

УДК 577. 112. 612

Сравнительное действие диабетогенов на содержание нейроактивных аминокислот в мозге и поджелудочной железе крыс

Н.Х. Хачатрян

*Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул.П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: мозг, поджелудочная железа, аллоксан, стрептозотцин, нейроактивные аминокислоты

Несмотря на то, что симптоматика диабета как первого, так и второго типов во многом отличается от искусственных экспериментальных моделей этого заболевания, они успешно используются для изучения патогенеза и терапии диабета [4, 11, 20]. История моделирования сахарного диабета довольно многообразна и разнообразна, начиная с панкреатэктомии и кончая химическими, химико-иммунологическими и генетическими моделями. Наиболее современными и приближенными к картине диабета являются генетические модели, особенно использование животных чистых линий, развивающих спонтанный сахарный диабет как первого, так и второго типа [13, 14]. Однако более доступными с методической и экономической точки зрения являются химические модели, использующие, в частности, уреидмезоксалевою кислоту аллоксан и (2-деокси-2-(нитрозометиламино)карбониламино)-D-глюкопиранозу – противоопухолевый антибиотик стрептозотцин [11, 20]. Оба химических диабетогена, благодаря амфотерности и структурному сходству с глюкозой, легко соединяются и поглощаются переносчиком глюкозы GLUT-2, однако механизм их действия заметно отличается, что отражается на вызываемых ими структурных и метаболических изменениях эндокринного аппарата поджелудочной железы и других органов. Так, оба диабетогена приводят к образованию активных форм кислорода, к некрозу и разрушению островковых β -клеток. Однако механизм действия аллоксана заключается в том, что он ингибирует глюкокиназу и нарушает сигнальное звено, отвечающее за синтез и секрецию инсулина, а механизм действия стрептозотцина, в отличие от аллоксана, заключается в выраженном алкилирующем действии на митохондриальную ДНК, что приводит к дефрагментации и нарушению митохондриальных реакций. В последние годы показано непосредственное влияние нейроактивных аминокислот, в частности ГАМК, на иммунный и эндокринный механизмы работы панкреаса [1, 3,

15-17, 21, 23]. Так, глутамин, являясь основным источником глутамата и ГАМК, одновременно снабжает иммунные клетки азотом, углеродом и энергией [15, 16]. Как в иммунных клетках [6, 9, 12], так и в поджелудочной железе [7, 8, 20, 22], представлены рецепторы глутамата и ГАМК, уравнивающие баланс возбуждающей и тормозящей трансмиссии, регулирующей синтез и выброс инсулина. Учитывая роль нейроактивных аминокислот в регуляции функций эндокринных желез лангергансовых островков, в особенности β -клеток, и влияние диabetогенов на патогенез и метаболизм диабета, представляло интерес сравнить сдвиги концентраций нейроактивных аминокислот при аллоксановой и стрептозотоциновой моделях диабета первого типа в мозге и поджелудочной железе экспериментальных животных.

Материал и методы

Исследования были проведены на белых крысах массой 180-200 г, содержащихся на обычном рационе в условиях вивария Института биохимии НАН РА. Животные были разделены на 3 группы по 5 в каждой: I, интактная группа, использована как контрольная, II группе крыс внутривентриально *ex tempore* вводили аллоксан в 1 мл охлажденного 0.01N HCl (150 мг/кг животного). III группе животных вводили стрептозотцин в 1 мл охлажденного цитратного буфера, pH 4,5 (50 мг/кг животного). На 4-й день животных забивали под легким эфирным наркозом, удаляли панкреас и мозг, в которых определяли аминокислоты семейства глутамина. Экстракцию аминокислот в мозге и поджелудочной железе осуществляли 6% HClO₄ в соотношении 1г ткани в 9мл перхлората [18]. Разделение аминокислот в перхлоратных экстрактах осуществляли методом высоковольтного бумажного электрофореза в пиридинацетатном буфере (1,6мл пиридина, 6,0 мл ледяной уксусной кислоты и до литра дистиллированной воды), pH 3,9. Аминокислоты определяли нингидриновым методом по калибровочным графикам, построенным с использованием стандартных аминокислот (глутамат, глутамин, аспартат и ГАМК) фирмы Sigma Chemical Company (USA) [2]. Глутамин определяли в электрофоретической фракции нейтральных аминокислот по амидному азоту с использованием микродиффузионного метода [19]. Все данные представлены как средняя $\pm$ стандартная ошибка, n=5. Статистический анализ проводили с помощью программы InStat (version 3 for Windows).

