

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ОКСИДА АЗОТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ НАРУШЕНИЯ МАТОЧНО-ПЛАЦЕНТАРНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ МАГНЕ В₆

Томилова И. К.^{1*}, кандидат медицинских наук,
Громова О. А.^{2,3}, доктор медицинских наук,
Слободин В. Б.¹, доктор медицинских наук

¹ Кафедра биологической химии ГБОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия»
Минздравсоцразвития России, 153012, Иваново, просп. Ф. Энгельса, д. 8

² Кафедра фармакологии и клинической фармакологии ГБОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

³ Российский сотрудничающий центр Института микроэлементов ЮНЕСКО, 109652, Москва, Большой Тишинский пер., д. 26, стр. 15/16

РЕЗЮМЕ В головном мозге новорожденных крысят, развивавшихся в условиях недостаточности маточно-плацентарного кровообращения и применения препарата Магне В₆, исследовали обмен глутаминовой кислоты и оксида азота. Показано, что применение Магне В₆ оказывает протективное действие на метаболические процессы, причем в большей степени в ранние сроки беременности.

Ключевые слова: нейроонтогенез, глутаминовая кислота, оксид азота, Магне В₆, нарушение маточно-плацентарного кровообращения, крысы.

* Ответственный за переписку (*corresponding author*): тел.: 8-910-990-86-09.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-97552

Общеизвестно, что патологическое течение антенатального периода часто приводит к задержке внутриутробного развития, повреждению различных органов и систем. Среди неблагоприятных факторов, действующих в этот период, большое значение имеет нарушение маточно-плацентарного кровообращения (МПК), которое, в свою очередь, приводит к развитию гипоксии, являющейся центральным звеном патогенеза антенатального повреждения плода [1, 5], особенно его центральной нервной системы (ЦНС).

В последние годы благодаря успехам современной науки особый интерес в изучении патогенеза гипоксических церебральных поражений вызывают исследования роли нейромедиаторов ЦНС, прежде всего глутамата и оксида азота (II). Механизм повреждающего действия глутаминовой

кислоты связан с перевозбуждением глутаматергических рецепторов, повышением внутриклеточной концентрации кальция и активацией ряда ферментов, катализирующих гиперпродукцию оксида азота и вызывающих интенсификацию перекисного окисления липидов [2, 4]. Биологическая роль оксида азота связана не только с его участием в регуляции церебрального кровотока, но также с синтезом высокоактивных радикалов, которые приобретают особое значение в гибели клеток при гипоксии [4, 6].

Естественным антагонистом кальция является магний, основная функция которого – защита нервной системы от всевозможных стрессов. Потребность именно в этом элементе у беременной женщины возрастает в несколько раз [14]. Причиной гипомagneмии являются гестоз, уг-

Tomilova I. K., Gromova O. A., Slobodin V. B.

THE PECULIARITIES OF GLUTAMINIC ACID AND NITROGEN OXIDE METABOLISM IN THE BRAIN OF NEWBORN RATS WHICH HAD BEEN DEVELOPED IN UTEROPLACENTAL CIRCULATION DISORDER AND MAGNE В₆ ADMINISTRATION

ABSTRACT Glutaminic acid and NO metabolism was studied in the brain of newborn rats which had been developed in insufficient uteroplacental circulation and Magne В₆ administration. It was demonstrated that Magne В₆ taking exerted protective influence over metabolic processes and to an even greater degree in the early terms of pregnancy.

Key words: neuroontogenesis, glutaminic acid, NO, Magne В₆, uteroplacental circulation disorder, rats.

роза прерывания беременности, плацентарная недостаточность [11]. Дефицит магния приводит к спастическому сокращению матки, что, в свою очередь, еще больше ослабляет МПК, увеличивает вероятность преждевременных родов, самопроизвольных аборт [4]. Гипомагниемия очень часто сопровождается дефицитом пиридоксина, влияющего на уровень и метаболизм биогенных аминов и нейромедиаторов, в частности, глутаминовой кислоты и глутамина в нервной ткани [8]. При этом симптоматика дефицита пиридоксина во многом перекликается с клинической картиной магниевого дефицита, что обуславливает их применение в сочетанном виде.

