



Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

## ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛАМИН-О-СУЛЬФАТА НА СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ОРГАНАХ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Н.Х. ХАЧАТРЯН, А.Г. ВАРДАНЯН, С.Г. ТАРОЯН,  
Р.С. ХАЧАТРЯН, Р.Г. КАМАЛЯН

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

Показано, что интраперитонеальное введение крысам этаноламин-О-сульфата (ЭОС) в дозе 500 мг/кг в течение 3-х дней предотвращает гипергликемический эффект вводимого на 4-й день аллоксана (150 мг/кг). Введение ЭОС сопровождается повышением концентрации ГАМК в мозге и панкреасе. Аллоксан вызывает повышение уровня глутамина и глутамата в панкреасе. Эффект аллоксана предупреждается предварительной инъекцией ЭОС. Полученные данные свидетельствуют о важной роли ГАМК в патогенезе диабета I типа и возможной эффективности ГАМК генерирующих соединений в терапии этой патологии.

*Диабет – аллоксан – этаноламин-О-сульфат – ГАМК*

Էթանոլամին-Օ-սուլֆատի (3 օր, 500 մգ/կգ) ամենտներին ներորովայնային ներարկումը կանխում է 4-րդ օրը ներարկված ալոքսանի (150 մգ/կգ) հիպերգլիկեմիկ ազդեցությունը: Էթանոլամին-Օ-սուլֆատի ներարկումն ամենտներին ուղեկցվում է նրանց ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում ԳԱԿԹ-ի կոնցենտրացիայի բարձրացմամբ: Ալոքսանը բարձրացնում է գլյուտամինի և գլյուտամինաթթվի պարունակությունը ենթաստամոքսային գեղձում: Ալոքսանի այդ ազդեցությունը կանխվում է էթանոլամին-Օ-սուլֆատի նախապես ներարկմամբ: Ստացված տվյալները վկայում են ԳԱԿԹ-ի կարևոր դերի մասին I տիպի դիաբետի պաթոգենեզում:

*Դիաբետ – ալոքսան – էթանոլամին – Օ – սուլֆատ – ԳԱԿԹ*

It was shown that preliminary (during 3 days) intraperitoneal GABA-T inhibitor ethanolamin-O-sulphate (EOS) injection to rat in dose 500 mg/kg prevents hyperglycemic action of alloxane that was injected on the 4<sup>th</sup> day in dose 150 mg/kg. EOS injection accompanied increase of GABA concentration in pancreas and brain. Alloxan increases the level of glutamine and glutamate in pancreas. This effect of alloxane prevents by EOS preliminary injection. The data obtained testify to important role of GABA in pathogenesis of type I diabetes mellitus.

*Diabet – alloxan – ethanolwmine – O – sulphate*

Ряд работ свидетельствуют о значении ГАМК в функциях поджелудочной железы [5, 11, 12, 16]. Подчеркивается роль этого тормозного трансммиттера как в эндокринной, так и экзокринной функциях, по-видимому, тесно взаимосвязанных [4, 8, 9, 19]. Особое значение приписывается роли ГАМК в функциях продуцирующих инсулин  $\beta$ -клеток [4, 19]. Показано наличие сравнимых с мозгом концентраций ГАМК в панкреасе, сосредоточенных в основном в  $\beta$ -клетках, как в везику-

