

**ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕЗУ СЕРОТОНІНУ В МОЗКУ ЩУРІВ
ІЗ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2-ГО ТИПУ**

Досліджено особливості функціонування шляху біосинтезу серотоніну в мозку щурів за умов експериментального цукрового діабету 2-го типу. В ході досліджень встановлено зниження вмісту триптофану та серотоніну, зростання триптофан-гідроксилазної та моноаміноксигеназної активності в головному мозку тварин. Отримані результати свідчать про залучення шляху біосинтезу серотоніну в розвиток стрептозотоциніндукованого цукрового діабету 2-го типу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: серотонін, триптофан, триптофан-гідроксилаза, моноаміноксидаза, цукровий діабет 2-го типу.

ВСТУП. Серед великої кількості хворих на цукровий діабет (ЦД), захворюваність на який можна порівняти з неінфекційною епідемією, 85–90 % становлять пацієнти з ЦД 2-го типу [2, 7]. Останні десятиріччя були відзначені великими досягненнями у розумінні природи інсулінонезалежного діабету, його діагностики та лікування. Однак не всі сторони патогенезу даного захворювання достатньо вивчено, й доказом цього є неухильне зростання захворюваності, високі смертність і частота ускладнень.

Особливості організації серотонінергічної системи мозку зумовлюють її участь у регуляції багатьох функцій організму і складних форм поведінки. При цьому велику роль відіграє серотонінергічний контроль нейроендокринних регуляцій серцево-судинної системи, водно-сольового обміну, репродукції, циркадних ритмів опосередковано через гіпоталамус і гіпофіз [10, 11]. Серотонінергічна система мозку впливає на збудливість вазомоторних та терморегулюючих центрів, бере участь у регуляції активності ЦНС, загальної рухової активності, емоційної поведінки і т. д.

Порушення в серотонінергічній системі призводять до розвитку різних патологічних станів організму, в тому числі психічних розладів, таких, як маніакально-депресивний психоз, шизофренія, депресія і тривожні стани. На фоні депресії часто збільшується споживання їжі, що може супроводжуватися ожирінням – однією з причин розвитку ЦД 2-го типу. Зва-

© К. Р. Середницька, В. В. Конопельнюк, О. М. Савчук, 2013.

жаючи на це, можна припустити залучення серотонінергічної системи в патогенез цього захворювання. Відомо, що серотонін бере участь у діяльності центральної нервової системи, залучений в енергетичний обмін та підвищує рівень глюкози [12, 13]. Особливий інтерес викликає аналіз шляху синтезу серотоніну в головному мозку щурів за умов розвитку експериментального ЦД 2-го типу, оскільки одним з основних порушень при даному патологічному стані є збільшення вмісту глюкози в крові хворих.

Метою роботи було дослідити метаболіти та ферменти шляху біосинтезу серотоніну в головному мозку щурів із стрептозотоциніндукованим ЦД 2-го типу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей. Експериментальний ЦД 2-го типу викликали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення 1–2-добовим щурят розчину стрептозотоцину з розрахунку 80 мг на 1 кг маси тіла тварини [10]. Піддослідних тварин утримували на стандартному раціоні віварію. В експериментах використовували дорослих щурів масою 230–250 г. Розвиток діабету підтверджували на основі неодноразового виявлення гіперглікемії натще і за зміною показників вуглеводного та ліпідного обмінів [1]. До контрольної групи входили інтактні щури таких же маси, статі, віку.

Вміст серотоніну і триптофану визначали, використовуючи іонообмінну хроматографію

