

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 616.8-009.831-02:616.153.455-008.64]-07:616.831-091.81]-092.9

П. К. Телушкин¹, А. Д. Ноздрачев², П. П. Потапов¹**ИЗМЕНЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И ПОВРЕЖДЕНИЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК У КРЫС ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ ВЫСОКИХ ДОЗ ИНСУЛИНА**¹Кафедра биологической и биоорганической химии (зав. — проф. П. П. Потапов) Ярославской государственной медицинской академии, ²кафедра общей физиологии (зав. — акад. А. Д. Ноздрачев) Санкт-Петербургского государственного университета

В мозге крыс, перенесших 5—7 гипогликемических ком, на 2-е сутки восстановительного периода после последней комы, выявлено увеличение активности НАД-изоцитратдегидрогеназы и катаболизма адениловых нуклеотидов, а также уменьшение активности НАДН-дегидрогеназы, митохондриальной НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы и супероксиддисмутазы, изменений скорости гликолиза не обнаружено. При помещении срезов больших полушарий мозга подопытных животных в гипоосмолярную среду с добавлением Fe²⁺ и аскорбата увеличен выход лактатдегидрогеназы в среду инкубации. При этом наблюдается значительное повышение концентрации малонового диальдегида в срезах мозга подопытных крыс. Полученные результаты свидетельствуют об участии нарушений энергетического обмена и активации процессов перекисного окисления липидов в патогенезе постгипогликемической энцефалопатии.

Ключевые слова: мозг головной, гипогликемия, энергетический обмен, перекисное окисление липидов.

The brains of rats that had experienced 5-7 hypoglycemic comas on day 2 of the rehabilitative period after the last coma showed increases in the activity NAD-isocitrate dehydrogenase and in the catabolism of adenylnucleotides and decreases in the activities of NADH dehydrogenase, mitochondrial NADP-isocitrate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase, and superoxide dismutase, and no changes in the rate of glycolysis. Placing the brain slices in the hypoosmolar medium added by Fe²⁺ and ascorbate caused the higher yield of lactate dehydrogenase into the incubation medium. In this case, there was a significant elevation in the concentration of malonic dialdehyde in the brain slices from the experimental rats. The findings suggest that energy metabolic disturbances and activated lipid peroxidation are involved in the pathogenesis of postglycemic encephalopathy.

Key words: brain, hypoglycemia, energy metabolism, lipid peroxidation.

Гипогликемия в результате гиперинсулинемии является частым осложнением терапии сахарного диабета и наблюдается при инсуломе поджелудочной железы. В конечном итоге она приводит к развитию постгипогликемической энцефалопатии [3, 13, 14]. Существенными элементами патогенеза постгипогликемической энцефалопатии могут быть нарушения энергетического метаболизма и изменения интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), вызывающие повреждение клеточных мембран и гибель клеток.

В настоящей работе проведено исследование активности ферментов основных путей использования глюкозы и катаболизма адениловых нуклеотидов, а также интенсивности цитолиза и показателей ПОЛ в мозге крыс, неоднократно перенесших тяжелую инсулиновую гипогликемию.

Материалы и методы

Опыты выполнены на белых беспородных крысах обоего пола массой 180—220 г. Всех животных содержали на обычном рационе и перед опытом лишали пищи в течение 18—24 ч без ограничения в воде. Гипогликемическую кому (содержание глюкозы в крови около 1 ммоль/л) вызывали внутримышечной инъекцией инсулина в дозе 40 ЕД на 1 кг массы, купирование проводили введением коматозным животным 3 мл 40% раствора глюкозы в желудок. Подопытные животные перенесли 5—7

гипогликемических ком с интервалом 2 дня. Исследовали ткани больших полушарий и ствола мозга интактных животных (контроль) и крыс, декапитированных на 2-е сутки после 5—7-й гипогликемической комы.