лах нервных окончаний, так и в инсулярных гранулах [5, 19], причем в  $\beta$ -клетках человека она оказывает возбуждающее действие [7]. Выяснено, что ГАМК способствует как синтезу, так и высвобождению инсулина. Естественно, возник вопрос о возможной эффективности этой аминокислоты при диабете, тем более что продуцирующий ее фермент, ГАМК-декарбоксилаза, является одной из мишеней аутоиммунного процесса, приводящего к гибели островковых  $\beta$ -клеток [6, 13], т.е. к развитию диабета первого типа (Т1Д). Определение активности антител к ферменту используется в доклинической диагностике Т1Д [6, 13]. В ряде работ придерживаются мнения, что идеальной иммунотерапией Т1Д является уменьшение провоспалительных аутоиммунных ответов, усиление регуляторных ответов, повышение выживаемости и репликации  $\beta$ -клеток [15, 17, 18, 21]. ГАМК вполне обоснованно рассматривается в качестве эффективного претендента на эту роль [22]. Введение ГАМК НОД мышам может подавлять воспалительные и усиливать регуляторные Т-клеточные ответы, способствовать репликации  $\beta$ -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  $\beta$ -клеток и длительным поддержанием нормогликемии. В прежней нашей работе мы исследовали сочетанное влияние генерирующих ГАМК факторов, глутамин и этаноламин-О-сульфата (ЭОС) на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс в норме и при стрептозотоциновом экспериментальном диабете [2]. Поскольку в опытах *in vitro* на культуре  $\beta$ -клеток панкреаса в наших опытах наиболее выраженную флюоресценцию инсулина вызывало добавление ЭОС, в настоящей работе мы использовали его в качестве возможного антидиабетогенного агента на аллоксановой модели крыс.

**Материал и методика.** 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: 1-я контрольная получала внутривентриально 0.5 мл физиологического раствора, 2-я – 150 мг/кг аллоксана, 3 – аллоксан на фоне трехдневного введения 500 мг/кг ЭОС. Через 3 дня животных забивали под легким эфирным наркозом, удаляли панкреас, мозг и печень, в которых определяли аминокислоты семейства глутамин. Экстракцию аминокислот осуществляли 6 %-ным  $\text{HClO}_4$ . Разделение аминокислот в перхлоратных экстрактах осуществляли методом высоковольтного электрофореза в пиридин-ацетатном буфере, pH 3.9, аминокислоты определяли нингидриновым методом по калибровочным графикам, построенным с использованием стандартных аминокислот фирмы Sigma Chemical Company (USA) [1]. Глутамин определяли в электрофоретической фракции нейтральных аминокислот по амидному азоту с использованием микродиффузионного метода [3]. Глюкозу крови определяли с помощью глюкометра Ассу-Chek (Германия).

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 представлены данные определения нейроактивных аминокислот в поджелудочной железе интактных и подвергнутых действию диабетогена крыс. Как видно из табл. 1, у интактных крыс в панкреасе имеются почти одинаковые концентрации аспартата и ГАМК (1.7 и 1.5 мкмоль/г), глутамата и глутамин (4.1 и 3.8 мкмоль/г). Внутривентриальное введение аллоксана (150 мг/кг) интактным крысам вызывает достоверное повышение концентрации дикарбоновых аминокислот и глутамин, не оказывая существенного влияния на уровень ГАМК. Введение же аллоксана на фоне предварительной трехдневной инъекции ЭОС (0.5 г/кг) восстанавливает первоначальную концентрацию глутамата и глутамин, но одновременно резко повышает содержание ГАМК в панкреасе, что объясняется ингибированием ГАМК-Т [10].

При сравнении данных табл. 1 с ранее нами полученными результатами аналогичных опытов со стрептозотоцином выявляются определенные различия и сходство в действии двух диабетогенов. Стрептозотозин, в отличие от аллоксана, понижает концентрацию глутамата и глутамина, а также ГАМК, тогда как последний повышает содержание первых, не влияя на содержание ГАМК. Это соответствует различным механизмам цитотоксического действия этих диабетогенов [14, 20].

