

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. А.И.КАРАЕВА**

На правах рукописи

Лейла Багдад гызы Гадирова

**ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА АКТИВНОСТЬ
ФОСФАТ-ЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ И
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МОЗГЕ КРЫС
В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

2411.01 – Физиология человека и животных

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание ученой степени
доктора философии по биологии**

БАКУ – 2015

Диссертация выполнена в лаборатории «Сравнительной и возрастной нейрохимии» Института Физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана

Научный руководитель:

член-корр. НАН Азербайджана,
доктор наук по биологии, профессор

Т.М.АГАЕВ

Официальные оппоненты:

доктор наук по биологии

Х.Ю.ИСМАЙЛОВА

доктор философии по биологии, доцент

А.Х.АЛИЕВ

Ведущая организация

Бакинский Государственный Университет
кафедра «Физиологии человека и животных»

Защита состоится «31 _____» 03 _____ 2015 г. в _____ на заседании Диссертационного Совета D 01.051 по присуждению ученой степени доктора наук и доктора философии при Институте Физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана.

Адрес: AZ 1100, г. Баку, ул. Шариф-заде, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета D01.051,
доктор философии по биологии, доцент

Е.О. БАЙРАМОВА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение в постнатальном онтогенезе последствий воздействия различных стрессорных факторов в период внутриутробного развития является одной из актуальных задач современной физиологии (Граф, 2005, Васильев; Туманова, Журавин, 2008; Отеллин, Хожай, Ватаева, 2011).

В пренатальном периоде в различных структурах развивающегося мозга крыс гипоксия индуцирует дезорганизацию процессов пролиферации, миграции и дифференциации нейробластов, формирования нейронных сетей, синаптической пластичности (Журавин, Дубровская, Туманова, 2003, Васильев, Туманова, Журавин, 2008). В этих процессах отмечается активное участие нейромедиаторов, в частности глутамата, а также ферментов его метаболизма глутаминазы и глутаматдегидрогеназы, имеющих важнейшее значение в созревании нервных клеток (Bae, Wang, Li et al., 2013). При этом пренатальная гипоксия, нарушая формирование нейронных цепей, может вызвать долговременные поведенческие эффекты (Herlenius, Lagercrantz, 2004).

Нейротрофические и нейротоксические свойства возбуждающих аминокислот привлекают особое внимание к исследованию глутаматергической системы в период созревания мозга, т.к. изменения данной системы могут иметь последствия в патологических процессах на ранних стадиях постнатального развития мозга (Retz, Kornhuber, Riederer, 1996, Price, Willshaw, 2000, Vexler Z.S., Ferriero D.M., 2001).

В пренатальном периоде развития головного мозга показан широкий спектр физиологических и патофизиологических функций глутамата, который, кроме нейротрансмиссии, выполняет также трофическую функцию, тем самым регулируя выживаемость, рост и дифференцировку нейронов, а также становление и поддержание нейрональных цепей. С другой стороны, гиперактивация рецепторов глутамата может инициировать каскад клеточных процессов, приводящих к повреждению нейронов и апоптозу, наиболее выраженному при некоторых клинических расстройствах, включая гипоксию (McDonald, Johnston, 1990).

Краткосрочные и долгосрочные последствия воздействия пренатальной гипоксии на развитие мозга могут отражаться в задержке развития рефлексов, ухудшении обучения и памяти (Golan,

Huleihel, 2006), а также нарушении нейрохимических механизмов в различных структурах мозга взрослых потомков (Маслова, Граф, Маклакова и др., 2004, Граф, Маслова, Маклакова и др., 2005).

В связи с тем, что главный возбуждающий нейромедиатор – глутамат играет важную роль в регуляции деятельности ЦНС, в процессах обучения и памяти (Baudry, Lynch, 2001), с нарушением его метаболизма связывают большинство нарушений когнитивных функций (Бокша, 2004, Moghaddam, Javitt, 2012).

Исходя из вышесказанного, представляет значительный интерес изучение ферментов глутаматного метаболизма в структурах головного мозга крыс после воздействия пренатальной гипоксии.

Целью работы было изучение возрастных особенностей изменения активности фосфат-зависимой глутаминазы и глутаматдегидрогеназы в различных областях головного мозга крыс, подвергнутых воздействию гипоксии в различных периодах пренатального развития.

Задачи исследования:

1. Анализ изменения общей и удельной активности фосфат-зависимой глутаминазы и глутаматдегидрогеназы, определяющих динамику нейротрансмиттерного глутамата в различных областях головного мозга крыс после гипоксии, перенесенной в различные сроки (на 3-7, 9-15 и 16-21-ые дни) пренатального онтогенеза.

2. Исследование регионального распределения данных ферментов метаболизма нейротрансмиттерного глутамата в структурах головного мозга – коре, гипоталамусе, мозжечке, среднем и продолговатом мозге крысят, перенесших пренатальную гипоксию.

3. Изучение закономерностей в динамике глутаминазы и глутаматдегидрогеназы в ткани и субклеточных митохондриальных фракциях различных структур мозга семнадцатидневных, одно-, трех- и шестимесячных крыс, пренатально развившихся в гипоксических условиях.