Цель работы – исследовать особенности метаболизма глутамата и оксида азота в головном мозге новорожденных крысят, развивавшихся в условиях нарушения МПК и применения препарата Магне В₆.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на белых беспородных беременных крысах массой 220–280 г. Первые сутки беременности определялись по наличию во влагалищных мазках сперматозоидов. Модель нарушения МПК воспроизводилась по методике М. М. Вартановой [3] путем перевязки 1/3 преплацентарных сосудов на 16–17-е сутки беременности, т. е. в тот период, когда после завершения плацентации плод полностью переходит на плацентарное кровообращение. На 2-е сутки после рождения проводилось взвешивание крысят, измерялась их длина, оценивалось состояние кожных покровов, двигательной активности, после чего они декапировались с извлечением головного мозга.

Новорожденные крысята были разделены на 3 группы. Первую группу составили животные, развивавшиеся в условиях нарушенного (опытная подгруппа) и нормального (контрольная подгруппа) МПК.

Вторую группу составили 2-дневные крысята, развивавшиеся в условиях нарушенного (опытная подгруппа) и нормального (контрольная подгруппа) МПК, но родившиеся от крыс, которым вводился препарат Магне В₆ после операции с 16-го дня беременности (т. е. после моделирования нарушения МПК).

Третью группу составили крысята, развивавшиеся в условиях нарушенного (опытная подгруппа) и нормального (контрольная подгруппа) МПК и родившиеся от крыс, которым препарат Магне В₆ вводился с 6-го дня беременности. Выбор срока определялся данными литературы о том, что критически низкий уровень пиридоксина (витамина В₆) отмечается у женщин к концу первого триместра

[11, 14]. Магне В₆ вводился беременным крысам внутриматочно в дозе, рекомендуемой беременным и кормящим женщинам, – 10–15 мг/кг/сут.

В митохондриальной и цитоплазматической фракциях головного мозга крысят определялись показатели обмена глутамата: количество глутаминовой кислоты [7], активность глутаматдегидрогеназы [10], активность глутаминазы [12], активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) с помощью набора реактивов (унифицированный метод определения активности аминотрансфераз по Рейтману и Френкелю).

О метаболизме оксида азота косвенно судили по суммарному количеству его конечных метаболитов – нитрит- и нитрат-ионов (устанавливаемому с использованием реакции Грисса [17] после восстановления последних хлоридом ванадия), а также по уровню продукта NO-синтазной реакции – цитруллин [16].

Микроэлементный статус определялся методом эмиссионной спектроскопии с индукционно связанной аргонной плазмой (работа проделана сотрудниками независимого экспертно-аналитического совета по разработке и внедрению современных методов исследований и анализа на базе кафедры неорганической и аналитической химии МСХА им. К. А. Тимирязева и кафедры клинической и лабораторной диагностики РГМУ).

Статистическая обработка результатов проведена по общепринятым методикам параметрической и вариационной статистики. Достоверность различий данных рассчитывалась по критерию Стьюдента с помощью программы «Statistica» 5.5 и электронных таблиц «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В головном мозге новорожденных крысят, развивавшихся в условиях нарушения МПК, содержание глутаминовой кислоты было достоверно выше в 1,4 раза по сравнению с контролем ($9,26 \pm 1,03$ и $6,56 \pm 0,71$ ммоль/г ткани соответственно) (табл. 1).

Учитывая, что комплексная система компартментализации нейронов предполагает разделение метаболического и нейротрансмиссионного (медиаторного) пула глутамата, для оценки состояния метаболического пула была определена активность глутаматдегидрогеназы, АСТ и АЛТ, которые в мозге новорожденных крысят, развивавшихся при недостаточности МПК, были увеличены по сравнению с контролем (табл. 1).

В качестве предшественника медиаторного пула рассматривают глутамин [6, 9], поэтому глутамина может быть использована как маркер актив-

ности глутаматергических нейронов. В головном мозге крысят опытной группы ее активность оказалась достоверно выше в 1,36 раза (табл. 1).

Таким образом, метаболический пул глутамата уменьшался, что можно рассматривать как компенсаторно-приспособительную реакцию при гипоксии, направленную на интенсификацию окислительной его утилизации с целью энергообеспечения нейронов. Однако увеличение количества медиаторного глутамата приводит к избыточной активации глутаматных рецепторов, при этом в роли вторичного посредника выступают ионы кальция [4]. Образование глутамат-рецепторного комплекса приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (за счет открытия связанных с NMDA- и AMPA-рецепторами кальциевых каналов) наряду с перекисной модификацией самих рецепторов в условиях гипоксии.