Цитоплазматическую и митохондриальную фракции отделов мозга получали путем дифференциального центрифугирования [1]. Интенсивность гликолиза в цитоплазматической фракции определяли по скорости накопления лактата в инкубационной среде, используя в качестве субстратов глюкозу и глюкозо-6-фосфат [8]. Активность НАД-изоцитратдегидрогеназы (НАД-ИЦДГ, НФ 1.1.1.41), НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИЦДГ, НФ 1.1.1.42), НАД-малатдегидрогеназы (НАД-МДГ, НФ 1.1.1.37), НАДФ-малатдегидрогеназы (НАДФ-МДГ, НФ 1.1.1.40), глутаматдегидрогеназы (ГДГ, НФ 1.4.1.2), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, НФ 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, НФ 1.1.1.49) и глутатионредуктазы (ГР, НФ 1.6.4.2) оценивали спектрофотометрически [5]. Скорость НАДН-дегидрогеназной реакции (НАДН-ДГ, НФ 1.6.99.3.) определяли с дихлорфенолиндофенолом [19]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по торможению восстановления нитросинего тетразола [2].

При изучении общей АТФазной активности обработку ткани и процедуру определения проводили, как описано в работе [12]. 5'-Нуклеотидазную

Таблица 1

Активность дегидрогеназ (в нмоль/мин на 1 мг белка) и СОД (в ЕД на 1 мг белка) в мозге крыс, перенесших серию гипогликемических ком ($X \pm S_x$)

Показатель	Отдел мозга	Контроль	Опыт
НАД-ИЦДГ митохондриальной фракции	Большие полушария	47,8 ± 1,6	53,6 ± 4
	Ствол	33,7 ± 1,9	40,5 ± 1,8*
НАДФ-ИЦДГ митохондриальной фракции	Большие полушария	16,6 ± 0,8	16,5 ± 1
	Ствол	14,3 ± 1,8	9,0 ± 0,5*
НАД-МДГ митохондриальной фракции	Большие полушария	416 ± 6	432 ± 6
	Ствол	388 ± 8	354 ± 7*
НАДФ-МДГ митохондриальной фракции	Большие полушария	33,6 ± 2	31,8 ± 1,6
	Ствол	37,5 ± 1,6	34,7 ± 1,7
ГДГ митохондриальной фракции	Большие полушария	267 ± 18	265 ± 11
	Ствол	264 ± 15	250 ± 18
НАДН-ДГ митохондриальной фракции	Большие полушария	83,3 ± 1,8	84,4 ± 3,1
	Ствол	54,1 ± 2,1	46,0 ± 1,2*
ЛДГ цитоплазматической фракции	Большие полушария	294 ± 8	283 ± 15
	Ствол	265 ± 14	272 ± 9
Г-6-ФДГ цитоплазматической фракции	Большие полушария	12,2 ± 0,3	11,3 ± 0,2*
	Ствол	17,0 ± 0,4	17,2 ± 0,5
ГР цитоплазматической фракции	Большие полушария	11,0 ± 0,2	9,7 ± 0,3*
	Ствол	13,1 ± 0,7	13,0 ± 0,6
СОД цитоплазматической фракции	Большие полушария	210 ± 11	102 ± 12*
	Ствол	220 ± 12	135 ± 23*

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 число опытов в каждой серии 5—6; звездочкой обозначены статистически достоверные по сравнению с контролем изменения — $p < 0,05$.

активность (НФ 3.1.3.5) исследовали, внося в инкубационную среду АМФ в количествах, эквивалентных АТФ. Аденозинмонофосфатдеаминазную (АМФД, НФ 3.5.4.6) активность оценивали по накоплению аммиака. Среда инкубации включала 0,005 М калий-фосфатный буфер pH 7,6, 10 мМ АМФ, 5 мМ АТФ и 0,1—0,2 мг белка цитоплазматической или митохондриальной фракции. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали охлаждением проб до 0°C, белки осаждали ТХУ с последующим центрифугированием. К 0,05—0,2 мл супернатанта добавляли 5 мл безаммиачной воды, 0,1 мл реактива Несслера и регистрировали изменение оптической плотности при 400 нм в течение 15 с [3].

