

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА ГЛУТАМАТА В МОЗГЕ ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ГИПОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

В.Р. Хаирова, Л.Б. Гадирова

*Институт Физиологии имени академика Абдуллы Гараева Национальной Академии Наук Азербайджана, ул. Шарифзаде, 78, AZ1100, Баку, Азербайджан*

E-mails: venerakhairova@yahoo.com, leylakb@yahoo.com

В работе исследовалось влияние пренатальной гипоксии различной степени тяжести на активность ключевых ферментов глутаматного обмена – глутаминазы и глутаминсинтетазы в различных областях мозга крыс. Была выявлена обратная корреляция в активности ферментов глутамат-глутаминового цикла в большом мозге потомства крыс, переживших влияние различных режимов гипоксического воздействия в период органогенеза пренатального развития. На фоне снижения активности глутаминсинтетазы отмечается повышение активности глутаминазы в структурах большого мозга 17-дневных крысят. Причем, характер изменения ферментативной активности зависит от степени тяжести гипоксического воздействия. Следовательно, пренатальная гипоксия приводит к нарушению метаболизма глутамата в большом мозге и создает условия для его накопления в нервных клетках. Данные нарушения, возможно, обусловлены изменениями механизмов обратного захвата и утилизации глутамата или повреждением структуры ферментов, и приводят в итоге к нарушениям глутаматергической передачи.

**Ключевые слова:** пренатальная гипоксия, глутамат, мозг, крыса

### ВВЕДЕНИЕ

Создание экспериментальных моделей воздействия на организм неблагоприятных факторов внешней среды, а также разработка методов профилактики и лечения последствий этих воздействий, является важным направлением в медицине, физиологии и биохимии. На сегодняшний день важной проблемой является изучение влияния различной степени тяжести гипоксии на организм как в пре-, так и постнатальном онтогенезе. Доказано, что

пренатальная гипоксия приводит к аномалиям развития, пре-, пери- и постнатальной смертности, а также к отдаленным последствиям в виде нарушения когнитивно-мнестических, функций, обусловленных индуцированными гипоксией нарушениями процессов пролиферации, дифференциации и миграции нейробластов [2, 10].

Отмечается, что в условиях гипоксии происходит нарушение нейромедиаторного обмена, приводящее к глутаматной эксайтотоксичности, обусловленное как

нарушением процессов захвата глутамата и связывания его с рецепторами, так и с активностью специфических ферментов нейромедиаторного пула глутамата [1, 7].

Глутаминаза – это в основном энзим нервных клеток, который синтезирует нейротрансмиттерный глутамат и  $\text{NH}_3$ . Глутаминсинтетаза часто используется как маркер, специфичный для клеток астроглии, основная роль которых - защита нейронов от избытка аммония и глутамата [3].

Исходя из вышеизложенного, целью представленной работы являлось изучение активности глутаминсинтетазы и глутаминазы в структурах большого мозга 17-дневного (период прозревания) потомства крыс-самок, подвергнутых гипоксическому воздействию различной интенсивности в период органогенеза пренатального развития.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА**

Все экспериментальные процедуры с животными выполнялись по международным правилам и нормам (European Communities Council Directives, 86/609/ЕЕС).

Объект исследования – контрольное и пренатально гипоксированное 17-дневное потомство крыс. Материал исследования – митохондриальная фракция гипоталамуса, коры большого мозга, мозжечка, продолговатого и среднего мозга.

Экспозицию гипоксической гипоксии осуществляли в барокамере, куда помещали беременных самок-крыс (на 9-15 дни беременности, которые соответствуют периоду органогенеза) из 2-х экспериментальных групп: 1 группа: самки крыс, подвергнутых гипоксии смесью газов  $10\% \text{O}_2$  и  $90\% \text{N}_2$  в течение недели с экспозицией 1 час. 2 группа: самки крыс, подвергнутых гипоксии смесью газов  $15\% \text{O}_2$  и  $85\% \text{N}_2$  в течение недели с экспозицией 1 час.

Контрольные особи также помещались в барокамеру в соответствующий срок беременности, но при свободном поступлении  $\text{O}_2$ , содержащегося в воздухе.

По завершении воздействия гипоксии крысы находились в обыкновенных условиях вивария до рождения потомства. Гибель животных не отмечалась ни в одной группе животных.

