими.

Синтез ГАМК происходит в нервных окончаниях (нейрональный компартмент) из глутамата с участием глутаматдекарбоксилазы (ГДК) (рис.). После выделения в синаптическую щель ГАМК захватывается астроцитами (глиальный компартмент), где происходит ее деградация до янтарного полуальдегида (ЯПА) с участием ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-Т). Глутамат астроглии трансформируется в глутамин и транспортируется в нервные окончания, где вновь образуется глутамат в качестве резерва для синтеза ГАМК. Значительная часть ГАМК возвращается из синаптической щели в пресинаптическое окончание с помощью системы обратного захвата. ЯПА под действием дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ) окисляется в янтарную кислоту, которая далее метаболизируется через ЦТК. ЯПА-ДГ тесно взаимодействует с ГАМК-Т, образуя единый биохимический компартмент в клетке, ответственный за утилизацию ГАМК.

ГАМК-шунт представляет собой, по-видимому, связующее звено между двумя компартментами клетки, в одном из которых аминокислота синтезируется, а в другом – утилизируется.

Реакция на недостаток кислорода в мозговой ткани связана с возможностями энергетического обмена мозга. Ведущим повреждающим фактором при ишемическом инсульте является гипоксия – состояние недостаточного кислородного снабжения клетки. Гипоксия, в зависимости от ее тяжести, приводит к снижению аэробной энергопродукции и к дефициту макроэргов (АТФ и креатинфосфата). Гликолиз как альтернативный путь энергообеспечения не играет для нервной ткани существенной роли в поддержании запасов АТФ в компенсаторной фазе гипоксии и в случае ее декомпенсации. При ингибировании основного пути окисления в дыхательной цепи активируется *сукцинатоксидазный путь*, который в течение ограниченного времени позволяет поддерживать на определенном уровне окислительное фосфорилирование и, сле-

довательно, продукцию макрозргов [4]. Возможность дополнительной регуляции энергопродукции ЦТК в мозге с помощью ГАМК-шунта свидетельствует об особой его роли при экстремальных состояниях ЦНС [3]. «Кислородный голод» уже на ранних стадиях гипоксии приводит к возникновению «субстратного голода», т.е. к невозможности окисления энергетического субстрата при его наличии Последнее же является характерной чертой ишемии. Таким образом, образуется порочный круг: ишемия – гипоксия – ишемия [4, 5].