**Таблица 1.** Влияние предварительного внутрибрюшинного введения этаноламин-О-сульфата на содержание аминокислот в панкреасе подвергнутых аллоксановой интоксикации крыс

Аминокислоты	АК	ГК	ГН	ГАМК
Контроль	1.7±0.4	4.1±0.8	3.8±0.3	1.5±0.3
Аллоксан	2.6±0.4*	6.2±0.6*	6.9±0.6*	1.2±0.2
ЭОС+аллоксан	3.1±0.7	3.6±0.3	3.9±0.8	3.4±0.8*

*Содержание аминокислот в таблицах дано в мкмоль/г свежей ткани. n=5*

Аллоксан подавляет глюкокиназу и, по-видимому, вызывает компенсаторную мобилизацию альтернативных аминокислотных энергетических субстратов, таких как дикарбоновые аминокислоты и их амиды.

Введение аллоксана на фоне ингибитора ГАМК-Т ЭОС не влияет на содержание глутамина и глутамата, которые, скорее всего, генерируют ГАМК. Уровень последнего по сравнению как с интактными, так и с аллоксановыми крысами повышается в 2.3-2.8 раза. Такой эффект ЭОС говорит о возможном его антидиабетогенном действии, поскольку подобное приписывается ГАМК [22].

**Таблица 2.** Влияние предварительного внутрибрюшинного введения этаноламин-О-сульфата на содержание аминокислот в мозге подвергнутых аллоксановой интоксикации крыс

Аминокислоты	АК	ГК	ГН	ГАМК
Контроль	2.0±0.2	3.9±0.8	3.2±0.6	1.6±0.4
Аллоксан	2.2±0.2	4.4±0.5	3.3±0.4	1.6±0.3
ЭОС+аллоксан	2.0±0.3	4.1±0.6	3.3±0.7	3.2±0.5*

В мозге (табл. 2) достоверных изменений в концентрации исследованных аминокислот при внутрибрюшинном введении аллоксана не отмечается. Введение аллоксана на фоне трехдневного введения ЭОС также не вызывает существенных изменений уровня исследованных аминокислот, за исключением ГАМК, концентрация которой также как и в панкреасе возрастает вдвое.

**Таблица 3.** Влияние предварительного внутрибрюшинного введения этаноламин-О-сульфата на содержание аминокислот в печени подвергнутых аллоксановой интоксикации крыс

Аминокислоты	АК	ГК	ГН	ГАМК?
Контроль	1.7±0.2	1.5±0.1	2.3±0.4	0.95±0.11 0.35
Аллоксан	1.5±0.1	1.6±0.2	2.0 ±0.3	0.83±0.18 0.24
ЭОС+аллоксан	1.8±0.2	1.5±0.2	2.5±0.5	0.95±0.22 0.55

В печени существенных сдвигов в содержании исследуемых аминокислот, в отличие от опытов со стрептозотоцином [2], не наблюдается (табл. 3). Отмечается

лишь тенденция понижения уровня ГАМК в группе с введением аллоксана и повышение в группе животных с предварительным введением ЭОС.

Определение глюкозы сыворотки крови в группах выявило следующую картину. Уровень глюкозы крови интактных крыс составляет  $6.5 \pm 0.2$  ммоль/л (табл. 4). Введение аллоксана контрольным крысам вызывает резкую гипергликемию ( $24.9 \pm 3.1$  ммоль/л). Предварительное внутрибрюшинное введение крысам ЭОС в дозе 0.5 г/кг живой массы сводит на нет гипергликемический эффект аллоксана.

**Таблица 4.** Влияние предварительного внутрибрюшинного введения этаноламин-О-сульфата на содержание глюкозы в сыворотке крови подвергнутых аллоксановой интоксикации крыс

