

# Динамика глутаминсинтетазной активности в головном мозгу крыс в модели пренатальной гипоксии

**В.Р. Хаирова, М.И. Сафаров**

*Институт физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана, Баку;  
e-mail: venerakhairova@yahoo.com; safarovmatlab@yahoo.com*

*Метою нашої роботи було виявлення змін в активності одного з ключових ферментів обміну глутамату – глутамінсинтетази – в головному мозку потомства білих щурів, які перенесли гіпоксію на різних стадіях пренатального онтогенезу. Модель гіпоксії створювали поміщенням самиць щурів у терміни вагітності, відповідні зародкового періоду, органогенезу і плодового періоду пренатального розвитку, в барокамеру, куди подавалася суміш газів: 5% кисню і 95% азоту з експозицією 20 хв щодня. Потомство, отримане від контрольної та дослідної груп, було використано для біохімічних визначень по досягненні 1- і 3-місячного віку. Встановлено, що гіпоксія, перенесена вагітними самицями в період ембріонального органогенезу, викликає значні зміни в активності ферменту, особливо виражені в корі і мозочку, порівняно з прогестаційною і плідною гіпоксією. У 1-місячних щурів ферментативна активність знижується більшою мірою порівняно з тримісячними. Отже, вплив стресу в період інтенсивних процесів проліферації і міграції клітин формується в мозку і порушує глутаматний метаболізм.*

*Ключові слова: глутамінсинтетаза; пренатальна гіпоксія; головний мозок; онтогенез.*

## ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития нейробиологии, нейрхимии и медицины к числу наиболее актуальных проблем относится проблема ухудшения здоровья беременных женщин и как результат – высокая степень перинатальных потерь и патологий [1].

Наиболее распространенным и клинически значимым стресс-фактором, которому может быть подвержен организм в процессе эмбрионального развития, считается гипоксия. В головном мозгу как наиболее восприимчивом к недостатку кислорода органе, подверженном гипоксическому воздействию на основных этапах своего формирования, нарушается морфофункциональная организация, приводящая впоследствии к изменению поведенческих реакций и когнитивных функций [2, 3]. Нередко вызванные внутриутроб-

ной гипоксией микроповреждения мозга в раннем постнатальном периоде практически не диагностируются. Но в процессе роста и развития организма обусловленные внутриутробным стрессом церебральные нарушения проявляются в большей степени, и в итоге могут привести к изменениям социальной адаптации [4, 5].

Причины обусловленных гипоксией церебральных патологий кроются не только в изменении морфоструктурной организации мозга, но и биохимических характеристик. Показано, что следствием гипоксического воздействия является ослабление антиоксидантной защиты, интенсификация свободно-радикальных процессов и развитие оксидативного стресса, что в свою очередь нарушает метаболические процессы мозга, приводящие к отклонениям в механизмах синаптической передачи нейронов [6, 7]. При этом

© В.Р.Хаирова, М.И.Сафаров

важную роль играет нейротрансмиттерный дисбаланс, проявляющийся в гиперактивации ионотропных глутаматных рецепторов типа NMDA и AMPA, чрезмерном выбросе глутамата и провоцируемом им избыточном потоке кальция через NMDA-рецепторы, а также стимуляции каспазного каскада, т.е. запускается программа клеточного апоптоза, пусковым механизмом которого является глутаматная эксайтотоксичность [8–10].

Поэтому изучение метаболизма глутамата и активности ферментов, вовлеченных в его синтез и расщепление, представляет большой интерес с позиций нейрофизиологии и медицины. Одним из звеньев в метаболической цепи превращения глутамата в глутамат-глутаминовом цикле является реакция превращения глутамата в глутамин с детоксикацией аммиака, катализируемая ферментом глутаминсинтетазой. Обладая высокой чувствительностью к действию оксидантов, фермент поддерживает нормальное содержание глутамата и ионов аммония, регулируя клеточный кислотно-основной баланс.

Целью нашей работы было выявление изменений глутаминсинтетазной активности в структурах головного мозга потомства белых крыс, перенесшего гипоксию на разных стадиях пренатального онтогенеза.

## МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования в работе были использованы половозрелые белые крысы-самки линии Вистар. Животные на протяжении 3 нед до начала эксперимента содержались в отдельных клетках вивария в обычном режиме с целью исключения и выведения из эксперимента больных и беременных особей. По истечении указанного срока выдержки для спаривания к самкам подсаживали самцов в соотношении 3:1 на 2 сут. Первый день беременности констатировали по выявлению сперматозоидов во влагищном мазке нормально циклирующих самок. Далее все животные были разделены

на 2 группы: контрольную и опытную. Опытную группу в свою очередь распределяли на 3 подгруппы: 1-я, 2-я и 3-я – самки, подвергнутые гипоксии на первой (зародышевый период внутриутробного развития плода); второй (период органогенеза); и на третьей неделе беременности (плодный период) соответственно.

Модель гипоксии создавали помещением самок крыс в указанные сроки беременности в барокамеру, куда подавалась смесь газов: 5% кислорода и 95% азота с экспозицией 20 мин ежедневно в течение 7 сут. Контрольные особи также содержались в барокамере в аналогичные сроки беременности, но при свободном поступлении кислорода в воздухе. Потомство, полученное от контрольной и опытной групп, было использовано для биохимических определений по достижении им 1- и 3-месячного возраста. При моделировании эксперимента мы руководствовались принципами гуманного обращения с животными, изложенными в директиве Европейского сообщества.

После декапитации крыс в условиях гипотермии головной мозг был извлечен из черепной коробки, разделен на соответствующие структуры и идентифицирован. Из 5 церебральных структур – коры, мозжечка, гипоталамуса, среднего и продолговатого мозга – был приготовлен гомогенат по общепринятой методике. Определяли активность глутаминсинтетазы (КФ:6.3.1.2) [11] в митохондриальной фракции, полученной методом дифференциального центрифугирования.

Полученные результаты исследования были обработаны с применением статистического пакета программ «Statistica for Windows», а также «Microsoft Excel». Применяли t-критерий Фишера-Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов исследования влияния внутриутробной гипоксии вы-

явил тенденцию снижения активности глутаминсинтетазы в головном мозгу 1-месячных крыс. Однако степень снижения различна в зависимости от стадии пренатального онтогенеза, на которой животное было подвержено гипоксическому воздействию. Так, у крыс, перенесших гипоксию в период прогестации (зародышевый период), отмечается снижение энзиматической активности в митохондриальной фракции коры и мозжечка (20 и 17%), менее выраженное снижение в среднем и продолговатом мозгу (10%) и сохранение контрольного уровня в гипоталамусе (табл. 1).

Воздействие гипоксии в период органогенеза пренатального развития привело к более выраженному падению уровня глутаминсинтетазной активности в головном мозгу крыс. Установлено, что в сравнении с контролем, процент снижения активности в митохондриях коры и мозжечка составляет около 40%, гипоталамуса и среднего мозга – 30%, в продолговатом мозгу – 27%. У этих крыс выявлена высокая чувствительность коры и мозжечка к гипоксии относительно других структур. В головном мозгу крыс, подвергнутых гипоксии в плодном периоде внутриутробного развития, также наблюдаются изменения в активности исследуемого энзима, выражающиеся в ее снижении в пределах 10-17% относительно контрольных значений.

В следующей серии экспериментов, проведенной на 3-месячном потомстве, пережившем пренатальную гипоксию, были

получены результаты, несколько отличающиеся от показателей 1-месячных крысят. У крыс, гипоксированных в зародышевый период, сохраняется контрольный уровень энзиматической активности в коре и слабо выраженное повышение в остальных структурах мозга в пределах 10% относительно контроля (табл. 2).

Воздействие гипоксии на стадии органогенеза вызвало снижение показателя во всех структурах мозга: в коре – на 23%, мозжечке – 27%, гипоталамусе – 20%, среднем и продолговатом мозгу на 27 и 19% соответственно относительно контрольной группы. Эффект снижения активности глутаминсинтетазы сохраняется и у крыс, перенесших гипоксию в плодном периоде пренатального онтогенеза, однако, в сравнении с предыдущим периодом, оно находится в пределах 10-15% относительно контрольных значений.

