



Биол. журн. Армении, 1 (71), 2019

ПОПЫТКА ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА

КАМАЛЯН Р.Г., ХАЧАТРЯН Р.С., ХАЧАТРЯН Н.Х

Институт биохимии им Г. Бунятыана НАН РА
kamalyan37@mail.ru

Добавление в корм в течение месяца монтморилонита и β -аланина с ингибитором ГАМК-Т этаноламин-О-сульфатом (ЭОС) с питьевой водой предотвращает гипергликемический эффект внутрибрюшинного введения химического диабетогена стрептозотцина. Последний при введении интактным крысам снижает концентрацию нейроактивных аминокислот в мозге и поджелудочной железе, чему препятствует месячная подкормка кормовой добавкой, которая нивелирует ингибирующее действие диабетогена на утилизацию глутамата гомогенатами мозга и поджелудочной железы. Полученные данные свидетельствуют о превентивном действии вышеуказанной комплексной подкормки на инициацию диабета стрептозотцином.

Стрептозотцин – диабет – монтморилонит – β -аланин – ГАМК – мозг – поджелудочная железа

Մոնտմորիլոնիտային կերակրային հավելումը և խմելու ջրի հետ β -ալանինի և ԳԱԿԹ-տրանսամինազի արգելակիչ էթանոլամին-Օ-սուլֆատի ներմուծումը 1 ամսվա ընթացքում կանխում է քիմիական շաքարախտածին ստրեպտոզոտոցինի ներորովայնային ներարկման հիպերգլիկեմիկ ազդեցությունը: Վերջինս ինտակտ առնետներին ներարկման դեպքում վիճակագրորեն հավաստի իջեցնում է կյարդաակտիվ ամինաթթուների խտությունը ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում, ինչին հակազդում է վերոնշյալ համալրային հավելումով միամսյա կերակրումը: Վերջինս նաև թուլացնում է ստրեպտոզոտոցինի արգելակիչ ազդեցությունը գլխուղեղի և ենթաստամոքսային գեղձի հոմոգենատների կողմից գլյուտամինաթթվի յուրացման վրա: Ստացված տվյալները վկայում են վերոնշյալ համալրային կերակրային հավելման կանխիչ ազդեցության մասին ստրեպտոզոտոցինի կողմից փորձարարական շաքարախտ առաջացնելու ունակության վրա:

Ստրեպտոզոտոցին – դիաբետ – մոնտմորիլոնիտ – β -ալանին – ԳԱԿԹ – ուղեղ – ենթաստամոքսային գեղձ

The administration of montmorilonit with food and β -alanine and GABA-T inhibitor ethanolamine-O-sulfate (EOS) with water to rats prevents the hyperglycemic effect of chemical diabetogen streptozotocin intraperitoneal injection. Streptozotocin injection to intact rats statistically proven decreases the level of neuroactive amino acids in brain and pancreas. Referred to above food additive prevents such effect of streptozotocin and its inhibitory action on the glutamate utilization by brain and pancreas homogenates. Obtained data testify the preventive action of used food additive on the diabetes mellitus initiation by streptozotocin.

Streptozotocin – diabet – montmorilonit – β -alanine – GABA – brain – pancreas

О значении ГАМК в функциях поджелудочной железы свидетельствует ряд работ [3-5, 11, 13-15]. Подчеркивается роль этого тормозного трансммиттера как в эндокринной, так и экзокринной функциях, по-видимому, тесно взаимосвязанных [22].

Особое значение приписывается роли ГАМК в функциях продуцирующих инсулин β -клеток [4, 12-15]. Показано наличие сравнимых с мозгом концентраций ГАМК в панкреасе, сосредоточенных в основном в β -клетках, как в везикулах нервных окончаний, так и в инсулярных гранулах [13-15]. Выяснено, что ГАМК способствует синтезу и высвобождению инсулина [12-15]. Возник вопрос о возможной эффективности этой аминокислоты при диабете, тем более что продуцирующий ее фермент глутаматдекарбоксилаза является одной из мишеней аутоиммунного процесса, приводящего к гибели островковых β -клеток [55], т.е. к развитию диабета первого типа (Т1Д). Определение активности антител к ферменту используется в доклинической диагностике Т1Д [11, 16].