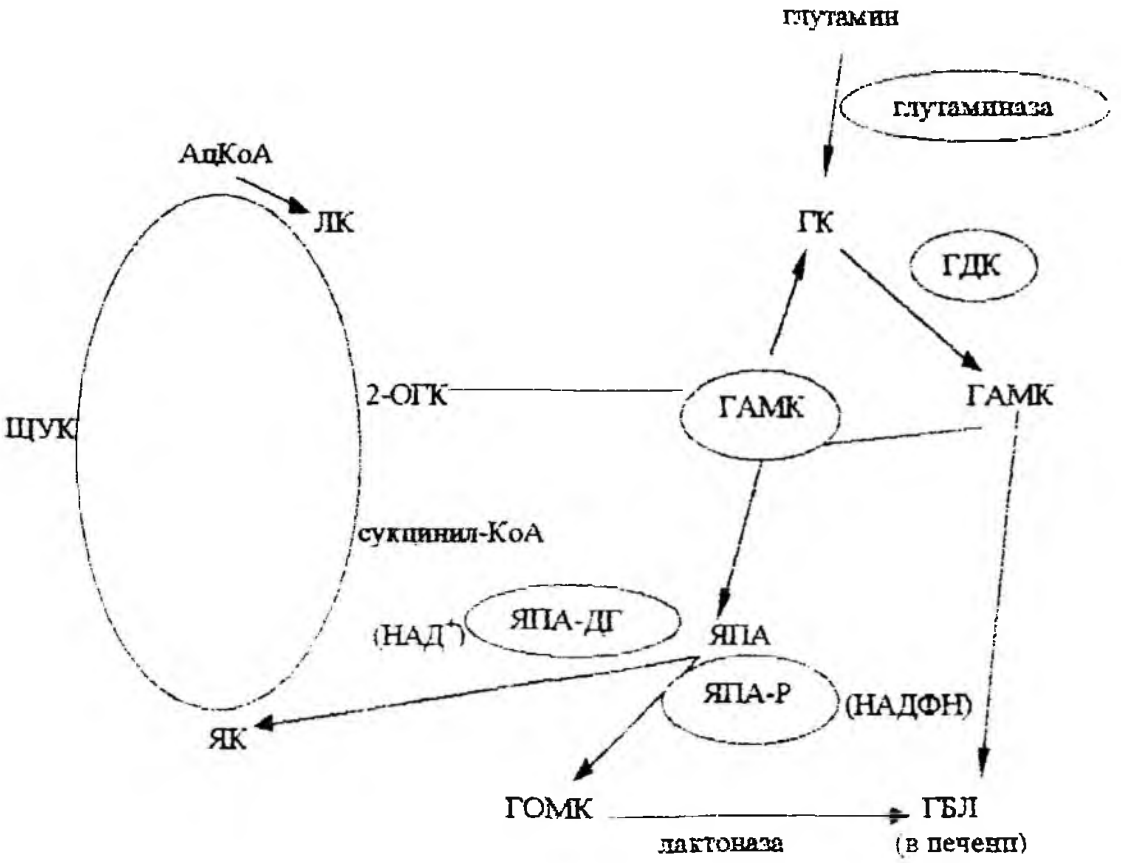

Рис. Схема ГАМК-шунта
(Сытинский И.А.,1977; Hellevuo,1990; Hassel at al.,1998)

Быстрое восстановление кровообращения в мозге приводит к развитию так называемого постишемического реперфузионного синдрома (ПРС), обусловленного возобновлением потока кислорода в ишемизированную ткань на фоне уже имеющегося повреждения компонентов дыхательной цепи, а также снижением местных и общих механизмов антиоксидантной защиты (АОЗ) [6, 7].

На первых этапах ишемии метаболические расстройства обратимы, и при восстановлении либо коллатеральной компенсации кровотока пострадавший участок мозга возобновляет работу, симптомы исчезают, что наблюдается у больных с преходящими нарушениями мозгового кровообращения. При восстановлении оксигенации степень повреждения нейронов, обусловленная гипоксией, в значительной мере зависит от того, постепенно или быстро происходит это восстановление, в какой степени снижаются явления остро развивающейся гипероксии.

В связи с вышеизложенным следует отметить, что целью настоящего исследования явилась оценка изменений активности ферментов метаболизма ГАМК в больших полушариях мозга в различные сроки ишемии и реперфузии.

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г., содержавшихся в стандартных условиях вивария. В каждой из подопытных групп находилось по 8 особей. Моделирование ишемии мозга осуществляли на фоне тиопенталового наркоза (50 мг/кг, в/бр) путем накладывания двусторонней лигатуры на общие сонные артерии. Реперфузия мозга происходила после снятия лигатур и восстановления тока крови к головному мозгу. Контрольным животным производили ложную операцию на фоне тиопенталового наркоза.

После декапитации крыс быстро извлекали мозг, выделяли большие полушария мозга, которые немедленно замораживали в жидком азоте. В гомогенатах определяли активность ферментов ГАМК-шунта. Активность глутаматдекарбоксилазы (ГДК, L-глутамат-карбоксилазы, НФ 4.1.1.15,) определяли флуориметрическим методом [8], ГАМК-аминотрансферазы (ГАМК-Т, 4-аминобутират-2-оксоглутарат-аминотрансфераза, НФ 2.6.1.19) и дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ, НФ 1.2.1.24) также определяли флуориметрическим методом с небольшими модификациями [9].

Содержание белка определяли по методу Лоури [10]. Активность ферментов ГАМК-шунта выражали в нмоль субстрата /мг белка · час. Полученные результаты оценивали с помощью t-теста.