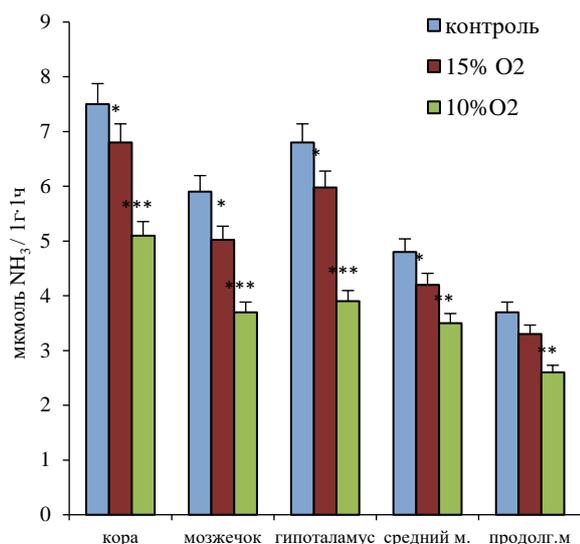
Потомство, полученное от контрольной и экспериментальной групп, было использовано для биохимических определений по достижении им 17-дневного возраста.

После декапитации контрольных и опытных крысят их мозг был разделен в условиях гипотермии на следующие структуры: гипоталамус, кора, мозжечок, продолговатый и средний мозг. Активность глутаминсинтетазы (КФ 6.3.1.2) определялась по методу [9], активность глутаминазы (КФ 3.5.1.2) – по методу [8] в митохондриальной фракции, полученной из гомогената методом дифференциального центрифугирования [5].

Полученные данные были обработаны статистически с применением t-критерия Стьюдента в программе Statistics for Windows и Microsoft Excel.

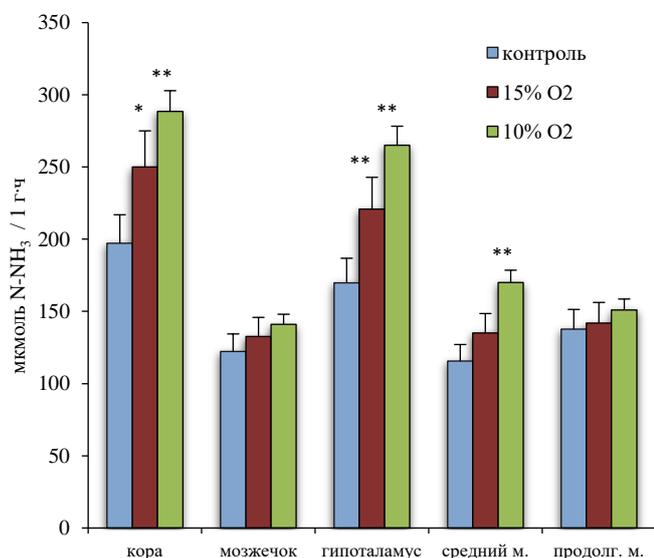
## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Согласно полученным результатам, у 17-дневного потомства крыс, переживший два режима гипоксии ( $10\% \text{O}_2$  и  $15\% \text{O}_2$ ), отмечается разнонаправленная динамика активности ферментов глутаматного метаболизма. Так, у крысят, подвергнутых гипоксии смесью газов  $10\% \text{O}_2 + 90\% \text{N}_2$ , выявлено снижение глутаминсинтетазной активности в коре мозга - на 32%, мозжечке и гипоталамусе, соответственно, на 37% и 42% по сравнению с контрольными показателями. В другой группе животных, которым предъявлялась умеренная гипоксия  $15\% \text{O}_2 + 85\% \text{N}_2$ , также наблюдается снижение активности глутаминсинтетазы, однако, по сравнению с первой группой животных, это снижение менее выражено. Так, в коре мозга активность падает на 19%, в мозжечке и гипоталамусе, соответственно, на 15% и 12% относительно контроля (Рис. 1).



**Рисунок 1.** Изменение общей активности глутаминсинтетазы в структурах большого мозга 17-дневных крыс, переживших различные режимы гипоксического воздействия (10% O<sub>2</sub>+90% N<sub>2</sub> и 15% O<sub>2</sub>+85% N<sub>2</sub>) в период органогенеза пренатального развития.

\* - p<0.05; \*\* - p<0.01; \*\*\* - p<0.001



**Рисунок 2.** Динамика общей активности глутаминазы в структурах большого мозга 17-дневных крыс, после воздействия различных гипоксических режимов (10% O<sub>2</sub>+90% N<sub>2</sub> и 15% O<sub>2</sub>+85% N<sub>2</sub>) в период органогенеза.