Интенсивность цитолиза исследовали по накоплению ЛДГ в среде инкубации [16]. Срезы больших полушарий мозга толщиной 0,35—0,40 мм готовили по описанию, приведенному в работе [17], и помещали в среду Кребса—Рингера следующего состава (в мМ): 132 NaCl, 5 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 1,3 MgCl₂, 1,2 CaCl₂, 10 глюкозы, pH 7,4. Предынкубацию срезов проводили при 37°C в течение 2 ч, затем срезы переносили в среду того же состава с уменьшенной вдвое концентрацией NaCl и инкубировали в течение 2 ч. В дальнейшем вносили в гипотоническую среду Fe²⁺ и аскорбат в конечных кон-

центрациях соответственно 10⁻⁵ и 2 · 10⁻⁴ М и продолжали инкубацию еще в течение 2 ч. По окончании опыта срезы гомогенизировали и оценивали в них уровень малонового диальдегида (МДА) [7].

Количество белка определяли по Лоури. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с применением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

У крыс, перенесших серию гипогликемических ком, не выявлено изменений активности НАД-зависимых дегидрогеназ в больших полушариях (табл. 1). При этом в них обнаружено уменьшение активности Г-6-ФДГ и ГР соответственно на 7 и 12%. В стволе мозга наблюдали увеличение активности НАД-ИЦДГ на 20% и снижение активности митохондриальных НАДФ-ИЦДГ и НАД-МДГ соответственно на 37 и 9%, а также снижение активности НАДН-ДГ на 15%. Активность СОД уменьшается в больших полушариях и в стволе мозга подопытных животных соответственно на 51 и 39% (см. табл. 1).

АТФазная активность, определяемая в митохондриальной фракции, не изменяется, а в цитоплазматической фракции, полученной из больших полушарий и ствола мозга, увеличивается соответственно на 16 и 31%, активность АМФД в исследованных отделах мозга увеличивается в цитоплазматической фракции на 30—46%, в митохондриальной фракции — на 20—27%; активность 5'-нуклеотидазы не изменялась (табл. 2).

Накопление ЛДГ в процессе предынкубации срезов мозга подопытных и контрольных животных в изотонической среде было одинаковым. Обнаружено увеличение выхода ЛДГ в гипотоническую среду из срезов мозга крыс, перенесших серию гипогликемических ком, по сравнению с интактными животными на 7%; $p < 0,05$ (контроль 74,4 ± 1,1, опыт 79,8 ± 1,7 мкмоль в 1 мин на 1 мг

Таблица 2

АТФазная и 5'-нуклеотидазная активность (в мкг PO₄³⁻/ч на 1 мг белка) и АМФ-деаминазная активность (в нмоль/мин на 1 мг белка) в мозге крыс, перенесших серию гипогликемических ком ($X \pm S_x$)

Показатель	Фракция	Отдел мозга	Контроль	Опыт
АТФазная активность	Цитоплазматическая	Большие полушария	79,7 ± 3,7	92,4 ± 4,0*
		Ствол	100,6 ± 10,2	132,3 ± 6,8*
	Митохондриальная	Большие полушария	278 ± 19	275 ± 19
		Ствол	187 ± 13	217 ± 6
5'-Нуклеотидазная активность	Цитоплазматическая	Большие полушария	370 ± 27	388 ± 28
		Ствол	616 ± 43	587 ± 40
	Митохондриальная	Большие полушария	105 ± 11	96 ± 6
		Ствол	116 ± 6	115 ± 7
АМФ-деаминазная активность	Цитоплазматическая	Большие полушария	30,2 ± 1,4	39,4 ± 2,2*
		Ствол	28,5 ± 1,1	41,3 ± 2,5*
	Митохондриальная	Большие полушария	32,5 ± 1,6	39,6 ± 1,9*
		Ствол	29,3 ± 1,2	37,3 ± 1,5*