Научная новизна. В работе впервые установлена связь между воздействием гипоксии на различных сроках беременности и выявляемым у потомства в возрастной динамике изменениям различной степени выраженности показателей активности глутаминазы и глутаматдегидрогеназы в корковых и подкорковых структурах головного мозга. Впервые обнаружено, что после воздействия пренатальной гипоксии изменение активности глутаминазы имеет характерную закономерность: отмечается резкое повышение

активности в ткани и митохондриальных фракциях различных структур мозга 17-дневных и одномесячных крысят, в то время как в трех- и шестимесячном возрасте наблюдается достоверное снижение ее активности. При этом наблюдается адекватное увеличение активности глутаматдегидрогеназы, направленное на утилизацию глутамата в данных структурах мозга. Показано, что нарушения глутаматного синтеза в различных структурах мозга сохраняются и у взрослых животных, подвергнутых воздействию пренатальной гипоксии. В экспериментальной модели пренатальной гипоксии было проанализировано возможное участие глутаминазы и глутаматдегидрогеназы в процессе ферментативной адаптации, направленном на поддержание глутаматного нейротрансмиттерного пула в мозге потомства в различные периоды постнатального развития.

Научно-практическая ценность. Полученные результаты исследований значительно расширяют знания о роли глутаминазы, а также глутаматдегидрогеназы в структурах головного мозга животных, перенесших гипоксию на разных стадиях пренатального онтогенеза. Показано, что усиление синтеза глутамата через митохондриальную глутаминазу может иметь патогенетическое значение, т.к. избыток глутамата может иметь нейротоксический эффект, приводящий к дегенерации нейронов мозга, а повышение глутаматдегидрогеназы имеет адаптационно-компенсаторное значение при нарушениях, вызванных воздействием пренатальной гипоксии. Выявленные изменения указывают на ключевую роль глутаминазной и глутаматдегидрогеназной реакции в метаболизме глутамата в мозге, что имеет важное значение в поиске способов уменьшения последствий постнатальных дисфункций после воздействия гипоксии в пренатальный период.

Положения, выносимые на защиту:

1. У крыс, подвергнутых гипоксии в разные периоды пренатального онтогенеза, установлена динамика активности ферментов глутаматного метаболизма – глутаминазы и глутаматдегидрогеназы, отражающая заметные сдвиги в глутаматергической системе в различных структурах головного мозга.

2. У животных, подвергнутых пренатальной гипоксии, наблюдается существенное повышение глутаминазной и глутаматдегидрогеназной активности, различающееся в различных структурах головного мозга в раннем постнатальном развитии, а в трех- и шестимесячном периоде в некоторых структурах мозга отмечаются

как разнонаправленные изменения, так и тенденция снижения активности.

3. Выявленная динамика повышения активности ферментов синтеза глутамата в мозге 17-дневных и одномесячных крыс, подвергнутых гипоксии в плодном, зародышевом периоде и в период органогенеза вносит значительный вклад в понимание механизмов долгосрочных эффектов пренатального стресса.

Апробация работы. Материалы диссертации были обсуждены на: Республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы спортивной физиологии» (Баку, 2008), International Brain Researchers Organization (IBRO) VLTP “Neuroscience course” (Тбилиси, Грузия, 2008), Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды» (С.-Петербург – Колтуши, 2010), научном семинаре Института Физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана (Баку, 2011), VII и X Международном междисциплинарном конгрессе "Нейронаука для медицины и психологии" (Судак, Украина, 2011, Россия, 2014), научно-практической конференции «Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга» (Ростов-на-Дону, 2011), III Съезде физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека» (Ялта, Украина, 2011), II Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (Бодрум, Турция, 2012), VII Сибирском съезде физиологов (Красноярск, 2012), III и IV Научной конференции молодых ученых «Экспериментальная и прикладная физиология» (Москва, 2012, 2013), III Республиканской ярмарке инновативных идей молодых ученых (Баку, 2013), Международной конференции «Стресс и развитие: нейрохимические и нейрофизиологические механизмы», посвященной 90-летию со дня рождения Национального Лидера Г.Алиева (Баку, 2013), International Baku Forum of young scientists: New challenges in the European area (Баку, 2013), III Съезде физиологов Грузии (Тбилиси, Грузия 2013), II Международной научной конференции молодых исследователей, посвященной 91-летию со дня рождения Национального Лидера Г.Алиева (Баку, 2014).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 23 работы (8 статей и 15 тезисов).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора

литературы, материалов и методов исследования, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы, включающего 260 источника, из которых 63 на русском, 197 – английском и других языках. Диссертация содержит 17 таблиц, 2 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на крысах линии Вистар. Самок крыс в количестве 150 особей подвергали гипоксии в различные сроки беременности: 3-8-ые дни (соответствует зародышевому периоду), 9-15-ые дни (соответствует периоду органогенеза) и 16-21-ые дни (соответствует плодному периоду). Самки подвергались гипоксии по методу (Хватова, 1983) в барокамере объемом 0,012 м³, (5% O₂ и 95% N₂) в течение 20-30 минут ежедневно в соответствующие периоды беременности. Полученное потомство контрольных и опытных крыс использовалось в опытах в возрасте 17дней (период прозревания), 1 месяц (период отъема крысят от матери), 3 месяца (период половозрелости) и 6-месяцев (взрослые животные) (всего 980 особей). После декапитации мозг разделяли на структуры согласно атласам мозга крысы (Светухина, 1962, Pellegrino et al., 1979). Ткань мозга измельчали при помощи гомогенизатора, фракция исходных митохондрий была выделена методом дифференциального центрифугирования (Somogyi et al., 1962, Chinopoulos et al., 2011). Активность фосфат-зависимой глутаминазы (КФ 3.5.1.2.) определялась прямым фенол-гипохлоритным методом (Магарламов, Заикин, Беляева, 1979). Активность глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2) определялась кинетическим методом (Клюева Н.Н., 1982). Содержание общего белка измеряли по методу Бредфорд (Kruger, 2002).