\* - p<0.05; \*\* - p<0.01

После воздействия пренатальной гипоксии различной степени тяжести в изучаемых структурах мозга 17-дневных крысят отмечается достоверное повышение активности глутаминазы, что может свидетельствовать об увеличении синтеза нейротрансмиттерного глутамата (Рис. 2).

Так, воздействие 10% O<sub>2</sub>+90% N<sub>2</sub> гипоксии в период органогенеза приводит к повышению активности глутаминазы в коре больших полушарий, гипоталамусе и среднем мозге на 46; 56 и 47%, соответственно. Воздействие 15% O<sub>2</sub>+85% N<sub>2</sub> гипоксии приводит к менее выраженному повышению ферментативной активности в коре и гипоталамусе на 27 и 30%, соответственно.

Причина изменения активности глутаминсинтетазы и глутаминазы в структурах большого мозга гипоксированных крыс возможно связана с особенностями глутаматного метаболизма. Вследствие гипоксии истощается метаболический пул глутамата, что можно рассматривать как компенсаторно-приспособительную реакцию, направленную на ускорение его утилизации с целью энергообеспечения нейронов. При этом наблюдается существенное повышение содержания аммиака в нервной ткани [4]. Увеличение нейротрансмиттерного глутамата в мозге может привести к глутаматной эксайтотоксичности и рассматривается в качестве ведущего фактора гибели нервных клеток при гипоксическом воздействии [7]. Эксайтотоксический эффект глутамата обусловлен не только резким и значительным выбросом глутамата, но и нарушением механизмов его обратного захвата [11]. Это подтверждается снижением активности глутаминсинтетазы, участвующей в утилизации глутамата, предотвращении эксайтотоксичности, и в процессах детоксикации аммиака [3].

## ВЫВОДЫ

Таким образом, можно заключить, что выраженные колебания уровня глутамата, глутамина и аммиака в мозге в результате

перенесенной пренатальной гипоксии являются следствием изменения активности глутаминазы и глутаминсинтетазы. Причина снижения активности глутаминсинтетазы, возможно, связана с изменением структуры фермента в результате окислительного стресса. Увеличение активности глутаминазы – ассоциировано с глутаматной нейротоксичностью. При этом, независимо от конкретных механизмов, изменение активности ферментов глутаматного обмена может иметь значение в нарушении глутаматергической трансмиссии в мозге в результате перенесенной гипоксии.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Əliyeva N.N. Orqanogenez dövründə hipoksiyaya məruz qalmış siçovulların erkən postnatal ontogenezdə baş beyinin müxtəlif strukturlarında QAYT-T fermentinin fəallığı. *Azərbaycan Fiziologiya Jurnalı*. 2016;34:60-65.  
Aliyeva NN. [Activity of the enzyme GABA-T in various brain structures in early postnatal ontogenesis of rats exposed to hypoxia during organogenesis]. *Azerbaij. J. Physiol.* 2016;34:60-65.
- [2] Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Роль эксайтотоксичности в патогенезе повреждений головного мозга при ишемии. *Вестник СГМА* 2019;18(1):67-72.  
Bon EI, Maksimovich NE. [The role of excitotoxicity in the pathogenesis of brain damage during ischemia]. *Vestnik of SSMA* 2019;18(1):67-72.
- [3] Anlauf E, Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Oct 16;4:144. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00144>.
- [4] Cooper AJ. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in cerebral ammonia homeostasis. *Neurochem Res*. 2012 Nov;37(11):2439-55. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0803-4>.
- [5] Chinopoulos C, Zhang SF, Thomas B, Ten V, Starkov AA. Isolation and functional assessment of mitochondria from small amounts of mouse brain tissue. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2011;793:311-324. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-328-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-328-8_20).
- [6] Jayakumar AR, Norenberg MD. Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders. *Adv Neurobiol*. 2016;13:327-350. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_13).
- [7] Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010 Jul;460(2):525-42. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0809-1>.
- [8] Magarlamov AG, Zaikin AA, Beliaeva LV. [Direct phenol-hypochlorite method for determining glutaminase activity]. *Ukr Biokhim Zh (1978)*. 1979 Sep-Oct;51(5):549-51.
- [9] Silakova AI, Trush GP, Iaviliakova A. [A micromethod of ammonia and glutamine in trichloroacetic acid tissue extracts]. *Vopr Med Khim*. 1962 Sep-Oct;8:538-44. Russian.
- [10] Vetrovoy O, Stratilov V, Nimiritsky P, Makarevich P, Tyulkova E. Prenatal hypoxia induces premature aging accompanied by impaired function of the glutamatergic system in rat hippocampus. *Neurochem Res*. 2021 Mar;46(3):550-563. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03191-z>.
- [11] Xin W, Mironova YA, Shen H, Marino RAM, Waisman A, Lamers WH, Bergles DE, Bonci A. Oligodendrocytes support neuronal glutamatergic transmission via expression of glutamine synthetase. *Cell Rep*. 2019 May 21;27(8):2262-2271.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.094>.