Ряд исследователей придерживается мнения, что идеальной иммунотерапией Т1Д является уменьшение провоспалительных аутоиммунных ответов, усиление регуляторных ответов и повышение выживаемости и репликации β -клеток [26, 27]. ГАМК вполне обосновано рассматривается в качестве эффективного претендента на эту роль [27]. Введение ГАМК NOD мышам может подавлять воспалительные и усиливать регуляторные Т-клеточные ответы, способствовать репликации β -клеток и сохранять в течение определенного времени нормогликемию. Особенно эффективна ГАМК в сочетании с посаженным на квасцы проинсулином, вызывающим системную аутоиммунную реакцию. Роль ГАМК при этом заключается в снятии провоспалительных Т-клеточных ответов с сохранением или даже усилением регуляторного компонента системного аутоиммунитета с репликацией островковых β -клеток и длительным поддержанием нормогликемии.

В прежней нашей работе мы исследовали влияние генерирующих ГАМК факторов, глутамина и этаноламин-О-сульфата (ЭОС) на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс в норме и при экспериментальном стрептозотоциновом диабете [3]. Поскольку в опытах *in vitro* на культуре β -клеток панкреаса в наших опытах наиболее выраженную флюоресценцию инсулина вызывало добавление ЭОС, в настоящей работе мы использовали его в качестве возможного антидиабетогенного агента на стрептозотоциновой модели крыс,

Вместе с тем, исходя из гомологии с ГАМК β -аланина, трансаминирования его ГАМК-Т [6], участия в синтезе антиоксидантов карнозина и ансерина [7,8] и ингибиторных транзиттерных свойств мы использовали эту аминокислоту в качестве возможного заместителя ГАМК. И, наконец, учитывая значение кишечной микрофлоры в ожирении и иммунитете [9, 10], мы использовали монтморилонит в качестве подкормки подопытных животных, улучшающей пищеварение и связывающей токсины патогенной микрофлоры [1].

Материал и методика. Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 180-200 г. Животные содержались на обычном пищевом рационе в условиях вивария Института биохимии НАН РА. Животные были разделены на три группы: I – получала обычный рацион, II и III – к обычному рациону был примешан 1 % монтморилонита. Кроме того, они получали с водой ЭОС (150 мг/л) и β -аланин (50 мг/л). Через 1 месяц крысам I и III групп внутривентриально вводили 1 мл стрептозотоцина в цитратном буфере (40 мг/кг) и через три дня определяли глюкозу в крови с помощью глюкометра Accu-Chek (Germany). Затем, при выраженной гипергликемии в I группе крыс забивали под легким эфирным наркозом, удаляли органы (мозг, поджелудочная железа), гомогенизировали в 6%-ном перхлорате [23], разделяли аминокислоты экстрактов методом высоковольтного электрофореза и определяли их нингидриновым методом [2]. В отдельной серии опытов исследовали утилизацию глутамата в гомогенатах мозга и панкреаса. Результаты подвергнуты статистической обработке с помощью пакета программ GraphPad InStat.

Результаты и обсуждение. Представленные в табл. 1 результаты определения глюкозы крови подопытных животных свидетельствуют о том, что

длительная подкормка монтморилонитом, β -аланином и ЭОС почти полностью препятствует гипергликемическому действию стрептозотоцина. Так, в группе с подкормками, но без введения стрептозотоцина (группа II) концентрация глюкозы составляет 7.0 ± 0.8 мМ/л, а в III группе с введением стрептозотоцина на фоне подкормки 9.9 ± 1.6 мМ/л. Разница между группами статистически недостоверна, т.е. использованная нами подкормка предотвращает резкий гипергликемический эффект стрептозотоцина.