белка). Еще большей (18%; $p < 0,05$) оказалась разница в выходе ЛДГ из срезов мозга контрольных животных и крыс, неоднократно перенесших гипогликемию, при добавлении в среду Fe^{2+} и аскорбата (контроль $44,1 \pm 2,3$, опыт $52,1 \pm 3,5$ мкмоль/мин на 1 мг белка). Уровень МДА в срезах мозга подопытных животных в конце инкубации оказался на 47% ($p < 0,05$) выше, чем у интактных животных: контроль $0,85 \pm 0,06$, опыт $1,12 \pm 0,07$ нмоль на 1 мг белка.

Глюкоза является главным энергетическим субстратом в мозге, основной путь ее использования — гликолиз, потокоформирующим ферментом которого в нервной ткани служит гексокиназа [6]. Изменений интенсивности гликолиза при использовании в качестве субстратов глюкозы и глюкозо-6-фосфата у крыс, неоднократно перенесших гипогликемию, не выявлено (табл. 3). Не обнаружено также изменений интенсивности гликолиза в состоянии собственно гипогликемической комы и в ранние сроки купирования однократной гипогликемической комы [9]. Полученные результаты согласуются с представлениями о том, что основным фактором, лимитирующим потребление глюкозы головным мозгом, в целом является не столько активность ферментов гликолиза, сколько скорость поступления глюкозы из крови к нейронам при изменении уровня гликемии [6, 13, 14].

Гипогликемическая кома является энергодефицитным состоянием и сопровождается нарушением ионных градиентов [13, 14], восстановление которых требует работы АТФаз. Na^+ -, K^+ -АТФаза плазматических мембран клеток мозга могут потреблять до 40% всей АТФ, образуемой в нервной ткани, и после фракционирования определяется преимущественно в цитоплазматической фракции [20], поэтому заманчиво предположить, что выявленные в настоящем эксперименте изменения активности АТФ, обнаруживаемые в цитоплазматической фракции, связаны с Na^+ -, K^+ -АТФазой.

Увеличение потребления АТФ неизбежно приводит к нарастанию уровня АМФ в мозге, что может способствовать распаду АМФ в дальнейшем [13]. Катаболизм АМФ осуществляется двумя путями — дезаминированием АМФ и его дефосфорилированием. При этом дезаминирование АМФ в АМФ-деаминазной реакции является одним из механизмов поддержания энергетического заряда клетки. Отсутствие изменений активности 5'-нуклеотидазы и увеличение активности АМФД (см. табл. 2) свидетельствуют о том, что в описанных условиях опыта дальнейший распад АМФ осуществляется преимущественно путем его дезаминирова-

ния. Таким образом, обнаруженное в настоящем эксперименте увеличение активности АМФД свидетельствует об увеличении катаболизма адениловых нуклеотидов в мозге крыс, неоднократно перенесших гипогликемию. Последующее окисление гипоксантина и ксантина в ксантиноксидазной реакции сопровождается продукцией супероксида-нион-радикала, что может явиться одним из факторов, способствующих инициации процессов ПОЛ в мозге крыс, перенесших серию гипогликемических ком. Кроме того, увеличение скорости катаболизма адениловых нуклеотидов происходит на фоне уменьшения активности Г-6-ФДГ (см. табл. 1), что может затруднять синтез адениловых нуклеотидов de novo.

НАД-ИЦДГ является одним из потокоформирующих ферментов цикла Кребса [6]. Увеличение ее активности, вероятно, отражает возросшие энергопотребности клеток мозга, обусловленные работой "ионных насосов" при гипогликемии и в восстановительном периоде. Уменьшение активности митохондриальной НАДФ-ИЦДГ (см. табл. 1) также может способствовать перераспределению потока изоцитрата по пути НАД-зависимого окисления. Активность НАД-ИЦДГ и Na^+ -, K^+ -АТФазы увеличена, а НАДФ-ИЦДГ — снижена также в состоянии гипогликемической комы и в ранние сроки восстановления, однако через 30 мин после введения глюкозы происходит нормализация активности ферментов [9, 12]. У животных, перенесших серию ком, подобные изменения активности этих ферментов наблюдаются на 2-е сутки после купирования последней комы. Таким образом, возникающие в ходе глубокой гипогликемии и раннего восстановительного периода изменения сохраняются продолжительное время у крыс, перенесших серию ком, возможно, представляя собой адаптацию обмена мозга к повторяющейся гипогликемии.