При обсуждении характера изменений активности глутаминсинтетазы в головном мозгу пренатально стрессированных животных необходимо отметить следующее. В нашем исследовании были выбраны три критических периода воздействия гипоксии на беременных самок: прогестации, органогенеза и плодный период. Результаты работы выявили наиболее выраженные изменения активности энзима в головном мозгу пренатально гипоксированных крыс, достигших 1-месячного возраста. Следует отметить, что последствия гипоксии в период органогенеза более зна-

Таблица 1. Динамика глутаминсинтетазной активности (мкмоль  $\text{NH}_3 \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ ) в митохондриях различных структур головного мозга 1-месячных крыс, подвергнутых гипоксии на различных стадиях пренатального онтогенеза ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Структуры головного мозга	Контроль	Гипоксия в пренатальном онтогенезе		
		Зародышевый период	Период органогенеза	Плодный период
Кора	8,4±0,1	6,8±0,1**	5,3±0,1*	7,2±0,1**
Мозжечок	6,5±0,1	5,4±0,1**	4,0±0,1*	5,4±0,1**
Гипоталамус	7,1±0,2	7,2±0,2	4,9±0,2*	6,5±0,2
Средний мозг	5,3±0,1	4,7±0,1	3,7±0,1*	4,4±0,1**
Продолговатый мозг	4,4±0,2	3,9±0,2	3,2±0,2*	3,9±0,2

Примечание. Здесь и в табл. 2 \*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$  по отношению к контролю

**Таблица 2. Динамика глутаминсинтетазной активности (мкмоль  $\text{NH}_3 \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ ) в митохондриях различных структур головного мозга 3-месячных крыс, подвергнутых гипоксии на различных стадиях пренатального онтогенеза ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Структуры головного мозга	Контроль	Гипоксия в пренатальном онтогенезе		
		Зародышевый период	Период органогенеза	Плодный период
Кора	9,7±0,2	10,3±0,3	7,5±0,2*	8,5±0,2
Мозжечок	7,7±0,2	8,5±0,2	5,7±0,2*	6,8±0,2
Гипоталамус	8,2±0,2	9,0±0,2	6,6±0,2**	7,4±0,2
Средний мозг	6,5±0,1	7,0±0,1	4,8±0,1*	5,7±0,1
Продолговатый мозг	5,3±0,2	5,8±0,2	4,3±0,2**	4,8±0,2

чительны по сравнению с прогестационной и плодной гипоксией. Можно предположить, что воздействие гипоксического стресса в период интенсивных процессов пролиферации и миграции клеток формирующегося мозга изменяет морфоструктурную организацию и нарушает биохимические процессы в мозгу, что впоследствии приводит к изменениям поведенческих реакций. Характер повреждения при одних и тех же патогенных воздействиях в значительной степени обусловлен стадией пренатального развития, что особенно отчетливо проявляется в период органогенеза.

Как было отмечено выше, ведущим фактором в патогенезе нейродегенеративных процессов в мозгу в результате гипоксических повреждений является эксайтотоксичность глутамата. Глутаминсинтетаза, выполняя роль своеобразного нейропротектора, нейтрализует нейротоксичность высоких концентраций глутамата в нормальных условиях путем превращения его в глутамин и связывания аммиака. Но в условиях гипоксии, когда происходят структурно-функциональные изменения в клетках и повреждение нейронов, а также изменение пластичности нейронных сетей, глиальные клетки, сохраняя свою способность к захвату глутамата за счет энергии гликолиза, не могут полностью нейтрализовать его избыток из-за сниженного содержания глутаминсинтетазы. Поэтому усиление экспрессии последней в астроцитах способствует защите нейронов от токсического действия избытка глутамата, что

можно использовать в дальнейших поисках новых подходов в лечении нейродегенеративных процессов.

С другой стороны, активация таких энзимов глутаматного метаболизма, как глутаматдегидрогеназа, аспартат- и аланинаминотрансфераза обеспечивает перевод глутамата в  $\alpha$ -кетоглутарат – субстрат для ЦТК, что носит компенсаторно-адаптивный характер, препятствующий дальнейшей гибели нейронов [12].

Согласно исследованиям Mikheeva и соавт. [13], у крыс в модели гипоксии в период органогенеза наблюдается повышение содержания серотонина в структурах мозга. И именно на фоне высокого этого показателя в мозгу 21-суточных крыс отмечались наиболее выраженные отклонения в поведенческих реакциях относительно контрольной группы. Кроме того, высокое содержание катехоламинов в результате стресса, являясь токсичным, усугубляет развитие окислительного стресса, вызывая повреждение и/или гибель клеток.