Таблица 1. Содержание глюкозы крови крыс

Группа	Глюкоза, мМ/л
I	28.8 ± 1.8
II	$7.0 \pm 0.8^*$
III	$9.9 \pm 1.6^*$

Поскольку подкормка предположительно должна была влиять на β -клетки, путем генерации ГАМК определялась концентрация нейроактивных аминокислот семейства глутамата в мозге и поджелудочной железе. Представленные в табл. 2 данные показывают, что внутрибрюшинное введение стрептозотоцина крысам на фоне подкормки не оказывает достоверного понижающего эффекта на уровень нейроактивных аминокислот в мозге и поджелудочной железе (ср. группы III и II), тогда как введение стрептозотоцина интактным крысам, не получавшим подкормку, в сравнении с получавшими подкормку без и с последующим введением стрептозотоцина (II и III группы), вызывает достоверное уменьшение содержания глутамата и ГАМК в мозге и поджелудочной железе. Так, концентрация глутамата в мозге интактных крыс после введения стрептозотоцина составляет 6.4 мкМ/г свежей ткани, тогда как на фоне подкормки эта величина достигает 7.7 мкМ. Уровень ГАМК в указанных группах составляет соответственно 1.6 и 2.9 мкМ/г свежей ткани, что свидетельствует о значительном протекторном эффекте подкормки от действия стрептозотоцина. Аналогичное отмечается и в отношении поджелудочной железы, где подкормка также удерживает концентрацию указанных аминокислот и глутамата на уровне, не отличающемся статистически значимо от их содержания у крыс с подкормкой, но без введения стрептозотоцина (ср. II группу с III).

Таким образом, мы имеем сопряженный превентивный однонаправленный эффект подкормки на содержание глюкозы в крови и нейроактивных аминокислот, в частности ГАМК, в мозге и поджелудочной железе крыс, что дает основание с достаточной долей вероятности приписывать ей защитный эффект от введения стрептозотоцина. Однако в прежних наших экспериментах с кратковременным предварительным введением крысам предшественника ГАМК глутамата и ингибитора ГАМК-Т ЭОС аналогичное или даже большее повышение ГАМК в органах сопровождалось гораздо менее выраженным гипогликемическим действием [3], что свидетельствует и о других возможных факторах действия подкормки, в частности таких его компонентов как β -аланин и монтморилонит. Первый, скорее всего, подобно ГАМК, оказывает противовоспалительный эффект, а через свой метаболит карнозин и антиоксидантное действие, второй стабилизирует работу кишечника и как сорбент связывает токсины патогенной микрофлоры.

Таблица 2. Содержание аминокислот в мозге и панкреасе крыс

Группы	ГК		ГН		АК		ГАМК	
	мозг	ПЖ	мозг	ПЖ	мозг	ПЖ	мозг	ПЖ
I	6.4±0.4	2.5±0.2	2.8±0.2	3.0±0.27	1.7±0.2	1.1±0.2	1.6±0.2	1.1±0.1
II	8.2±0.2	3.6±0.35	4.2±0.37	3.7±0.3	1.9±0.2	1.3±0.06	3.2±0.25	2.8±0.14
III	7.7±0.4	3.3±0.25	3.7±0.35	3.6±0.1	2.0±0.25	1.0±0.07	2.9±0.25	2.5±0.17

Жирные цифры- $p < 0.05$ по сравнению с I группой

Изучение утилизации непосредственного предшественника ГАМК глутамата в гомогенатах мозга и поджелудочной железы крыс II и III групп показало, что и АТФ и, в особенности, пиридоксальфосфат усиливают утилизацию глутамата в гомогенатах обоих органов II группы крыс. Первый при этом усиливает выход аспартата, а второй – ГАМК. Как видно из данных табл. 3 и 4, стрептозотозин значительно подавляет стимулирующие эффекты АТФ и пиридоксальфосфата, что, возможно, связано с подавлением стрептозотозином митохондриальных ферментов, ответственных за окисление глутамата, или дефрагментацией митохондриальной ДНК.