В срезах мозга подопытных животных не наблюдали значительных изменений устойчивости мембран клеток в средах с нормальным и пониженным осмотическим давлением. Последнее является косвенным свидетельством относительной сохранности процессов энергопродукции и достаточной работы "ионных насосов" в мозге крыс, перенесших серию гипогликемических ком. Внесение в гипотоническую среду инкубации срезов Fe^{2+} и аскорбата приводило к существенному увеличению интенсивности цитолиза и сопровождалось нарастанием уровня МДА. Выявленные изменения свидетельствуют о том, что существенным повреждающим фактором в патогенезе постгипогликемической энцефалопатии является снижение способности клеток бороться с активными формами кислорода. О снижении уровня системы антиоксидантной защиты в мозге крыс, подвергнутых гиперинсулинизации, свидетельствуют также уменьшение активности СОД, НАДФ-зависимых Г-6-ФДГ, НАДФ-МДГ, НАДФ-ИЦДГ и ГР (см. табл. 1). С одной стороны, эти ферменты обеспечивают работу системы антиоксидантной защиты, с другой — уменьшение их активности считают результатом развития окислительного стресса [15].

Таблица 3

Скорость образования лактата при использовании в качестве субстрата глюкозы и глюкозо-6-фосфат (в нмоль/мин на 1 мг белка) в мозге крыс, перенесших серию гипогликемических ком ($X \pm S_x$)

Субстрат	Отдел мозга	Контроль	Опыт
Глюкоза	Большие полушария	$46,7 \pm 1,5$	$45,8 \pm 2$
	Ствол	$41,5 \pm 1,9$	$39,8 \pm 2,5$
Глюкозо-6-фосфат	Большие полушария	$47,3 \pm 1,9$	$48,8 \pm 1,4$
	Ствол	$62,1 \pm 2,2$	$63,5 \pm 1,5$

НАДН-ДГ-комплекс также чувствителен к окислительному повреждению [18]. Наблюдалось уменьшение активности НАДН-ДГ в состоянии гипогликемической комы: активность фермента нормализуется через 30 мин после купирования однократной гипогликемии глюкозой [9] и оказывается сниженной на 2-е сутки после купирования последней из серии гипогликемических ком (см. табл. 1). Уменьшение НАДН-ДГ-активности, обнаруженное в настоящем эксперименте, может быть связано с окислением FeS-центров комплекса с активными формами кислорода и азота [18], образующимися в нервной ткани при гипогликемии.

Необходимо отметить, что наиболее выраженные изменения активности ферментов сосредоточены в стволе мозга. При этом нарушения гликогенолиза и обмена медиаторных аминокислот при гиперинсулинизации также наблюдаются в стволе мозга [10, 11]. Нарушения обмена, возникающие при неоднократном воздействии гипогликемии на мозг, а именно снижение уровня ГАМК, интенсивности гликогенолиза и активности НАДН-ДГ, являются общими для ряда патологических состояний, в частности, их рассматривают как характерные для болезни Паркинсона [15, 18]. Подобное сходство патохимических проявлений свидетельствует об общем механизме, их индуцирующем. Таким механизмом могут быть эксайтотоксичность глутамата и аспартата и связанная с ней активация процессов перекисного окисления [14, 18].