Следует отметить прямую корреляцию между нарушением поведенческих реакций и отклонениями в когнитивных функциях с изменениями биохимических характеристик организма, перенесшего пренатальную гипоксию. Следствием является изменение морфофункциональной организации центральной нервной системы, вызываемое нарушением процессов пролиферации и

миграции нейробластов тех отделов мозга, которые закладываются во время действия патологического фактора.

Результаты нашей работы свидетельствуют, что каждый период пренатального онтогенеза характеризуется общими и специфическими чертами ответных реакций на гипоксическое воздействие. Влияние гипоксии в зародышевый период внутриутробного развития может быть незначительным в связи с отсутствием адекватных ферментных систем, что может привести к небольшим биохимическим отклонениям в головном мозге (небольшой процент падения активности глутаминсинтетазы) или к ранней гибели и резорбции зародыша. На более поздних сроках пренатального развития плод менее восприимчив к повреждающим факторам, поэтому наблюдаемые нами изменения активности глутаминсинтетазы в процентном соотношении также ниже по сравнению с гипоксированными в период органогенеза животными.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что ответная реакция структур головного мозга на гипоксическое воздействие проявляется в различной степени выраженности изменении активности исследуемого фермента, что обусловлено морфофункциональными особенностями структур, плотностью глутаматергических нейронов, пластичностью мозга, а также связано с критическими периодами пренатального онтогенеза, на каждом из которых все элементы нервной системы проходят свои этапы повышенной чувствительности и восприимчивости к повреждающим факторам.

**V.R. Khairova, M.I. Safarov**

#### **DYNAMICS OF GLUTAMINE SYNTHASE ACTIVITY IN RAT BRAIN IN PRENATAL HYPOXIA MODEL**

Prenatal ontogenesis is a period of high sensitivity to stressful impact, so any stressor can lead to changes of physiological, biochemical indicators, behavioral and cognitive functions. The most common and clinically significant stress factor, which the embryo may be exposed during embryonic

development, is hypoxia. In this case pathological changes in the central nervous system depend on the duration and severity of hypoxic exposure, individual tolerance and the stage of prenatal development, at each of which in the brain take place the basic histogenetic processes. By activating energetically disadvantageous anaerobic glycolysis hypoxia leads to excess of glutamate emission and cell apoptosis. Glutamine synthase is a basic enzyme that regulates metabolism of glutamate, catalyzing conversion of glutamate to glutamine with ammonia detoxification. The aim of the presented work was to reveal changes in the activity of one of the key enzyme of glutamate metabolism— glutamine synthetase - in the brain of offspring of white rats undergone to hypoxia at different stages of prenatal ontogenesis. Hypoxia was created by placing female rats at stages of the pregnancy, corresponding to progestation period of organogenesis and fetal period of prenatal development, in the hypobaric chamber with exposure to 5% oxygen and 95% nitrogen gas mixture during 30 minutes per day. The offspring obtained from females of control and experimental groups were used for biochemical determinations in the age of 1 and 3 month. It has been established that hypoxia exposed to pregnant females during embryonic organogenesis causes significant changes in enzyme activity, particularly pronounced in the cerebral cortex and cerebellum, as compared with progestational and fetal hypoxia. Enzyme activity decreased in a greater degree in one-month-old rats undergone to prenatal hypoxia, than three- month-old animals.

Thus, stress during intensive processes of proliferation and migration of cells of the forming brain violates glutamate metabolism of the brain.

Key words: glutamine synthetase; prenatal hypoxia; brain; ontogenesis.

*Institute of Physiology, Azerbaijan National Academy of Science, Baku*

#### **REFERENCES**

1. Ignat'eva R.K. Perinatal'nye problemy v Rossii [Perinatal problems in Russia]. Moscow, 2006. 40 p [Russian].
2. Graf A. V., Maklakova A.S., Maslova M.V. Vliyanie prenatal'noi gipoksii, provedennoi na stadii organogeneza, na povedenie belykh krysv v postnatal'nom ontogeneze. The impact of prenatal hypoxia conducted at the stage of organogenesis, on behavior of white rats in postnatal ontogenesis. *Izv. Ros. Akad. Nauk = Math. Ros. Acad. Sci* 2006; 4: 476-481. [Russian].
3. Delcour M., Russier M., Amin M. et al. Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. *Behav. Brain Res.* 2012; 232(1): 233- 244.
4. Basovich S.N. Gipoksiya v geneze i terapii mental'nykh otklonenii: obzor [Hypoxia in the genesis and treatment of mental abnormalities: a review]. *Vestn. Mezhd. Akad. Nauk, Rus. sektsiya = Bull. of the Inter. Acad. Sci., Russ. section* 2011; №1 [Russian].
5. Zhuravin I.A, N. L. Tumanova N.L., Vasil'ev D.S. *Izm-*