Таблица 3. Утилизация экзогенного глутамата и образование ГАМК и аспартата в гомогенатах мозга крыс

Группы	II группа			III группа		
	ГК	ГАМК	АК	ГК	ГАМК	АК
Без инкубации	24.9±0.9	0.96±0.11	0.91±0.06	25.4±1.1	1.1±0.1	0.85±0.07
Инкубация	22.5±0.9	1.19±0.2	1.27±0.05*	24.2±0.8	1.0±0.08	0.9±0.06
АТФ	19.3± 0.5**	1.02±0.06	1.52±0.07**	23.2±0.9	0.9±0.08	1.1±0.08
ПФ	13.2± 0.9**	3.75± 0.2*	1.86±0.14**	18.6±0.7**	1.6±0.1**	1.2±0.09
АТФ+ПФ	12.0± 0.8**	4.15± 0.25*	2.1± 0.15**	19.0±1.2**	1.5±0.07**	1.2±0.1

**- $p < 0.05$ в сравнении с "без инкубации"; **- $p < 0.05$ в сравнении с "инкубация"*

Таблица 4. Утилизация экзогенного глутамата и образование ГАМК и аспартата в гомогенатах поджелудочной железы крыс

Группы	II группа			III группа		
	ГК	ГАМК	АК	ГК	ГАМК	АК
Без инкубации	26.2±1.7	0.78±0.09	0.83±0.08	25.8±1.5	0.9±0.1	0.9±0.1
Инкубация	23.4±1.3	0.92±0.15	1.15± 0.09*	24.4±1.2	1.2±0.1	0.95±0.08
АТФ	18.5±1.5**	1.0±0.1	1.45±0.1	21.6±1.7	0.95±0.07	1.22±0.08
ПФ	15.6±1.1**	2.95±0.2**	1.75±0.15*	17.2± 0.9**	1.4±0.1	1.2±0.1
АТФ+ПФ	14.5±0.9**	3.45± .3**	2.3±0.3**	17.0± 1.4**	1.6± 0.09**	1.3±0.1**

То же, что и в табл. 3

О нарушении стрептозотозином процессов окисления глюкозы, глутамина и глутамата в гомогенатах и митохондриях поджелудочной железы известно давно [12, 18-20]. Досконально изучены также механизмы действия этого диабетогена, связанные с алкилированием макромолекул и генерацией активных форм кислорода, однако мало известно о защитных механизмах от действия диабетогена.

Полученные в этом направлении данные позволяют говорить об эффективности использованной нами подкормки как средства, предупреждающего гипергликемический эффект стрептозотозина. Эффект подкормки комбинированный и,