Все эксперименты выполнены с соблюдением принципов международной декларации Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) о защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Обработка данных проводилась в программе OriginPro 7.0. Статистическую обработку проводили с использованием пакета анализа программ Statistic и Microsoft Excel. Оценка значимости различий данных между контрольными и опытными группами проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. При значениях $p < 0.05$ различия считались достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность фосфат-зависимой глутаминазы в различных структурах головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе после воздействия гипоксии в различных периодах пренатального развития

В данной работе была исследована общая и удельная активность фосфат-зависимой глутаминазы, основного фермента синтеза нейромедиаторного глутамата, в ткани и митохондриальной фракции различных структур мозга крыс, после воздействия гипоксии в различные периоды пренатального развития.

Результаты проведенных исследований показали (Табл. 1), что в структурах мозга 17-дневных крыс, родившихся от самок, подвергнутых гипоксии на 3-8-ые дни беременности (зародышевый период) обнаруживается резкое повышение общей активности глутаминазы в митохондриях зрительной, лимбической, орбитальной коры и гипоталамуса на 82; 60; 30; 74% и некоторое снижение в сенсомоторной коре и среднем мозге на 18 и 13%, соответственно, по сравнению с контрольной группой. У одномесечных крыс общая активность фермента в митохондриях гипоталамуса, лимбической, сенсомоторной и орбитальной коры повышается на 53%, 45%, 31% и 23%, соответственно, по сравнению с контролем. В мозжечке, зрительной коре и продолговатом мозге наблюдается лишь незначительные изменения ферментативной активности. У трехмесячных крыс общая активность фермента повышается в митохондриях гипоталамуса, орбитальной и сенсомоторной коры на 48, 30 и 21%, соответственно, а в митохондриях зрительной коры отмечается снижение активности на 20% по сравнению с контролем. В шестимесячном периоде постнатального онтогенеза отмечается повышение показателей глутаминазной активности только в митохондриальных фракциях орбитальной коры и гипоталамуса на 21 и 36%, соответственно по сравнению с контролем.

Согласно полученным данным, у 17-дневного потомства крыс, подвергнутых гипоксии на 9-15-ые дни (период органогенеза) беременности обнаружены характерное повышение общей активности глутаминазы в митохондриях зрительной, лимбической, орбитальной коры, гипоталамуса и среднего мозга на 148; 135; 60; 75; 40%, соответственно, по сравнению с контролем. В мозжечке, сенсомоторной коре и продолговатом мозге изменения менее выражены. В

одномесячном возрасте в митохондриях лимбической, зрительной, орбитальной коры и гипоталамуса отмечается повышение активности глутаминазы на 68%; 36%; 18% и 28%, соответственно.

Таблица 1.

Постнатальные изменения активности фосфат-зависимой глутаминазы в митохондриальных фракциях структур головного мозга крыс после гипоксии в различные периоды пренатального развития (мкмоль N-NH₃/час·г, M±SEM; n=8).

Области мозга	Периоды пренатал. развития	Возраст животных			
		17 дневные	1 месячные	3 месячные	6 месячные
Орбитальная кора	Зародыш.	257±9(130)***	339±32(123)*	530±29(130)**	299±7(121)**
	Органог.	315±15(160)***	310±28(118)*	398±19(108)	286±10(116)*
	Плодный	348±11(176)***	368±13(140)***	479±10(130)**	272±8(110)
Зрительная кора	Зародыш.	381±8(182)***	242±21(96)	305±18(80)*	237±8(91)
	Органог.	520±11(248)***	320±17(136)*	267±15(69)*	233±9(89)*
	Плодный	443±18(211)***	164±12(70)***	275±12(72)***	204±8(78)***
Сенсомоторная кора	Зародыш.	139±9(82)*	298±19(131)**	518±30(121)*	296±10(108)
	Органог.	190±9(112)	220±10(90)	390±14(91)	269±12(98)
	Плодный	143±10(84)	182±8(75)**	367±14(85)**	219±11(80)**
Лимбическая кора	Зародыш.	299±6(160)***	334±28(145)*	358±23(96)	286±10(90)
	Органог.	439±12(235)***	380±22(168)**	398±14(106)	157±12(61)***
	Плодный	288±8(154)***	305±8(137)***	406±10(109)*	234±12(90)
Мозжечок	Зародыш.	130±8(110)	154±17(115)	200±16(88)	147±10(90)
	Органог.	125±8(105)	146±8(110)	231±8(102)	154±11(94)
	Плодный	273±11(229)***	218±9(164)***	285±11(126)*	125±12(76)*
Гипоталамус	Зародыш.	295±9(174)***	313±32(153)**	451±14(148)***	277±9(136)***
	Органог.	297±10(175)***	273±9(128)*	235±9(77)**	125±6(61)***
	Плодный	161±9(95)	221±10(104)	237±14(78)***	185±11(90)
Средний мозг	Зародыш.	99±5(87)	157±15(107)	229±17(93)	215±12(114)
	Органог.	161±11(140)**	108±5(74)*	197±11(79)*	167±9(89)
	Плодный	158±9(137)**	175±11(120)	314±9(127)*	153±9(81)
Продолговатый мозг	Зародыш.	178±9(130)*	165±15(102)	226±12(91)	223±10(107)
	Органог.	162±10(118)	219±8(135)*	166±10(66)*	173±9(83)*
	Плодный	177±11(128)*	199±9(123)**	279±10(112)*	229±5(109)

Примечание: в скобках проценты по сравнению с контролем, звездочками обозначена достоверность различий по сравнению с контролем:
 * - p< 0,05 ** - p< 0,01 *** p<0,001