Контроль	$6.5 \pm 0.2$
Аллоксан	$24.9 \pm 3.1^*$
ЭОС+аллоксан	$6.9 \pm 0.8^{**}$

Необходимо отметить, что при экспериментальном стрептозотоциновом диабете противогликемический эффект совместного введения ЭОС и глутамина был выражен значительно слабее, что, по-видимому, связано с различными механизмами цитотоксического действия диабетогенов. Поскольку аллоксан в отличие от стрептозотина ингибирует глюкокиназу панкреаса, возможно, действие ЭОС связано с защитой SH-групп фермента путем конкурентного связывания с ними. Вместе с тем, повышая уровень ГАМК в органах ЭОС, по-видимому, подавляет противовоспалительный компонент аутоиммунной реакции на диабетоген и усиливает противовоспалительные Т-регуляторные клеточные ответы. Показано, что сочетанное введение NOD мышам мобилизованного на квасцах проинсулина в качестве аутоантигена и ГАМК как противовоспалительного агента ослабляет спонтанного характера Т-хелперные клеточные ответы на аутоантигены, антиген-индуцируемые IL-4 и гуморальные ответы, а также инсулин и усиливает IL-10 и Т-клеточные регуляторные ответы и репликацию островковых  $\beta$ -клеток [22]. Возможно, ЭОС действует не только через ГАМК, но и самостоятельно подавляет аутоиммунный ответ на диабетоген.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Камалян Р.Г., Мовсесян С.Г. *Вопр. биохимии мозга*. Изд.АН Арм ССР, 2, с. 40-48, 1966.
2. Камалян Р. Г., Арутюнян А.А., Хачатрян Н.Х., Варданян А. Г., Тароян С.К. Влияние ГАМК-генерирующих факторов на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. *Мед. наука Армении, LV*, 4, 32-42, 2015.
3. Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых ТХУ экстрактах. *Вопр.мед.химии*, 5, с. 538-542, 1962.
4. Adegate 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. Atkinson M.A., Maclaren.N.K., Sharp D.W., Lacy P.E., Riley W.J. 64000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 335, p. 1357-1360, 1990.
6. Baekkeskov S., Anastoot H. J., Christgus S., Reetz A., Solimena M., Cascalho M., Folli F., Olesen H., Camilli P.D. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347, p. 151-156. 1990.
7. Braun M et al. GABA is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*, 59, 1694-1701, 2010.
8. 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.
9. *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.
  10. *Fowler L.J.* Analysis of the major amino acids of rat brain after in vivo inhibition of GABA-T by ethanolamine-O-sulphate. *J. Neurochem.*, 2, p. 437-442, 1973.
  11. *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  $\beta$ -cell. *J. Histochem. Cytochem.* 35, p. 831-836, 1987.
  12. *Garry D.J., Sorenson R.L., Elde R.P., Maley B.E., Madsen A.* Immunohistochemical co-localization of GABA and insulin in beta cells of rat islet. *Diabetes*, 35, p. 1090-1095, 1986.
  13. *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.
  14. *Lenzen S., Tiedge M., Panten U.* Glucocinase in pancreatic  $\beta$ -cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinologica (Copenh.)*, 115, 21-29, 1987.
  15. *Matthews J.B., Staeva T.P., Bernstein P.L., Peakman M., von Herrath M. D.* Developing combination immunotherapies for type I diabetes recommendations from the ITN-JDRF Type 1 Diabetes Combination Therapy Assessment Group. *Clin. Exp. Immunol.* 160, 176-184, 2010.
  16. *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.
  17. *Peakman M., von Herrath M.* Antigen-specific immunotherapy for type 1 diabetes: maximizing the potential. *Diabetes*, 59, 2087-2093, 2010.
  18. *Staeva T.P., Chatenoud L., Insel R., Atkinson M.A.* Recent lessons learned from prevention and recent-onset type 1 diabetes immunotherapy trials. *Diabetes*. 62, 9-17, 2013.
  19. *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.
  20. *Szkudelski T.* The mechanism of alloxan and streptozotocine action in  $\beta$ -cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537-546, 2001.
  21. *Tian J., Kaufman D.L.* Antigen-based therapy for the treatment of type 1 diabetes. *Diabetes*. 58, 1939-1946, 2009.
  22. *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  $\beta$ -cell replication in newly diabetic NOD mice. *Diabetes*, 63, 9, 3128-3134, 2014.

Поступила 06.10.2016