И действительно, содержание Ca^{2+} в гомогенатах головного мозга опытных крысят было увеличено в 1,36 раза, в то время как концентрация модулятора его внутриклеточных эффектов – Mg^{2+} – оказалась достоверно ниже (табл. 2). Рост уровня кальция вызывает активацию протеинкиназ, фосфолипаз, протеаз, нитроксидсинтетазы, а также нарушение митохондриальных функций и образование свободных радикалов [15].

Применение Магне B_6 вызвало неоднозначные изменения содержания кальция. Так, в головном мозге опытных плодов второй группы оно не только уменьшилось по сравнению со значениями контрольной подгруппы, но и оказалось на уровне показателей интактных крысят первой группы. В третьей группе концентрация кальция в опыте была выше – на уровне показателей опытных животных первой группы (табл. 3).

Содержание магния было увеличено в головном мозге опытных крысят как второй, так и третьей групп (табл. 3). Полученные данные можно рассматривать как доказательство положительного влияния Магне B_6 , т. к. увеличение концентрации магния уменьшает проявления эксайтотоксичности глутамата, что подтверждается высоким уровнем отрицательной корреляции между его содержанием и концентрацией Mg^{2+} ($r = -0,91$).

Изучение метаболизма другого нейромедиатора, оксида азота, показало достоверное увеличение суммарного содержания его конечных метаболитов (нитрит- и нитрат-ионов) в головном мозге крысят, развивавшихся при недостаточности МПК. Полученные результаты были подтверждены повышенной концентрацией продукта NO-синтазной реакции – цитруллина (табл. 3).

Таблица 1. Показатели обмена глутаминовой кислоты в головном мозге новорожденных крысят

Подгруппа	Содержание глутамата, ммоль/г	Активность ГДГ, мкмоль НАДФ/мин/мг	Активность АСТ, мкмоль/г/ч	Активность АСТ, мкмоль/г/ч	Активность глутаминазы, нмоль/мин/мг
Контрольная	6,56 ± 0,71	12,89 ± 0,61	215,5 ± 18,0	15,9 ± 0,88	25,16 ± 2,65
Опытная	9,26 ± 1,03*	15,42 ± 0,89*	317,0 ± 27,2**	22,05 ± 1,9*	34,39 ± 2,33*

Примечание. Достоверность различий между контрольной и опытной подгруппами: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Таблица 2. Содержание микроэлементов в головном мозге новорожденных крысят

Элемент, мкг/г	Первая группа		Вторая группа		Третья группа	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Ca	21 643 ± 407	29 423 ± 467*	25 227 ± 670	22 057 ± 89*	23 996 ± 1460	29 815 ± 1 820*
Mg	2 601 ± 106	1 457 ± 370*	2 254 ± 37	1 715 ± 69*	1 921,4 ± 143	2 275 ± 97**

Примечание. Достоверность различий между контрольной и опытной подгруппами в каждой группе: * – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$.

Таблица 3. Показатели метаболизма оксида азота (II) в головном мозге новорожденных крысят

Показатель, ммоль/л	Первая группа		Вторая группа		Третья группа	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Нитрит- и нитрат-ионы	23,89 ± 5,7	44,8 ± 4,1*	81,13 ± 9,1	86,8 ± 11,7	92,3 ± 16,2	101,5 ± 26,4
Цитруллин	0,85 ± 0,06	0,74 ± 0,05*	0,83 ± 0,07	0,88 ± 0,05	1,38 ± 0,06	1,4 ± 0,09

Примечание. Достоверность различий между контрольной и опытной подгруппами каждой группы: * – $p < 0,001$.

Применение Магне В₆ не вызвало изменений метаболизма оксида азота у опытных крысят второй и третьей групп по сравнению с данными контрольных подгрупп, однако по сравнению с показателями первой группы отмечалось значительное увеличение содержания его метаболитов (табл. 3).

Как известно, значение проявляемых **NO** метаболических эффектов неоднозначно. С одной стороны, **NO** является мощным вазодилататором, что способствует улучшению кровоснабжения тканей. Известны и антиоксидантные свойства оксида азота, которые препятствуют протеканию перекисного окисления липидов [4]. С другой стороны, в последние годы установлено, что **NO** играет важную роль в гибели клеток при гипоксии, поскольку он реагирует с липофильными пероксидными радикалами, приводя к генерации значительно более стабильных алкилпероксинитритов (LOONO) [13]. Кроме того, имеются данные, что **NO** может опосредовать эксайтотоксичность глутамата [9], и, напротив, накопление глутамата может снижать активность **NO**-синтазы в коре мозга [4]. Косвенным подтверждением является высокий уровень положительной корреляции между содержанием нитрат- и нитрит-ионов и концентрацией Ca^{2+} и Mg^{2+} в нашем исследовании ($r = 0,9$ и $r = 0,7$ соответственно).