В митохондриях среднего мозга наблюдается снижение на 26% по сравнению с контрольной группой. У крыс трехмесячного возраста наблюдаются менее выраженные изменения в митохондриях лимбической, орбитальной и сенсомоторной коры. В митохондриях зрительной коры и гипоталамуса отмечается снижение на 31% и 23%, соответственно. У животных этой группы, достигших шестимесячного возраста, отмечается достоверное понижение активности энзима в митохондриях лимбической и зрительной коры, гипоталамуса и продолговатого мозга на 39; 11; 39; 17%, соответственно в сравнении с контролем. В митохондриях орбитальной коры наблюдается некоторое повышение активности на 16%. При этом активность глутаминазы в митохондриях мозжечка достоверно не изменяется во всех четырех возрастных периодах постнатального онтогенеза после подвергания гипоксии в период органогенеза.

У потомства крыс, подвергнутых гипоксии на 16-21-ые дни беременности (плодный период) в 17-дневном возрасте обнаруживается повышение активности глутаминазы в митохондриальной фракции зрительной, орбитальной, лимбической коры и мозжечка на 105; 56; 47 и 120%, соответственно, и снижение в митохондриях сенсомоторной коры и гипоталамуса на 18 и 14%, соответственно. У потомства, достигшего одномесячного возраста, активность глутаминазы также повышается в митохондриях мозжечка, орбитальной и лимбической коры на 64; 40 и 36%, и снижается в сенсомоторной и зрительной коре на 25 и 30%, соответственно, в сравнении с контрольными показателями. В трехмесячном возрасте у крыс данной группы, уровень активности глутаминазы достоверно повышается в орбитальной коре, мозжечке, среднем и продолговатом мозге на 30; 26; 27 и 12%, соответственно, тогда как в митохондриях зрительной, сенсомоторной коры, гипоталамуса отмечается понижение активности на 28; 15; 22% в сравнении с контролем. У шестимесячных крыс, подвергшихся гипоксии в плодный период, активность фосфат-зависимой глутаминазы в митохондриях, также как и в ткани, изучаемых структур мозга имеет тенденцию к снижению. Так, в митохондриях мозжечка, зрительной и сенсомоторной коры выявляется снижение глутаминазной активности на 24; 22 и 20%, соответственно, по сравнению с контролем.

Таким образом, исследования показывают, что после перенесенной пренатальной гипоксии изменение глутаминазой

активности, имеет зависящую от возраста динамику и различается в различных структурах мозга крысят.

Динамика глутаматдегидрогеназы в митохондриях различных структур мозга крыс, подвергнутых воздействию гипоксии на разных этапах пренатального развития

Согласно полученным данным (таблица 2), после воздействия пренатальной гипоксии на 3-8-ые дни беременности (зародышевый период) активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) имеет тенденцию повышения во всех исследуемых структурах мозга 17-дневных крысят. Так, повышение удельной активности ГДГ отмечается в митохондриях гипоталамуса – на 27%, среднего мозга – на 32% и продолговатого мозга – на 65%, по сравнению с контрольной группой. В митохондриях коры и мозжечка значительных изменений не обнаружено. У крыс в одномесячном возрасте активность ГДГ в митохондриях среднего и продолговатого мозга повышается на 62 и 34%, соответственно, по сравнению с контролем. В остальных исследованных структурах мозга отмечались незначительные изменения. В трехмесячном возрасте данной группы опытных животных отмечается снижение активности энзима ГДГ в коре больших полушарий – на 19%, среднем мозге – на 32%, продолговатом мозге – на 29% и повышение активности в мозжечке – на 25% по сравнению с данными контроля. В шестимесячном возрасте у крыс, подвергнутых гипоксии, как в зародышевый период, так и в другие периоды пренатального развития значимых различий не отмечалось по сравнению с данными контрольной группы.

Результаты следующей серии экспериментов показали, что после подвергания гипоксии на 14-17-ые дни беременности (период органогенеза) наблюдаются более выраженные изменения удельной активности ГДГ, чем в предыдущей серии опытов. Так, у 17-дневных крысят в митохондриальной фракциях коры больших полушарий отмечается повышение активности ГДГ на 56%, мозжечка – на 41%, гипоталамуса – на 57%, среднего мозга – на 47%, продолговатого мозга – на 34% по сравнению с контрольными показателями. У крыс одномесячного возраста отмечается возрастание активности ГДГ в среднем мозге – на 68%, продолговатом мозге – на 49%, мозжечке – на 18% по сравнению с контролем. В митохондриях гипоталамуса и

коры больших полушарий мозга изменения слабо выражены. В трехмесячном возрасте во всех структурах мозга крыс наблюдается стабилизация ГДГ-ной активности за исключением продолговатого мозга, где наблюдается повышение на 16% по сравнению с контролем.

Таблица 2.