Результаты и обсуждение

В рис. 1 представлены результаты определения нейроактивных аминокислот в мозге интактных и отравленных аллоксаном крыс. Из схемы видно, что содержание аминокислот на 1 г сырой ткани мозга интактных

животных составляет $6,7 \pm 0,8$ мкмоль глутамата (ГК), $3,5 \pm 0,4$ глутамина (ГН), $2,5 \pm 0,2$ аспартата (АК) и $2,7 \pm 0,3$ ГАМК. В мозге животных, подвергнутых действию аллоксана, в концентрациях определяемых аминокислот не отмечается статистически достоверных изменений по сравнению с интактными. Так, в мозге аллоксановых крыс содержание глутамата, глутамина, аспартата и ГАМК составляет $6,9 \pm 0,7$; $3,8 \pm 0,4$; $1,8 \pm 0,2$ и $2,4 \pm 0,2$ мкмоль/г свежей ткани соответственно. Это свидетельствует о том, что аллоксан, скорее всего, не преодолевает гематоэнцефалический барьер.

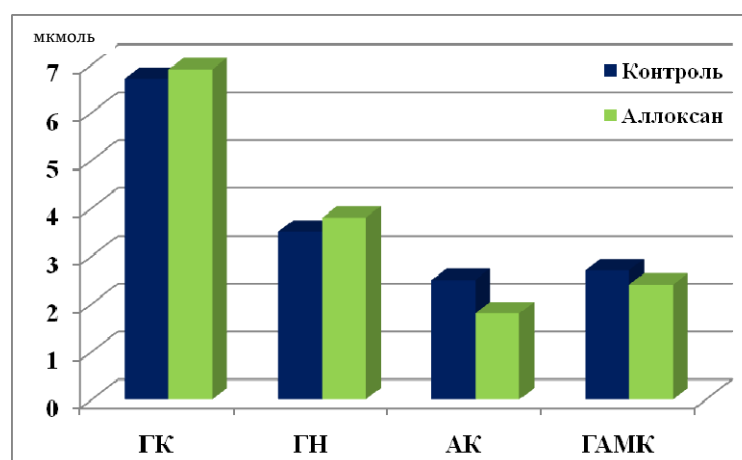


Рис. 1. Влияние аллоксана на содержание нейроактивных аминокислот в мозге крыс (мкмоль на 1 г свежей ткани)

В отличие от мозга, в поджелудочной железе введение аллоксана приводит к заметным изменениям в содержании аминокислот (рис. 2).

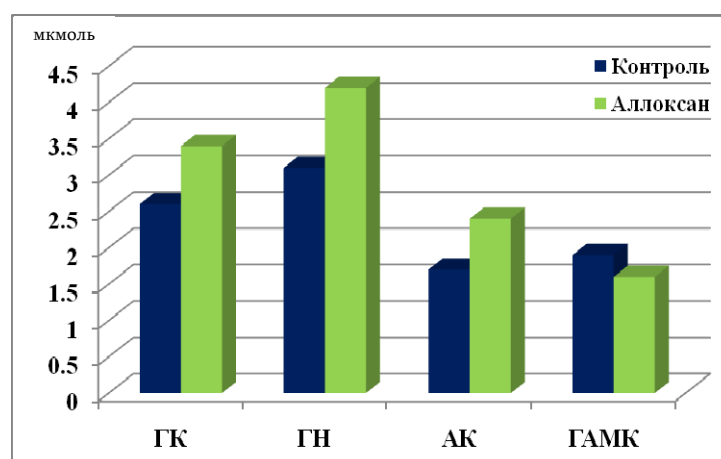


Рис. 2. Влияние аллоксана на содержание нейроактивных аминокислот в поджелудочной железе крыс (мкмоль на 1 г свежей ткани)