- enenie adaptivnykh mekhanizmov mozga v ontogeneze krysa, perenesshikh prenatal'nyu gipoksiyu [Changing the adaptive mechanisms of the brain during ontogenesis in rats undergoing prenatal hypoxia]. Dokl. Akad. Nauk = Dokl. Acad. Sci 2009; 425 (1):123-125 [Russian].
6. Slobodin V.B., Tomilova I.K., Kadykova E.L., Bogatov D.N.. Svobodno-radikal'nye protsessy i osobennosti metabolizma glutamata v golovnom mozge novorozhdennykh krysa, razvivavshikhsya pri nedostatocznosti matocno-platsentarnogo krovoobrashcheniya [Free-radical processes and features of glutamate metabolism in the brains of newborn rats that developed at insufficiency of uteroplacental circulation]. Pat. fiziol. i eksp. terapiya = Pathol. physiol. and exp. terapiya 2007; (2): 17-19 [Russian].
  7. Fadeeva N.I., Khovalyg N.M., Remneva O.V. Oksidantno-antioksidantnyi status nedonoshennykh novorozhdennykh s perinatal'nym porazheniem tsentral'noi nervnoi sistemy [Oxidant-antioxidant status in preterm infants with perinatal lesions of the central nervous system]. Ross. Vestnik perinat. i pediatrii = Russ. Bull. perinat. and pediatrics 2010; 55(3):26-30 [Russian].
  8. Boldyrev A.A. Vzaimodeistviya mezhdru glutamatnymi retseptorami [Interactions between glutamate receptors]. Byul. eksperim. boil. i meditsiny = Bull. exper. biol. and medicine 2000; 130( 9): 244 – 251 [Russian].
  9. Bol'shakov A.P. Glutamatnaya neirotoksichnost': narusheniya ionnogo gomeostaza, disfunktsiya mitokhondrii, izmeneniye aktivnosti kletocnykh sistem [Glutamate neurotoxicity: violation of ion homeostasis, mitochondrial dysfunction, changes in the activity of cellular systems]. Neirokhiimiya = Neurochemistry 2008; 25( 3): 157-169 [Russian].
  10. Samoilov M.O., Mokrushin A.A., Semenov D.G. Vovlecheniye glutamatnykh retseptorov (NMDA-tipa) v reaktsii neuronov mozga na anoksiyu razlichnoi dlitel'nosti [Involving glutamate receptors (NMDA-type) in response to the neurons in the brain anoxia of various duration]. Vestn. RAMN = Vestn. RAMS 2000; (9): 34-39 [Russian].
  11. Silakov A.I., Trubin G.P., Yavilyakova A. Mikrometod opredeleniya ammiaka i glutamina v tkanyakh GMKh ekstraktakh [Micromethods determination of ammonia and glutamine in the tissue extracts GMH]. Vopr. med. khimii = Probl. Med. chemistry 1962; 8(5): 538-544 [Russian].
  12. Gadirova L.B., Abbasova M.T., Khairova V.R. Vliyanie gipoksii, perenesennoi v post- i prenatal'nyi periody ontogeneza, na aktivnost' nekotorykh fermentov obmena glutamata v mozge krysa [The impact of hypoxia in the pre- and postnatal periods of development on the activity of certain enzymes of glutamate metabolism in the rat brain]. «Izvestiya» NAN Azerbaidzhana. Baku. Elm = Proceedings of National Academy of Sciences of Azerbaijan. Baku. Elm 2010; (1-2):100-104 Russian [].
  13. Mikheeva I.G., Ryukert E.N., Brusov O.S. Soderzhanie serotoninina v syvorotke krovi novorozhdennykh detei s gipoksicheski-ishemicheskim porazheniem TsNS [The content of serotonin in the blood serum of neonates with hypoxic-ischemic CNS]. Pediatriya = Pediatrics 2008; (1): 40–44 [Russian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 29.01.2015*