[4], вміст серотоніну – спектрофлуориметричним методом [12], вміст триптофану – за методом [15], триптофан-гідроксилазу (КФ 1.14.16.4) активність – згідно з методом [6], вміст 5-гідрокситриптофану – за рекомендаціями [3], триптофан-декарбоксилазу (КФ 4.1.1.28) активність – спектрофлуориметричним методом [14], моноаміноксидазу (КФ 1.4.3.4) активність у мозку – методом [8]. РНК отримували за допомогою набору реагентів “Проба НК” (“ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ”, Росія). Одержували кДНК та проводили полімеразну ланцюгову реакцію згідно з [5]. Послідовності праймерів, які використовували при проведенні полімеразної ланцюгової реакції: 5'-cga cat caa ccg aga aca gct g-3' (ТрГ – прямий), 5'-gta gtt cat agc sag ctc tgc g-3' (ТрГ – зворотний), 5'-tgg ctg ctg cca aac tgt tgt ctg-3' (МАО – прямий), 5'-gaa tgc acc acg gaa tgg gta agt-3' (МАО – зворотний), 5'-tgg aca ttg ttg cca tca acg acc-3' (ГАФДГ – прямий), 5'-cat ttg atg tta gcg gga tct cgc-3' (ГАФДГ – зворотний). Вміст білка визначали за методом [9].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми “MS Excel XP”.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З огляду на дані про мультифакторність патогенезу ЦД 2-го типу, без сумніву, є актуальним дослідження різних експериментальних моделей інсулінової недостатності, які б на патогенетичному рівні відповідали розвитку цього захворювання в людини і могли б бути основою для пошуку нових перспективних протидіабетичних засобів, шляхів корекції різноманітних ускладнень, які виникають за умов ЦД 2-го типу. Класичною експериментальною моделлю з відтворення різних гіперглікемічних станів є стрептозотоциніндукована модель.

Для підтвердження розвитку ЦД 2-го типу через 180 діб після введення стрептозоточину визначали вміст глюкози в крові щурів з мо-

деллю ЦД 2-го типу та у групі контрольних тварин. У ході досліджень ми показали, що у піддослідних тварин розвиток експериментального ЦД 2-го типу супроводжувався появою гіперглікемії натще, змінами ліпідного обміну та показників чутливості тканин до інсуліну [1].

На наступному етапі роботи було досліджено метаболіти та ферменти шляху біосинтезу серотоніну за умов розвитку ЦД 2-го типу.

Попередником для синтезу серотоніну є широко розповсюджена в природі незамінна амінокислота – триптофан. Порушення його обміну в людини може сигналізувати про ряд захворювань, таких, як туберкульоз, рак, цукровий діабет тощо. Тому певний інтерес викликає визначення вмісту даного метаболіту в мозку як першої ланки біосинтетичного шляху.

В ході досліджень встановлено зниження на 33 % вмісту триптофану в мозку щурів з експериментальним ЦД 2-го типу порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 1, А). Причинами зменшення вмісту триптофану можуть бути зниження швидкості його надходження в клітини-мішені, активація альтернативних шляхів метаболізму або підвищення потреб клітини у біосинтезі серотоніну, конкуренція триптофану з іншими метаболітами за шляхи проходження гематоенцефалічного бар'єру.

Встановлено підвищення на 31 % вмісту безпосереднього попередника біосинтезу серотоніну – 5-гідрокситриптофану в головному мозку щурів із стрептозотоциніндукованою моделлю ЦД 2-го типу порівняно зі значеннями контрольної групи тварин, що може бути зумовлено зростанням активності ферменту триптофан-гідроксилази (рис. 1, Б).

Особливості організації серотонінергічної системи мозку та її широкі зв'язки з іншими відділами мозку зумовлюють участь цієї системи в регуляції багатьох функцій організму. У зв'язку з цим, особливу увагу звернуто на визначення вмісту серотоніну в головному мозку

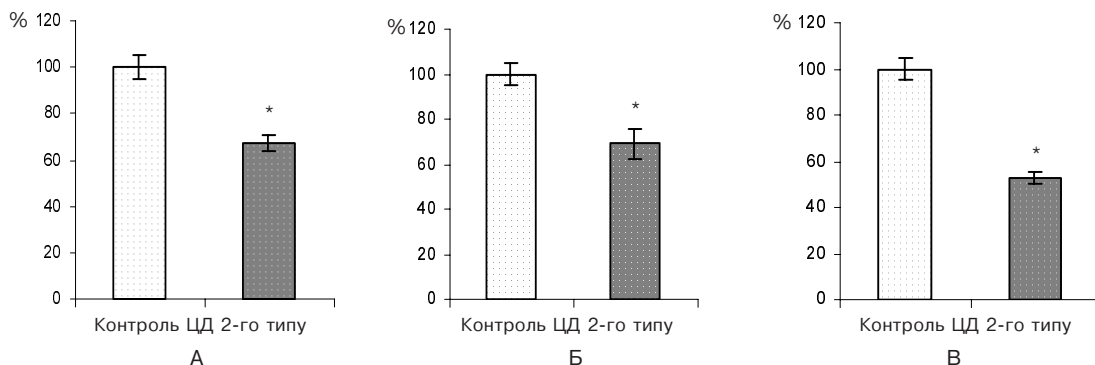


Рис. 1. Вміст триптофану (А), 5-гідрокситриптофану (Б) та серотоніну (В) в головному мозку щурів за умов розвитку стрептозотоциніндукованого цукрового діабету 2-го типу (* – $p < 0,05$ порівняно з контролем).