Так, содержание глутамина повышается по сравнению с интактными крысами на 35,5% ($4,2 \pm 0,4$ мкмоль на 1 г сырой ткани поджелудочной железы у аллоксановых и $3,1 \pm 0,3$ у контрольных), количество глутамата возрастает на 30,8% ($3,4 \pm 0,3$ мкмоль у аллоксановых и $2,6 \pm 0,3$ у интактных), а уровень аспартата – на 16,5% ($2,4 \pm 0,3$ мкмоль против $1,7 \pm 0,1$). При этом содержание ГАМК в поджелудочной железе под действием аллоксана статистически значимо не меняется ($1,6 \pm 0,2$ мкмоль на 1 г сырой ткани против $1,9 \pm 0,3$). Следовательно, аллоксан подавляет окисление возбуждающих аминокислот в поджелудочной железе и не влияет на утилизацию ГАМК.

Вместе с тем эксперименты, проведенные со стрептозотоцином, выявляют изменения в содержании нейроактивных аминокислот как в поджелудочной железе, так и в мозге. Это говорит о преодолении стрептозотоцином гематоэнцефалического барьера, что может быть связано с аффинностью мозговых переносчиков глюкозы GLUT-1 и GLUT-3. Так, под действием стрептозотоцина в мозге содержание глутамата падает с $6,7 \pm 0,8$ мкмоль у интактных животных до $5,2 \pm 0,5$, глутамина с $3,5 \pm 0,4$ мкмоль до $1,8 \pm 0,1$, аспартата – с $2,5 \pm 0,2$ мкмоль до $1,6 \pm 0,1$ и ГАМК – с $2,7 \pm 0,2$ мкмоль до $1,2 \pm 0,1$ (рис. 3).

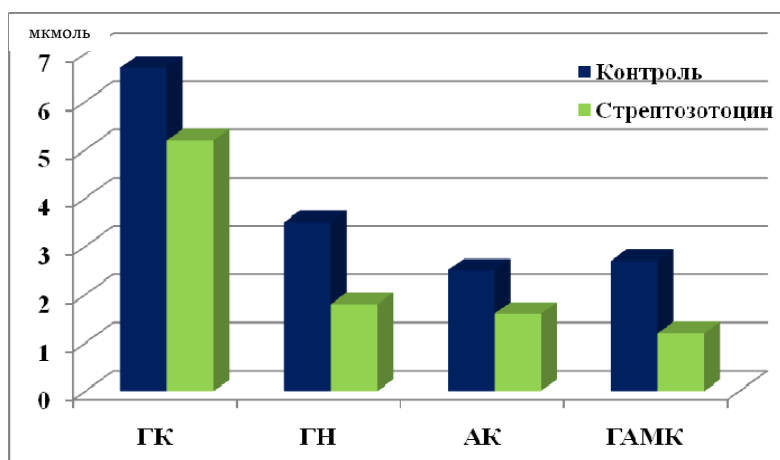


Рис. 3. Влияние стрептозотоцина на содержание нейроактивных аминокислот в мозге крыс (мкмоль на 1 г свежей ткани)

Таким образом, картина изменений в содержании нейроактивных аминокислот существенно отличается от таковой в мозге, что не может не отразиться на картине диабета, так как сдвиги в нейроергических, особенно ГАМК-ергических, механизмах отражаются на гомеостазе глюкозы [10]. Существенные количественные сдвиги в сторону уменьшения констатируются также в аминокислотах поджелудочной железы, кроме аспартата (рис. 4). Содержание глутамина падает с $3,1 \pm 0,3$ мкмоль до

1,4±0,1, глутамата – с 2,6±0,3 мкмоль до 1,1±0,1, ГАМК – с 1,6±0,2 мкмоль до 0,5±0,07, аспартата – с 1,7±0,1 мкмоль до 1,5±0,2.