Влияние гипоксии, перенесенной в различные периоды пренатального развития, на активность глутаматдегидрогеназы во фракциях исходных митохондрий различных структур мозга крыс (мкмоль НАДФ/мин·мг белка $M \pm SEM$; $n=5$)

Области мозга	Периоды пренатал. развития	Возраст животных		
		17 дневные	1 месячные	3 месячные
Кора больших полушарий	Зародыш.	23,67±1,94(108)	28,05±1,96(107)	19,65±1,36(81)*
	Органог.	33,98±0,38(156)***	29,27±2,28(112)	23,54±0,85(97)
	Плодный	30,27±0,52(139)*	32,09±6,12(122)*	24,71±0,72(102)
Мозжечок	Зародыш.	19,17±1,44(110)	19,44±2,21(94)	22,62±1,54(125)*
	Органог.	24,66±0,85(141)***	24,43±1,21(118)*	19,69±1,60(109)
	Плодный	27,93±0,86(159)***	28,64±4,08(138)*	23,74±1,71(131)*
Гипоталамус	Зародыш.	20,72±1,05(127)**	19,70±1,43(120)	18,24±0,78(109)
	Органог.	25,47±1,01(157)***	20,78±1,46(127)	19,67±0,80(118)
	Плодный	22,17±0,60(136)**	21,22±1,25(129)*	15,5±1,09(93)
Средний мозг	Зародыш.	13,37±2,00(132)*	15,17±1,48(162)***	9,25±0,49(68)*
	Органог.	14,86±1,66(147)*	17,98±0,85(158)***	14,70±0,95(108)
	Плодный	13,90±0,34(138)***	15,02±1,45(140)*	15,33±1,06(113)
Продолговатый мозг	Зародыш.	24,31±3,77(165)*	21,05±1,83(134)*	10,71±0,30(71)***
	Органог.	19,85±1,48(134)*	23,36±2,04(149)*	17,48±1,37(116)*
	Плодный	18,03±0,69(122)*	20,48±1,42(130)*	16,55±0,15(110)

Примечание: в скобках проценты по сравнению с контролем, звездочками обозначена достоверность различий по сравнению с контролем:
* - $p < 0,05$ ** - $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Как показали результаты исследований, после воздействия гипоксии в плодный период, в мозге 17-дневных крысят, активность ГДГ претерпевает существенные изменения по сравнению с контрольной группой. Наибольшее повышение активности фермента отмечается в митохондриях мозжечка – на 59%, коры больших полушарий – на 39%, гипоталамуса – на 36%, среднего и продолговатого мозга – на 38 и 22% по сравнению с данными контроля. У одномесячных животных данной группы также отмечается увеличение активности

митохондриальной ГДГ в среднем и продолговатом мозге – на 40 и 30%, в гипоталамусе – 29%, в коре больших полушарий – на 22%, мозжечке – на 38%, тогда как в группе крыс трехмесячного возраста отмечается стабилизация активности ГДГ в коре больших полушарий, гипоталамусе, среднем и продолговатом мозге, за исключением мозжечка, где все еще сохраняется достоверное повышение активности на 31% по сравнению с контролем.

Таким образом, чтобы понять причину вызванных изменений нужно учесть ведущую роль глутаминазы в процессе созревания нервных клеток в пренатальный период (Wang, Huang, Zhao, et al., 2014) и ее роль в синтезе глутамата, выполняющего нейротрансмиттерную, а также эксайтотоксическую роль (Курбат, 2009) в постнатальный период развития мозга. При этом, воздействие гипоксии оказывает отрицательное воздействие на синаптический аппарат нейронов различных корковых и подкорковых структур головного мозга детенышей крыс (Васильев и др., 2008, Hanse, Taira, Lauri, 2009).

В реализации нарушений развития физиологических функций у потомства после воздействия гипоксии в пренатальный период большое значение имеет увеличение глюкокортикоидов матери и подавление активности плацентарной 11 β -гидрокси-стероид-дегидрогеназы 2 типа, в норме обеспечивающей барьерную функцию для материнских глюкокортикоидов. Молекулярные механизмы, лежащие в основе программирования последствий пренатального стресса, реализуются через эпигенетические изменения в хроматине, влияющие на тканеспецифичную экспрессию глюкокортикоидных рецепторов (Hardy, Yang 2002, Mairesse 2007, Cottrell 2009).

При этом необходимо отметить, что гипоксия в эмбриональном мозге реализует свой специфический эффект через активацию сигнального пути гипоксия-индуцируемого фактора (HIF), который является важным звеном в становлении физиологических систем во время эмбрионального развития. HIF 1 взаимодействует с нейрональными генами, что приводит к комплексному изменению развития ЦНС (Schmidt-Kastner, van Os, Steinbusch, 2006, Benizri, Ginouvés, Berra, 2008). В тоже время HIF имеет защитное действие в ответ на глутаматную нейротоксичность (Vazquez-Valls, Flores-Soto, Chararro-Huerta, 2011).

Полученные нами результаты о более выраженном повышении активности глутаминазы и глутаматдегидрогеназы в 17-дневном

возрасте, чем у 3-месячных животных, соответствуют данным (Тюлькова, Семенов, Ватаева, 2011) об изменении статуса глутаматных рецепторов mGluR I в мозге пренатально гипоксированного потомства крыс этих возрастных групп. При этом, следует также рассмотреть, что выявленное у 17-дневных животных выраженное увеличение синтеза глутамата глутаминазой, может иметь эксайтотоксический эффект, который приводит к дегенерации и апоптозу нейронов (Tian, Erdmann, Zhao, 2008) в различных структурах головного мозга. В это время увеличение активности глутаматдегидрогеназы является адаптационной реакцией, направленной на снижение высокого уровня глутамата на фоне сниженной активности глутаминсинтетазы, расщепляющей глутамат (Хаирова, Агаев, 2013). У одномесячных крыс активность глутаминазы в различных структурах мозга пренатально гипоксированных крыс повышается менее выражено, что может быть связано с увеличением активности как глутаматдегидрогеназы, так и аспартат- и аланинаминотрансферазы (Аббасова, 2009). Уменьшение активности глутаминазы на следующих этапах постнатального онтогенеза, в трех- и шестимесячном возрасте, имеет защитно-адаптационный характер, т.к. приводит к ослаблению чрезмерной активации рецепторов глутаматом, который является нейротрансмиттером в глутаматергических нейронах, а также предшественником γ -аминомасляной кислоты в ГАМК-ергических нейронах (Holten, Gundersen, 2008, Mendoza, Foundas, 2008), а также обеспечивает пополнение интермедиатов цитратного цикла в нервных клетках (Hassel, 2000).