ЛИТЕРАТУРА

1. Барашнев Ю. И. Гипоксическая энцефалопатия: гипотезы патогенеза церебральных расстройств и поиск методов лекарственной терапии // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2002. – № 1. – С. 6–13.
2. Болдырев А. А. Взаимодействия между глутаматными рецепторами // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, № 9. – С. 244–251.
3. Вартанова М. М. Патогенез и профилактика синдрома отставания в развитии плода при плацентарной недостаточности и его отдаленные последствия : дис. ... д-ра мед. наук. – Л., 1984.
4. Васильева Е. М., Баканов М. И. Биохимические изменения при неврологической патологии // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 6. – С. 581–602.
5. Фармаколазерная профилактика перинатальных осложнений фетоплацентарной недостаточности / О. В. Васильева [и др.] // Педиатрия. – 2007. – Т. 86, № 1. – С. 119–126.
6. Гомазков О. А. Системы нейробиохимической регуляции при патологии мозга // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, № 4. – С. 321–343.
7. Ещенко Н. Д. Определение количества глутаминовой кислоты в тканях // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : учеб. пособие / под ред. М. И. Прохоровой. – Л., 1982. – С. 244–246.
8. Влияние пиридоксальфосфата на метаболизм глутамин в субклеточных фракциях мозга / Р. Г. Камалаян [и др.] // Нейрохимия. – 1999. – Т. 16, № 3. – С. 227–229.

ВЫВОДЫ

В патогенезе повреждений головного мозга новорожденных крысят, развивавшихся в условиях нарушенного МПК, играет роль эксайтотоксичность глутамата, реализуемая посредством увеличения концентрации кальция и уменьшения содержания магния. В то же время метаболический пул глутамата в условиях гипоксии истощается, по-видимому, обеспечивая энергией и пластическими ресурсами процессы синтеза белка, нуклеиновых кислот, фосфолипидов и других компонентов клеток головного мозга.

Применение Магне В₆ оказывает положительный эффект на состояние метаболизма глутаминовой кислоты, т. к. увеличение концентрации магния снижает проявления эксайтотоксичности повышенного уровня глутамата.

Гиперпродукцию **NO** можно рассматривать как компенсаторно-приспособительную реакцию в условиях гипоксии при нарушении МПК и применении Магне В₆, направленную на усиление кровотока в ишемизированной ткани мозга, поскольку **NO** является мощным вазодилататором и антиоксидантом. Однако необходимо принимать во внимание неоднозначность роли **NO**: с нарастанием его концентрации в тканях цитопротективный эффект сменяется цитотоксическим.

9. Квривишвили Г. И., Митагвария Н. П. Современные представления о роли глутамата в ишемических повреждениях ткани головного мозга // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 1999. – Т. 85, № 12. – С. 1489–1495.
10. Ключева Н. Н. Определение активности глутаматдегидрогеназы в митохондриях тканей животных // Вопр. мед. химии. – 1978. – № 1. – С. 49–51.
11. Кудрин А. В., Громова О. А. Микроэлементы в неврологии. – М., 2006.
12. Лебедева З. И., Березов Т. Т., Орехович В. Н. Глутамин(аспарагин)аза из *Pseudomonas Aurantia*-са ИЛЫИ-548 // Биохимия. – 1981. – Т. 46, вып. 1. – С. 85–88.
13. Раевский К. С. Роль оксида азота в глутаматергической патологии мозга // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С. 11–15.
14. Спасов А. А. Магний в медицинской практике. – Волгоград, 2000.
15. Beal M. F. Mechanism excitotoxicity in neurological disease // FASEB J. – 1992. – Vol. 6, № 15. – P. 3338–3344.
16. Colorimetric determination of citrulline residues in proteins / K. Sugawara [et al.] // Analytical biochemistry. – 1998. – № 265. – P. 92–96.
17. Способ определения содержания нитрит-ионов как конечного метаболита оксида азота II // Р. Дж. Фланган [и др.] // Основы аналитической токсикологии. – Женева, 1997.