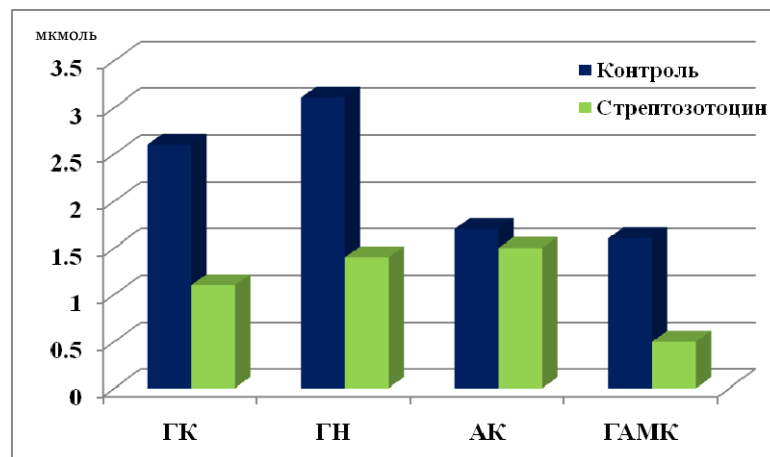


Рис. 4. Влияние стрептозотоцина на содержание нейроактивных аминокислот в поджелудочной железе крыс (мкмоль на 1 г свежей ткани)

Как видно из полученных данных, стрептозотоцин вызывает противоположные аллоксану сдвиги в содержании нейроактивных аминокислот, несмотря на, в принципе, сходную картину разрушения β -клеток. Полученные данные подтверждают различный механизм действия двух признанных химических диабетогенов на развитие сахарного диабета первого типа. О различиях в механизмах действия аллоксана и стрептозотоцина свидетельствуют также различия в картине гипергликемии, вызываемой как диабетогенами, так и возможными алиментарными факторами, такими как ожирение и состав кишечной флоры [7]. Об этом говорит также воздействие протекторов – в частности, предварительное введение этаноламин-О-сульфата полностью предупреждает гипергликемию, вызываемую аллоксаном, но не стрептозотоцином [5].

Поступила 10.06.20

Դիաբետոգենների համեմատական ազդեցությունը նյարդաակտիվ ամինաթթուների պարունակության վրա առնետի ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում

Ն. Խ. Խաչատրյան

Ցույց է տրված, որ ալոքսանը և ստրեպտոզոտոցինն առաջացնում են առաջին տիպի շաքարախտ տարբեր մեխանիզմներով: Դա

արտահայտվում է առնետի ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում նյարդաակտիվ ամինաթթուների տարբեր բաշխմամբ: Ուղեղում ալոքսանը չի ազդում ամինաթթուների պարունակության վրա, հավանաբար այն պատճառով, որ չի հաղթահարում հեմատոէնցեֆալիկ պատնեշը, իսկ ստրեպտոզոտոցինը զգալի փոփոխում է բոլոր հետազոտված նյարդաակտիվ ամինաթթուների կոնցենտրացիաները: Երկու դիաբետոգենների ազդեցության մեխանիզմների տարբերության մասին է վկայում նաև այն, որ ա) ենթաստամոքսային գեղձում դրանք առաջացնում են նշված ամինաթթուների կոնցենտրացիաների տարբեր փոփոխություններ, բ) էթանոլամին-Օ-սուլֆատը լիովին կանխում է ալոքսանի, բայց ոչ ստրեպտոզոտոցինի առաջացրած հիպերգլիկեմիան:

Comparative Effect of Diabetogens on the Content of Neuroactive Amino Acids in the Brain and Pancreas of Rats

N. Kh. Khachatryan

Alloxan and streptozotocin have been shown to cause type 1 diabetes by the different mechanism. This is manifested in particular by the different distribution of neuroactive amino acids in the brain and pancreas of rats, observed in the present work. Alloxan does not affect the levels of amino acids in the brain because it seemly does not penetrate the blood-brain barrier, while streptozotocin causes significant changes in the level of all studied neuroactive amino acids. Moreover, these diabetogens cause a) opposite changes in the concentration of these amino acids in the pancreas; b) ethanolamine-O-sulfate completely prevents hyperglycemia caused by alloxan, but not by streptozotocin.