Наиболее распространенной моделью ишемии головного мозга является окклюзионная, связанная с перевязкой каротидных артерий, однако достаточно полная ишемия больших полушарий достигается только у монгольских песчанок ввиду отсутствия у них артерий Виллизиевого круга. Известна странгуляционная модель ишемии головного мозга у кроликов, связанная с наложением манжеты, однако она плохо реализуется на мелких животных. Односторонняя окклюзия одной сонной артерии у крыс вызывает обратимые повреждения корковых структур с элементами компенсаторного характера, что связано с включением механизмов коллатерального кровообращения. Чтобы уменьшить явления компенсации, нами была выбрана модель двусторонней перевязки общих сонных артерий. В этом случае от 15 до 60% животных погибает в течение 24 часов после перевязки артерий. 100% гибели животных не наблюдается, так как у крыс существуют базилярные паравертебральные артерии, которые могут в определенной мере компенсировать развивающуюся недостаточность кровоснабжения. В то же время большой процент гибели животных свидетельствует о высокой степени нарушения поступления крови в мозг. Данные литературы, а также наши исследования показали, что основные морфологические нарушения и изменения биохимических показателей после перевязки общих сонных артерий наблюдаются в больших полушариях, тогда как в других структурах эффект ишемии проявляется в меньшей степени (ствол) или вовсе не заметен (гиппокамп, мозжечок). Вследствие этого нами проводилось изучение биохимических показателей именно в больших полушариях мозга.

Данные, полученные в предварительных экспериментах, свидетельствуют, что уже после 30 минут ишемии отмечаются достоверные изменения активности некоторых ферментов ГАМК-шунта [11]. В частности, наблюдается снижение активности ГДК. Через 60 минут угнетение ГДК сохраняется. Активность ЯПА-ДГ снижается только при 60-минутной ишемии, а активность ГАМК-Т не изменяется. Последующая реперфузия в течение 1 часа приводит к нормализации ГДК и ЯПА-ДГ, но несколько снижает активность ГАМК-Т.

В настоящих исследованиях, с учетом важности соотношения длительности ишемического и реоксигенационного периодов в развитии ПРС, нами использованы более продолжительные сроки ишемии и реперфузии. При ишемии, которая длится 2 часа, способность ткани к синтезу и катаболизму ГАМК усиливается (табл.1), что свидетельствует о повышении интенсивности метаболизма ГАМК в мозге через ГАМК-шунт. После 24-часовой ишемии наблюдается значительное снижение активности всех ферментов ГАМК-шунта ниже контрольных значений.

Таблица 1

Активность ферментов ГАМК-шунта (нмоль/мг белка х час) в больших полушариях мозга крыс при 2- и 24-часовой ишемии

Большие полушария	ГАМК-Т (нмоль НАДН / мг белка · час)	ЯПА-ДГ (нмоль НАДН / мг белка · час)	ГДК (нмоль / мг белка · час)
Ишемия 2 часа	204,00 ± 3,11*	761,17 ± 5,72*	27,96 ± 0,49*
Ишемия 24 часа	165,00 ± 2,48*	434,33 ± 5,14*	11,72 ± 0,33*
Контроль	180,45 ± 2,01	669,88 ± 3,91	23,91 ± 0,06

* – $p < 0,05$ различия между контрольной и опытными группами

При продолжительности ишемии 3 часа (табл. 2) активность ферментов метаболизма ГАМК остается практически на уровне контроля, тогда как при 6-часовой ишемии активность ферментов катаболизма ГАМК (ГАМК-Т и ЯПА-ДГ) снижена, а активность ГДК, ответственной за синтез ГАМК, повышена, что свидетельствует о том, что ишемия продолжительностью 6 часов является тем пиком, где потенциал наработки ГАМК достигает максимального уровня (табл. 2).

Таблица 2

Активность ферментов ГАМК-шунта (нмоль/мг белка х час) в больших полушариях мозга крыс при ишемии и реперфузии

Большие полушария	ГАМК-Т (нмоль НАДН / мг белка · час)	ЯПА-ДГ (нмоль НАДН / мг белка · час)	ГДК (нмоль / мг белка · час)
Ишемия 6 часов	132,08 ± 0,49*	199 ± 3,11*	18,34 ± 0,07*
Ишемия 6 часов + реперфузия 3 часа	179,97 ± 2,15*	243,07 ± 2,19*	11,65 ± 0,18*
Ишемия 3 часа	202,69 ± 2,66	214,25 ± 1,55*	14,85 ± 0,11*
Контроль	203,46 ± 1,01	228,47 ± 2,31	14,14 ± 0,11