Различия между выявленными изменениями в исследованных структурах мозга потомства крыс могут быть связаны с тем, что каждый этап пренатального развития характеризуется различной интенсивностью пролиферации, миграции, дифференцировки и интеграции нервных сетей и в зависимости от периода воздействия структуры мозга обладают разной чувствительностью к гипоксии. В результате нарушения морфогенеза впоследствии отмечаются нарушения в формировании структур головного мозга, которые затем проявляются на различных этапах постнатального развития (Граф, Гончаренко, Соколова, 2008).

Таким образом, полученные результаты показывают картину изменения активности ферментов глутаминазы и глутаматдегидрогеназы, метаболизирующих глутамат, который играет важную

физиологическую роль в структурах головного мозга, после перенесенной гипоксии в пренатальный период.

ВЫВОДЫ

1. У крыс, подвергнутых гипоксии в зародышевый период пренатального онтогенеза в 17-дневном возрасте обнаруживается повышение глутаминазной активности в ткани и митохондриях зрительной, лимбической, орбитальной коры и гипоталамуса. В одномесечном возрасте показано достоверное повышение активности энзима в гипоталамусе, лимбической, орбитальной и сенсомоторной коре. В трехмесячном возрасте также отмечается увеличение активности фермента, а в шестимесячном возрасте отмечается нормализация показателей глутаминазной активности в митохондриальных фракциях практически всех исследованных структур мозга, за исключением орбитальной коры и гипоталамуса.

2. Гипоксия в зародышевый период вызывает у 17-дневных крысят некоторое повышение активности ГДГ в митохондриях гипоталамуса, среднего и продолговатого мозга, у одномесечных крыс активность энзима повышается в митохондриях среднего и продолговатого мозга, а у трехмесячных животных снижается активность ГДГ в коре больших полушарий, среднем и продолговатом мозге и повышается в митохондриях мозжечка.

3. Воздействие гипоксии в период органогенеза пренатального онтогенеза вызывает заметное повышение активности глутаминазы в митохондриях зрительной, лимбической, орбитальной коры, гипоталамуса и среднего мозга 17-дневных крысят. В одномесечном возрасте сохраняется динамика повышения активности, в трехмесячном возрасте отмечается снижение в митохондриях зрительной коры и гипоталамуса, а в остальных структурах изменения незначительны. В шестимесячном возрасте отмечается достоверное снижение активности в митохондриях лимбической и зрительной коры, гипоталамуса и продолговатого мозга.

4. У животных, перенесших воздействие гипоксии в период органогенеза пренатального развития, в 17-дневном возрасте выявляется выраженный подъем активности ГДГ в коре больших полушарий, мозжечке, продолговатом и среднем мозге. В одномесечном периоде отмечается повышение активности энзима в среднем и продолговатом мозге, мозжечке, а в митохондриях

гипоталамуса и коры больших полушарий отмечается снижение до уровня контрольных величин. В трехмесячном периоде показано восстановление активности ГДГ практически во всех исследованных структурах мозга крыс.

5. После воздействия гипоксии в плодный период у 17-дневных крысят активность глутаминазы значительно повышается в митохондриях мозжечка, зрительной, орбитальной и лимбической коры, у одномесячных животных сохраняется повышенный уровень активности, у трехмесячных крыс наблюдается как повышение активности, так и снижение в митохондриях зрительной, сенсомоторной коры и гипоталамуса, у шестимесячного потомства наблюдается как снижение активности в мозжечке, зрительной и сенсомоторной коре, так и восстановление контрольных значений активности энзима.

6. В мозге 17-дневных крысят, подвергнутых гипоксии в плодный период отмечается повышение активности ГДГ в митохондриях мозжечка, коры больших полушарий, гипоталамуса, среднего и продолговатого мозга, сохраняющееся и у одномесячных крыс, а у крыс трехмесячного возраста наблюдается нормализация показателей активности энзима во всех структурах мозга, за исключением мозжечка, где сохраняется повышенный уровень активности.

Практические рекомендации. Полученные результаты по влиянию гипоксии, перенесенной на разных стадиях пренатального онтогенеза, на активность ферментов глутаматного метаболизма в мозге в постнатальном развитии могут быть применены в неврологии для разработки способов профилактики и коррекции метаболических нарушений, а именно, нейротрансмиссивного дисбаланса в ранние и поздние периоды постнатального онтогенеза организма.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Гадирова Л.Б., Агаев Т.М. Фосфатзависимая глутаминазная активность в мозге трех- и шестимесячных крыс после воздействия острой гипоксической гипоксии // Известия Национальной Академии Наук Азербайджана, серия биологических наук, 2007, т.62, № 5-6, с.103-109.

2. Гадирова Л.Б. Изменение активности фосфат-зависимой глутаминазы в мозге крыс под влиянием острой гипоксической гипоксии // İdman fiziologiyasının aktual problemləri üzrə Respublika elmi-praktik konfransının materialları, AzDBTİA, Bakı, 2008, s.18-20.

3. Гадирова Л.Б., Агаев Т.М. Влияние острой гипоксической гипоксии периода зародышевого эмбриогенеза на активность фосфатзависимой глутаминазы в мозге крыс в месячном возрасте // Вопросы физиологии и биохимии. Труды Института Физиологии НАНА и Общества физиологов Азербайджана, Баку, 2008, т. XXVI, с. 233-236.