щурів за умов розвитку ЦД 2-го типу. Проведені дослідження свідчать про зниження на 53 % вмісту серотоніну в головному мозку діабетичних щурів порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 1, В).

Зниження вмісту серотоніну в головному мозку щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом 2-го типу може бути пов'язане зі зменшенням запасів серотоніну при даній патології; послабленням синтезу за умов порушення метаболічних процесів, які спрямовані на підтримання фізіологічного рівня серотоніну в організмі; посиленням використання серотоніну в шляхах його катаболізму; порушенням функцій регуляторних структур головного мозку.

В ході досліджень встановлено підвищення активності швидкістьлімітуючого ферменту – триптофан-гідроксилази на 30 %, не виявлено змін триптофан-декарбоксілазної активності. Оскільки триптофан-декарбоксілазна активність не зазнає змін, а вміст серотоніну знижується у головному мозку щурів із ЦД 2-го типу порівняно з показниками контрольної групи, можна припустити, що посилюється деградація даного метаболіту. Цей процес забезпечується ферментом моноаміноксидазою. В результаті досліджень встановлено підвищення на 70 % моноаміноксидазної активності в головному мозку щурів за умов експеримен-

тального ЦД 2-го типу порівняно з показниками контрольної групи (рис. 2, В).

Досліджено рівень експресії гена ключового ферменту шляху біосинтезу серотоніну – триптофан-гідроксилази (ТрГ) у мозку щурів. Як видно з графіка, наведеного на рисунку 3, що відображає співвідношення між кількістю кДНК гена ТрГ і кДНК ГАФДГ, рівень експресії гена ТрГ у мозку щурів за умов експериментального ЦД 2-го типу знижувався на 36 % порівняно з контролем. Незважаючи на зменшення рівня гена ТрГ у мозку за умов ЦД 2-го типу, ми фіксували підвищення активності триптофан-гідроксилази. Моноаміноксидаза забезпечує катаболізм серотоніну шляхом окиснювального дезамінування. Показано, що за умов розвитку моделі ЦД 2-го типу в мозку щурів показник співвідношення кДНК генів MAO/ГАФДГ залишався в межах показника контрольного стану, що може вказувати на однаковий рівень експресії гена MAO у контролі та при даному патологічному стані (рис. 3, А).

ВИСНОВКИ. Встановлено зміни показників серотонінового шляху метаболізму триптофану в головному мозку щурів за умов експериментального ЦД 2-го типу. Це вказує на можливість залучення цієї нейротрансмітерної системи у патогенез розвитку даної патології.

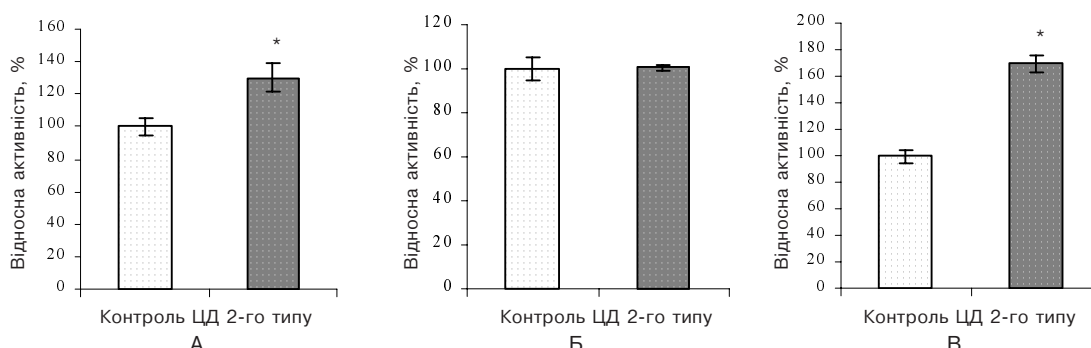


Рис. 2. Відносна триптофан-гідроксилазна (А), триптофан-декарбоксілазна (Б), моноаміноксидазна (В) активність у головному мозку щурів за умов розвитку стрептозотоциніндукованого цукрового діабету 2-го типу (* – $p < 0,05$ порівняно з контролем).