Комплекс патохимических изменений, возникающих при однократной гипогликемии, сравнительно быстро разрешается после купирования комы глюкозой [9, 12–14], но оказывается более выраженным и наблюдается более продолжительное время у крыс, перенесших серию тяжелых гипогликемических состояний. Существенным элементом патогенеза постгипогликемической энцефалопатии, таким образом, может быть фактор неоднократности воздействия гипогликемии на мозг, приводящий к нарушениям энергетического обмена и стимуляции процессов ПОЛ в нервной ткани.

Выводы

1. В мозге крыс, перенесших 5–7 гипогликемических ком, на 2-е сутки восстановительного периода после последней комы выявлено увеличение активности НАД-ИЦДГ и катаболизма адениловых нуклеотидов, а также уменьшение активности НАДН-ДГ, митохондриальной НАДФ-ИЦДГ, Г-6-

ФДГ, ГР и СОД. Изменений скорости гликолиза не обнаружено.

2. При помещении срезов больших полушарий мозга подопытных животных в гипосомлярную среду с добавлением Fe^{2+} и аскорбата наблюдали увеличение выхода ЛДГ в среду инкубации. При этом зафиксировано значительное повышение концентрации МДА.

3. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении энергетического обмена и активации процессов ПОЛ в патогенезе постгипогликемической энцефалопатии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глебов Р. Н., Дмитриева Н. М. // Биохимия. — 1975. — Т. 40, № 4. — С. 882–887.
2. Гуревич В. С., Контрощикова К. Н., Шатилина Л. В. // Лаб. дело. — 1990. — № 4. — С. 44–47.
3. Лебедева З. И., Березов Т. Т., Орехович В. Н. // Биохимия. — 1981. — Т. 46, № 1. — С. 85–91.
4. Лукьянчиков В. С., Балаболкин М. И. Гипогликемический синдром (Этиология, патогенез, диагностика, лечение). — М., 1987.
5. Методы биохимических исследований: Липидный и энергетический обмен / Под. ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982.
6. Нейрохимия / Под. ред. И. П. Ашмарина, П. В. Стукалова. — М., 1996.
7. Никушкин Е. В., Крыжановский Г. А., Михалева Л. И. и др. // Бюл. exper. биол. — 1989. — Т. 83, № 2. — С. 174–177.
8. Панин Л. Е., Третьякова Т. А., Русских Г. С., Войцеховская Е. Э. // Вопр. мед. химии. — 1982. — Т. 28, № 2. — С. 26–30.
9. Телушкин П. К. Активность окислительных ферментов, содержание субстратов цикла Кребса, свободного и пептидосвязанного глутамата в мозге крыс при гипогликемическом нервном синдроме: Автореф. дис. ... канд. — Челябинск, 1988.
10. Телушкин П. К., Потапов П. П. // Пробл. эндокринологии. — 1994. — Т. 40, № 5. — С. 53–54.
11. Телушкин П. К., Шидловская Т. Е. // Вопр. мед. химии. — 1996. — Т. 42, № 4. — С. 306–308.
12. Филиппов С. П. // Пробл. эндокринологии. — 1991. — Т. 37, № 5. — С. 52–54.
13. Auer R. N. // Stroke. — 1986. — Vol. 17, N4. — P. 699–708.
14. Auer R. N., Siesjo B. K. // Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. — 1993. — Vol. 7, N 3. — P. 611–625.
15. Cadet J. L., Brannock C. // Neurochem. Int. — 1998. — Vol. 32, N 2. — P. 117–131.
16. Erdo S. L., Michler A., Wolff J. R. // Brain Res. — 1991. — Vol. 542. — P. 254–258.
17. Fitzpatrick S. M., Cooper A. J. L., Duffy T. E. // J. Neurochem. — 1983. — Vol. 41, N 5. — P. 1370–1383.
18. Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P., Youdim M. B. H. // J. Neurochem. — 1994. — Vol. 63, N 3. — P. 793–807.
19. Kirk J. E. // Clin. Chem. — 1963. — Vol. 9, N 6. — P. 776–779.
20. Mourek J. // Sborn. Lek. — 1984. — Vol. 86, N 10. — P. 289–297.

Поступила 27.04.05