Литература

1. *Камалян Р. Г., Варданян А.Г.* К обмену ГАМК и ГАМК-амида в мозге. Нейрохимия, 2012, т. 29, 2, с.118-121.
2. *Камалян Р. Г., Буянтян Г. Х., Мовсесян С. Г.* Участие некоторых нуклеотидов и пиридоксальфосфата в превращениях глутамата в митохондриальной фракции мозга. Вopr. биохимии мозга. Ереван, 1968, т.21, 5, с.16-26.
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 НАН РА, 2015, т. LV, 4, с.32-42.
4. *Мазо В.К., Сидорова Ю.С., Зорин С.Н., Кочеткова А.А.* Стрептозотоциновые модели сахарного диабета. Вопросы питания, 2016, т.85, 4, с.14-20.

5. *Хачатрян Н. Х., Варданян А. Г., Тароян С. Г., Хачатрян Р. С., Камалян Р. Г.* Влияние этаноламин-О-сульфата на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс в норме и при экспериментальном аллоксановом диабете. Биол. журн. Армении, 2017, 69 (1), с.68-72.
6. *Alam S., Laughton D.L., Walding A., Wolstenholme A.J.* Human peripheral blood mononuclear cells express GABA-A receptor subunits. *MolImmunol.*, 2006, 43,1432–1442.
7. *Canı P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neirynck 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*. 2008, 57(6), 1470-1481.
8. *Canı P.D., Amar J., Iglesias M.A. et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007, 56(7), 1761-1772.
9. *Kostanyan I.A., Merkulova M.I., Novolotskaya E.V., Nurieva R.I., Shemyakin-Ovchinnikov,* Study of interaction between L-glutamate and human blood lymphocytes. *Immunol. Lett.*, 1997. 58(3), p.177-180.
10. *Lang C.* Inhibition of central GABA A receptors enhances hepatic glucose production and peripheral glucose uptake. *Brain Res. Bul.*, 37,1995, p.611-616.
11. *Lenzen S.* The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008, 51(2), p. 216-226.
12. *Mendu S.K., Bhandage A., Jin Z., Birnir B.* Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes. *PLoS One* 2012, 7, e42959.
13. *Nerup, J., Platz, P., Andersen, O.O., Christy, M., Lyngse, J., Poulsen, J.E., Ryder, L.P., Thomsen, M., Nielsen, L.S., and Svejgaard, A.* HL-A antigens and Diabetes Mellitus., 1974. *The Lancet* 304, 864-866.
14. *Nyaga D. M., Vickers M. H., Jo. C., Perry K., O'Sullivan J. M.* The genetic architecture of type 1 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology*. V. 477, p.70-80, 2018.
15. *Newsholme E.A.* Nutrition of immune cells. The implications for whole body metabolism. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1997, 30(6), 345-361.
16. *Newsholme P.* Why Is L-Glutamine Metabolism Important to Cells of the Immune System in Health, Postinjury, Surgery or Infection. *J. Nutrition*. 2001,131, 2515S-2522S.
17. *Peakman M, von Herrath M.* Antigen-specific immunotherapy for type 1 diabetes: maximizing the potential. *Diabetes*. 2010,59, 2087–2093.
18. *Saifer A.* Comparative study of various extraction methods for the quantitative determination of free amino acids from brain tissue. *Anl. Biochem.* 1971, 40, p. 412-423.
19. *Seligson and Seligson H.* Microdiffusion method for determination of nitrogen liberates as ammonia. *J. Lab. Clin. Med.*, 1951, v. 38, p. 324-330.
20. *Szskudelski G.* The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, 2001, 50, 537-546.
21. *Tian J., Chau C., Hales T.G. et al.* GABAA receptors mediate inhibition of T cell responses *J.Neuroimmunol.*, 1999, 96, p. 21-28.
22. *Wang Q., Ren L., Gerald Y. W., Prud'homme J.* GABAergic regulation of pancreatic islet cells: Physiology and antidiabetic effects. *J. Physiol.* 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.28214>.
23. *Wan Y., Wang Q., Prud'homme G.J.* GABAergic system in the endocrine pancreas: a new target for diabetes treatment. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, 2015, 8, p.79-87.