4. Гадирова Л.Б. Изменение активности фосфат-зависимой глутаминазы в мозге трехмесячных крыс после влияния гипоксии в зародышевый период // Известия Национальной Академии Наук Азербайджана, биологические науки, 2009, т. 64, № 1-2, с. 121-123.

5. Гадирова Л.Б., Аббасова М.Т., Хаирова В.Р. Влияние гипоксии, перенесенной в пост- и пренатальный периоды онтогенеза, на активность некоторых ферментов обмена глутамата в мозге крыс // Известия Национальной Академии Наук Азербайджана, биологические науки, 2010, т. 65, №1-2, с. 100-104.

6. Гадирова Л.Б., Хаирова В.Р., Аббасова М.Т. Возрастная динамика изменения активности ферментов глутамат-глутаминового цикла в ткани различных структур мозга крыс, развившихся в условиях гипоксии // Вопросы физиологии и биохимии. Труды Института Физиологии НАНА и Общества физиологов Азербайджана, Баку, 2010, т. XXVIII, с. 159-164.

7. Гадирова Л.Б., Агаев Т.М. Постнатальные изменения глутаминазной активности в мозге крыс, перенесших гипоксию в плодном периоде пренатального развития // Вестник Тверского Государственного Университета. Серия биология и экология, Тверь, Россия, ISSN 1995-0160, 2010, вып. 18, с. 49-53.

8. Гадирова Л.Б., Агаев Т.М., Хаирова В.Р. Особенности изменения активности ферментов глутамат-глутаминового цикла в митохондриях мозга потомства крыс, перенесших гипоксию в период беременности // Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. С.-Петербург – Колтуши, Россия, 2010, с. 50.

9. Gadirova L.B., Khairova V.R., Agayev T.M. Role of hypoxia undergone in the fetal period of prenatal development in the changes inactivity of glutamate metabolism enzymes in rat brain in early postnatal ontogenesis // 7th International Interdisciplinary Congress: Neuroscience for Medicine and Psychology, Sudak, Ukraine, 2011, p. 122-123.

10. Гадирова Л.Б., Хаирова В.Р., Аббасова М.Т. Воздействие гипоксии в плодный период пренатального развития на динамику изменения активности ферментов обмена глутамата в головном мозге месячных крыс // Научно-практическая конференция с межд. участием «Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга». Ростов-на-Дону, Россия, 2011, с.60-61.

11. Агаев Т.М., Аббасова М.Т., Гадирова Л.Б. Роль трансминазной группы ферментов в обмене нейромедиаторных аминокислот в субклеточных фракциях структур головного мозга в постнатальном онтогенезе после перенесенной острой гипоксии в пренатальный период развития // Научные труды III Съезда Физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека». Москва - Ялта, 2011, с.65.

12. Qədirova L.B., Xairova V.R., Abbasova M.T. Hipoksiyaya məruz qalmış siçovulların beynində qlutaminsintetaza və qlutamatdehidrogenaza fermentlərinin fəallığı // Fiziologiya və biokimyanın məsələləri. AMEA Fiziologiya İnstitutunun və Azərbaycan Fizioloqlar Cəmiyyətinin elmi əsərlərinin külliyatı. Bakı, 2012, c.XXX, s.97-101.

13. Khairova V.R., Gadirova L.B. Effect of prenatal hypoxia on activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in rat brain // 2nd International Interdisciplinary Conference: Modern problems in systemic regulation of physiological functions, Bodrum, Turkey, 2012, p.179-180.

14. Хаирова В.Р., Гадирова Л.Б. Особенности возрастных изменений глутаматдегидрогеназы и глутаминсинтетазы в мозге пренатально гипоксированных крыс // Материалы VII Сибирского Съезда физиологов с международным участием, Красноярск, Россия, 2012, с. 562-563.

15. Гадирова Л.Б. Показатели глутаминазной активности в митохондриальных фракциях мозга крыс, подвергнутых гипоксии в плодном периоде пренатального онтогенеза // III Научная конференция молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология», НИИ Нормальной физиологии им.П.К. Анохина РАМН, Москва, Россия, 2012, с.8.

16. Agayev T.M., Gadirova L.B., Khairova V.R., Abbasova M.T. Effect of prenatal hypoxia on the enzymes of glutamate metabolism in one-month-old rat brain // Stress and Development: Neurophysiological and Neurochemical Aspects: International Scientific Conference dedicated to the 90th Anniversary of Azerbaijani National Leader Heydar Aliyev. Baku, 2013, p.7-8.

17. Gadirova L. Influence of prenatal hypoxia on the activity of glutaminase in the brain of 17-day-old rats // *New Challenges in the European Area: International Baku Forum of Young Scientists*, Baku, 2013, p.222-223.

18. Gadirova L.B., Khairova V.R., Abbasova M.T., Agayev T.M. Enzymes of glutamate metabolism in the brain of 17-day-old rats subjected to hypoxia in the fetal stage of prenatal ontogenesis // *Third National Congress of Georgian I.Beritashvili Society of Physiologists*, Tbilisi, 2013, p.154-155.

19. Гадирова Л.Б. Сравнительный анализ изменения глутаминовой активности в митохондриях различных структур мозга крыс после гипоксии, перенесенной на разных стадиях пренатального онтогенеза // *Gənc alimlərin III Respublika İnnovativ İdeya Yarmarkası*, Bakı, 2013, s.63-64.