скорее всего, связан с возможными ее противовоспалительными, антиоксидантными и антиоксидантными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аракелян Ф.Р., Арутюнян Э.Я., Камалян Р.Г.* К механизму действия бентонитовой глины у жвачных. Тезисы докладов научн. конфер. Ереван. зоовет. инст., с. 22-23, 1988.
2. *Камалян Р.Г., Мовсесян С.Г.* Некоторые стороны регуляции обмена глутамата, аспаргата и ГАМК в митохондриальной фракции мозговой ткани. *Вопр. биохим. мозга, Изд. АН АрмССР*, 2, с. 40-48. 2, 1966.
3. *Камалян Р. Г., Арутюнян А.А., Хачатрян Н.Х., Варданян А. Г., Тароян С.Г.* Влияние ГАМК-генерирующих факторов на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. *Мед. наука Армении, LV*, 4, с.32-42, 3. 2015.
4. *Adeghate E., Ponery A.S.* GABA in the endocrine pancreas: Cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue cell*, 34, 1-6, 2002.
5. *Baekkeskov S., Anastoot H. J., Christgaa S, Solimena M., Cascalho M.* Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347. p. 151-156, 1990.
6. *Blancquaert L, Baba Sh., Kwiarkowski S., Stautemas J., Stegen S.* Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by β -alanine transamination. *J. Physiol.*, 594,17, p.4849-4863, 2016.
7. *Blancquaert L, Everaert I & Derave W.* Beta-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18, p. 63-70, 2015.
8. *Boldyrev AA, Aldini G & Derave W.* Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev.*, 93, p. 1803-1845, 2013.
9. *Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neiryneck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R.* Change in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57, 6, p. 1470-1481, 2008.
10. *Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., Poggi M., Knauf C., Bastelica D.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 56, 7, p. 1761-1772 2007.
11. *Dong H., Kumar M., Zhang Y., Gyulkhandanyan A., Xiang Y.Y., Ye B., Perrella J., Hyder A., Zhang N., Wheeler M., Lu W.Y., Wang Q.* Gamma-aminobutyric acid up- and downregulates insulin secretion from beta cells in concert with changes in glucose concentration. *Diabetologia*, 49, p. 697-705, 2006.
12. *Fahien L.A., MacDonald M.J.* The complex mechanism of glutamate dehydrogenase in insulin secretion. *Diabetes*, 60, 10, p. 2450-2454, 2011.
13. *Franklin I, Wollheim C.* GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule. *J. General Physiology*, 123, 3, p. 185-190. 2004.
14. *Garry D.J., Sorenson R.L., Elde R.P., Maley B.E., Madsen A.* Immunohistochemical colocalization of GABA and insulin in beta cells of rat islet. *Diabetes*, 35, p. 1090-1095, 1986.
15. *Garry D.J., Coulter H.D., Mc Intee T.J., Wu J.Y., Sorenson R.L.* Immunoreactive GABA-T within the pancreatic islets localized in mitochondria in the β -cell. *J. Histochem. Cytochem.* 35, p. 831-836, 1987.
16. *Kaufman D.L., Erlander M.G., Clare-Salzler M., Atkinson M.A., Maclaren N.K., Tobin A.J.* Glutamate Decarboxylase Autoimmunity in Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J. Clin. Invest.*, 89, 1, p. 283-292, 1992.
17. *Lee Y., Hsu C., Lin M., Liu K., Yin M.* Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *European Journal of Pharmacology*, 513, Issues 1-2, p. 145-150, 2005.
18. *Michalik M., Erecinska M.* GABA in pancreatic islets: metabolism and function. *Biochem. Pharmacol.*, 44, 1, p.1-9, 1992.
19. *Michalik M., Nelson J., Erecinska M.* Glutamate production in islets of Langerhans: Properties of phosphate activated glutaminase. *Metabolism*, 41, 12, p. 1319-1326, 1992.

20. *Michalik M., Nelson J., Erecińska M.* GABA production in rat islets of Langerhans. *Diabetes*, 42, 10, p. 1506-1513, 1993.
21. *Okada Y., Taniguchi H., Shimada C.* High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in the rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science*, 194, p. 620-622, 1976.
22. *Park Y-D., Cui Z-Y., Wu G., Park H-S., Park H-J.* γ -aminobutyric acid secreted from islet β -cells modulates exocrine secretion in rat pancreas. *World J. Gastroenterol.*, 12, 19, p.3026-3030, 2006.
23. *Saifer A.* Comparative study of various extraction methods for the quantitative determination of free amino acids from brain tissue. *Anl. Biochem.*, 40, p. 412-423, 1971.
24. *Sorenson R.L., Garry D.G., Brelje T. C.* Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. *Diabetes*, 40, p. 1365-1374, 1991.
25. *Stellingwerff T.J., Decombaz J., Harris R.C. Boesch C.* Optimizing human in vivo dosing and delivery of β -alanine supplements for muscle carnosine synthesis. *Amino Acids*, 43, Issue 1, p. 57-65, 2012.
26. *Tian J.* Gamma-aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model. *J Immunol.*, 173, p. 5298-5304, 2004.
27. *Tian J., Dang H., Nguyen An V., Chen Z., Kaufman D.L.* Combined therapy with GABA and proinsulin/alum acts synergistically to restore longterm normoglycemia by modulating T-cell autoimmunity and promoting β -cell replication in newly diabetic NOD mice. *Diabetes*, 63, 9, 3128-3134, 2014.

Поступила 19.10.2018