* – $p < 0,05$ различия между контрольной и опытными группами

Изучение показателей метаболизма ГАМК в больших полушариях мозга также показывает наличие выраженных изменений ферментов ГАМК-шунта и на фоне ишемии, и в ходе последующей реперфузии ткани. Первоначальное (через 2 часа) повышение активности ферментов метаболизма ГАМК способствует компенсаторному усилению энергетического метаболизма в ткани мозга в условиях ограни-

чения поступления кислорода. Однако при более длительной ишемии, очевидно, происходит истощение компенсаторных возможностей, и интенсивность метаболизма через ГАМК-шунт падает ниже контрольных значений.

На основе полученных данных можно утверждать, что нарушение притока крови в мозг вследствие окклюзии обеих общих сонных артерий немедленно сказывается на активности ГАМК-шунта. Изменения активности ферментов метаболизма ГАМК зависят от длительности ишемии. С другой стороны, активность ферментов синтеза ГАМК и ее катаболизма на фоне реперфузии меняется противоположным образом.

Можно полагать, что активация ГАМК-системы при ишемии и реперфузии мозга приводит к ограничению стресс-реакции и стрессорных повреждений. Роль ГАМК-системы как фактора, уменьшающего проявления окислительного стресса в головном мозге, общеизвестна. Поэтому эффективными фармакологическими средствами для лечения повреждений тканей мозга, развивающихся при ишемии и реперфузии, должны быть препараты, активирующие функцию ГАМК-ергической системы или дублирующие ее. В этом плане обращает на себя внимание возможность применения препаратов янтарной кислоты [5, 12]. Коррекция ишемических стрессорных повреждений с помощью данных фармакологических препаратов – предмет наших будущих исследований.

Работа выполнена на базе лаборатории коферментов Института биохимии НАН РБ (зав. лаб. – д.б.н., профессор, чл.-корр. НАН Беларуси А.Г. Мойсеенок) благодаря финансовой поддержке ФФИ РБ (грант БОО-237).

ЛИТЕРАТУРА

1. ***Auer R.N., Siesjo B.K.*** Baillires. clin. endocrinol. Metab., 1993. V. 7, N. 3. P. 611-625.
2. ***Хухо Ф.*** Нейрохимия. Основы и принципы. М., 1990. С. 229-331.
3. ***Розанов В.А., Цепколенко В.А., Левицкий М.В. и др.*** // Физиол. ж., 1991, т. 37, № 5. С. 3-11.
4. ***Кондрашева М.Н.*** // Биохимия, 1991, т. 56, вып. 3. С. 388-405.
5. ***Кондрашева М.Н.*** // Фармакокоррекция гипоксич. состояний. М., 1989. С. 51-66.
6. ***Лапша В.И., Бочарова В.Н., Горбачев В.В. и др.*** // Функц. роль монооксида азота и пуринов. Мн., 2001. С. 90-95.
7. ***Globus M.G.T., Busto R., Martinez E. et al.*** // J. Neurochem., 1991. V. 57, № 2. P. 470-478.
8. ***Graham L.T., Aprison M.H.*** // J. Neurochem., 1969. V. 16. P. 559-566.
9. ***DeBoer Th., Bruinvels J.*** // J. Neurochem., 1977. V. 28. P. 471-478.
10. ***Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A .L. et al.*** // J. Biol. chem., 1951. V. 193. P. 265- 275.
11. ***Канунникава Н.П., Башун Н.З., Шалавіна А.Г. і інш.*** // Весці НАН Беларусі, 2002, № 2, С. 59-61.
12. ***Кондрашева М.Н.*** // В сб.: Терапевтическое действие янтарной кислоты. Пущино, 1976. С. 137-140.

SUMMARY

The activities of GABA-bypath enzymes - GABA transaminase, succinic semialdehyde dehydrogenase, glutamate decarboxylase in the rat brain hemispheres following ischemia and reperfusion is considered in the article. The author states that most remarkable decrease of GABA metabolism was observed after 24h of ischemia, that proves active participation of the GABA-bypath in compensational reactions in maintaining energy metabolism under brain ischemia and reperfusion.

Поступила в редакцию 19.12.2002