20. Гадирова Л.Б., Хаирова В.Р., Аббасова М.Т. Ферменты глутаматного метаболизма в мозге одномесячных крысят, подвергнутых пренатальному стрессу в период органогенеза // *IV Научная конференция молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология»*, НИИ Нормальной физиологии им.П.К. Анохина РАМН, Москва, Россия, 2013, с.8-9.

21. Гадирова Л.Б. Активность фосфат-зависимой глутаминазы в ткани структур мозга 17-дневных крысят, перенесших гипоксию в плодный период пренатального онтогенеза // *Gənc alimlərin əsərləri*, Bakı, 2013, №8, s.164-167.

22. Гадирова Л.Б. Возрастные изменения глутаматдегидрогеназной и глутаминовой активности в различных структурах мозга крысят, подвергнутых гипоксии в ранний период пренатального онтогенеза // *II International Scientific Conference of Young Researchers Devoted to the 91th Anniversary of Azerbaijani National Leader Heydar Aliyev*, Qafqaz Universiteti, Baku, p.167-168.

23. Gadirova L.B., Agayev T.M. Glutamate dehydrogenase and glutaminase activity in the mitochondria of different brain structures of rats subjected to prenatal hypoxia in the fetal period // *10th International Interdisciplinary Congress: Neuroscience for Medicine and Psychology*, Sudak, Russia, 2014, p.110-111.

Xülasə

Postnatal ontogenezdə ağ siçovulların baş beyində fosfat-asılı qlutaminaza və qlutamatdehidrogenazanın fəallıqlarına prenatal hipoksiyanın təsiri

Leyla Bağdad qızı Qədirova

Tədqiqat işi prenatal inkişafın müxtəlif dövrlərində hipoksiyaya məruz qalmış 17-günlük, 1-, 3-, və 6-aylıq siçovulların baş beyin böyük yarımkürələri qabığının, beyinciyin, hipotalamusun, orta və uzunsov beyin toxuma və mitoxondri fraksiyalarında fosfat-asılı qlutaminaza və qlutamatdehidrogenaza fermentlərinin fəallığının öyrənilməsinə həsr edilmişdir.

Tədqiqatda prenatal hipoksiyanı keçirmiş siçovullarda qlutaminaza və qlutamatdehidrogenaza fermentlərinin fəallığının dəyişikliyi müxtəlif beyin strukturlarında seçilən və yaşdan asılı dinamikaya malik olduğu aşkar edilmişdi. Müəyyən edilmişdi ki, prenatal hipoksiyaya məruz qalmış on yeddi günlük nəsilə beyin strukturlarının toxuma və mitoxondri fraksiyalarında qlutaminazanın fəallığı əhəmiyyətli dərəcədə artır və bu qlutamatın eksaytotoksik təsirinə gətirib çıxara bilər. Bu halda qlutamatdehidrogenazanın fəallığı bir qədər az dərəcədə artır. Biraylıq heyvanlarda da tədqiq edilən fermentlərin fəallığının artımı qeyd edilir, üç və altı aylıq siçovullarda isə bəzi tədqiq edilən beyin strukturlarında fermentlərin fəallığının azalmasının tendensiyası müşahidə olunur.

Beləliklə, beyin müxtəlif strukturlarında qlutaminazanın fəallığının dəyişikliyi beyin həm qlutamat- həm də QAYT-ergik sistemlərin aktivləşməsi ilə bağlı ola bilər, qlutamatdehidrogenazanın fəallığının dəyişikliyi sinir hüceyrələrində sitrat tsiklində intermediatlar ilə bağlıdır və beyin qoruyucu-uyğunlaşma reaksiyası kimi qiymətləndirmək olar.

Summary

The impact of prenatal hypoxia on the activity of phosphate-dependent glutaminase and glutamate dehydrogenase in the rat brain in postnatal ontogenesis

Leyla Baghdad gyzy Gadirova

The effect of hypoxia at different periods of prenatal development on the activity of the phosphate-dependent glutaminase and glutamate dehydrogenase in the tissues and mitochondrial fractions of the cerebral cortex, cerebellum, hypothalamus, midbrain and medulla oblongata of the 17-day-old, 1, 3, and 6-month-old rat was studied.

It was found that the alterations of glutaminase and glutamate dehydrogenase activities had age-related dynamics and varied in different brain structures of the rat offspring undergone to prenatal hypoxia.

A significant increase of glutaminase activity that could lead to glutamate excitotoxicity in the tissues and mitochondrial fractions of the brain structures was revealed in 17-day-old offspring subjected to prenatal hypoxia. The activity of glutamate dehydrogenase also increased, but in a lesser degree. In a one-month-old rat also it was noted an increased activity of studied enzymes and a tendency to reduction of the enzymes activity in some studied brain regions of three- and six-months-old rat.

So, the changes in the activity of glutaminase in different brain structures, may be due to the activation of both glutamate- and GABA-ergic systems, and changes in the activity of glutamate dehydrogenase could be associated with the supply of intermediates in the citrate cycle in nerve cells and could be a protective and adaptive response of the brain.

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
A.İ.QARAYEV adına FİZİOLOGİYA İNSTİTUTU

Əlyazması hüququnda

LEYLA BAĞDAD QIZI QƏDİROVA

**POSTNATAL ONTOGENEZZDƏ AĞ
SİÇOVULLARIN
BAŞ BEYNİNDƏ FOSFAT-ASILI QLUTAMİNAZA
VƏ QLUTAMATDEHİDROGENAZANIN
FƏALLIQLARINA PRENATAL HİPOKSİYANIN
TƏSİRİ**

2411.01 – İnsan və heyvan fiziologiyası

**Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi
almaq üçün təqdim olunmuş dissertasiyanın**

A V T O R E F E R A T I

BAKI – 2015