## **PRENATAL DÖVRDƏ MÜXTƏLİF REJİMLİ HİPOKSIYADAN SONRA BAŞ BEYİNDƏ QUTAMAT MÜBADİLƏSİNİN FERMENTLƏRİNİN FƏALLIĞININ TƏDQIQI**

**Venera Ramiz qızı Xairova, Leyla Bağdad qızı Qədirova**

*Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyasının akademik Abdulla Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu, Bakı, Azərbaycan*

Bu işdə siçovulların beyinin müxtəlif nahiyələrində qlutamatın mübadiləsinin əsas fermentləri olan qlutaminaza və qlutaminsintetazanın fəallığına müxtəlif səviyyəli prenatal hipoksiyanın təsiri öyrənilmişdir. İşdə müxtəlif səviyyəli prenatal hipoksiyanın təsirindən sonra siçovulların baş beyinin müxtəlif nahiyələrində qlutaminaza və qlutaminsintetazanın fəallığı tədqiq edilmişdir. Prenatal inkişafın orqanogenez dövründə müxtəlif səviyyəli hipoksiyanın təsirindən sonra siçovulların nəslinin beyində qlutamat-qlutamin tsiklinin fermentlərinin fəallığında tərs korrelyasiya müəyyən olunmuşdur. Qlutaminsintetazanın fəallığının azalması fonunda 17 günlük siçovul balalarının beyin strukturlarında qlutaminazanın fəallığının artması qeyd olunmuşdur. Üstəlik, fermentativ fəallığın dəyişməsinin dərəcəsi hipoksik təsirin şiddətindən asılıdır. Nəticədə, prenatal hipoksiya beyində qlutamat mübadiləsinin pozulmasına gətirib çıxarır və onun sinir hüceyrələrində toplanmasına şərait yaradır. Bu pozulmalar, güman olunur ki, qlutamatın geri alınması və istifadəsi mexanizmlərindəki dəyişikliklər və ya fermentlərin strukturunun zədələnməsi nəticəsində yaranır və nəticədə qlutamatergik ötürülmənin pozulmasına səbəb olur.

**Açar sözlər:** prenatal hipoksiya, qlutamat, beyin, siçovul

## **THE ACTIVITY OF ENZYMES OF GLUTAMATE METABOLISM IN THE BRAIN FOLLOWING EXPOSURE TO PRENATAL HYPOXIA OF VARYING SEVERITY**

**Venera Ramiz Khairova, Leyla Baghdad Gadirova**

*Academician Abdulla Garayev Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan*

The effect of prenatal hypoxia of varying severity on the activity of glutaminase and glutamine synthetase in various rat brain regions was studied in this work. The study revealed an inverse correlation in the activity of enzymes of the glutamate-glutamine cycle in the brain of rat offspring that survived the influence of hypoxic exposure in various severity during the period of organogenesis of prenatal development. Against the background of a decrease in glutamine synthetase activity, an increase in glutaminase activity in the brain structures of 17-day-old rat pups was noted. Moreover, the nature of the change in enzymatic activity depended on the severity of the hypoxic influence. Consequently, prenatal hypoxia led to disruption of the metabolism of glutamate in the brain and created conditions for its accumulation in nerve cells. These disorders are possibly caused by changes in the mechanisms of reuptake and utilization of glutamate or damage enzyme's structure and ultimately led to disturbances in glutamatergic transmission.

**Key words:** prenatal hypoxia, glutamate, brain, rat

Çapa təqdim etmişdir: Sevinc Loğman qızı Yusifova, b.ü.f.d.

Redaksiyaya daxil olma tarixi: 15.11.2021.

Təkrar işlənməyə göndərmə tarixi: 22.11.2021.

Çapa qəbul edilmə tarixi: 18.04.2022.