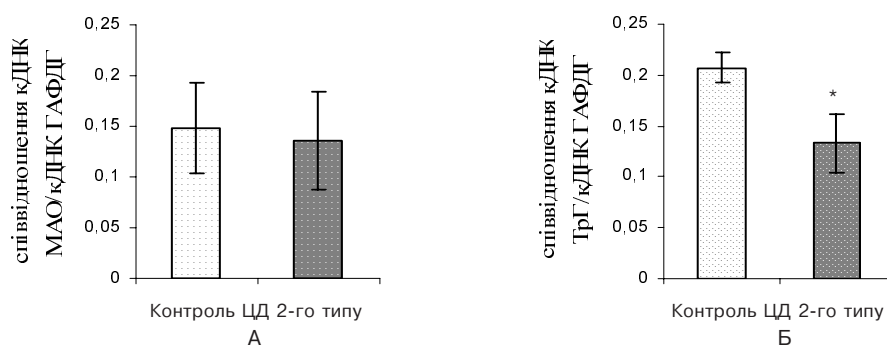


Рис. 3. Рівень кДНК гена MAO (А) та ТрГ (Б) у перерахунку на рівень кДНК гена ГАФДГ у мозку в групі контрольних тварин та за умов експериментального ЦД 2-го типу (* – $p < 0,05$ порівняно з контролем).

Таким чином, отримані нами дані свідчать про суттєве зниження вмісту серотоніну в центральній нервовій системі тварин із стрептозотоциніндукованою моделлю ЦД 2-го типу, можливий взаємозв'язок між серотонінергічною системою та енергетичним обміном в

організмі. Це вказує на необхідність проведення подальших ґрунтовних досліджень процесів, які лежать в основі функціонування серотонінергічної системи за умов ЦД 2-го типу, для встановлення причинно-наслідкових зв'язків розвитку цього патологічного стану.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Відтворення експериментальної стрептозотоцин-індукованої моделі цукрового діабету 2 типу у щурів / Т. І. Галенова, В. В. Конопельнюк, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко // Фізика живого. – 2010. – № 2. – С. 23–26.
2. Иззати-Заде К. Ф. Нарушение обмена серотонина в патогенезе заболеваний нервной системы / К. Ф. Иззати-Заде, А. В. Баша, Н. Д. Демчук // Журн. неврол. и психиат. – 2004. – № 9. – С. 62–70.
3. Калниня И. Э. Флуориметрическое определение 5-гидрокситриптофана в крови / И. Э. Калниня, Р. К. Блума // Медицина. – 1991. – № 1. – С. 29–39.
4. Максименко Е. Г. Уровень триптофана и серотонина в условиях судорожной активности головного мозга / Е. Г. Максименко, В. Н. Савченко // Вісник Харківського нац. університету ім. В. Н. Каразіна. Медицина. – 2000. – 1, № 494. – С. 40–43.
5. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук ; пер. с англ. под ред. А. А. Баева, К. Г. Скрябина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
6. Activation of brain tryptophan hydroxylase by ATP-Mg²⁺: Dependence on calmodulin / D. M. Kuhn, P. O'Callaghan, J. Juskevich, W. Lovenberg // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1980. – 77 (8). – P. 4688–4691.
7. Adeghate E. Distribution of serotonin and its effect on insulin and glucagon secretion in normal and diabetic pancreatic tissues in rat / E. Adeghate // Neuroendocrinol. Lett. – 1999. – P. 315–322.
8. Ali B. H. Inhibition of monoamine oxidase by furazolidone in the chicken and the influence of the alimentary flora thereon / B. H. Ali, A. L. Bartlett // Br. J. Pharmac. – 1980. – 71. – P. 219–224.
9. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – 72, Issues 1–2. – P. 248–254.
10. Hemmings S. J. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors / S. J. Hemmings, D. Spafford // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2000. – 32. – P. 905–919.
11. Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurons in rat fetuses / T. Pronina, M. Ugrumov, E. Adamskaya [et al.] // J. Neuroendocrin. – 2003. – 15. – P. 549–558.
12. Kang Y. M. Serotonin modulates hypothalamic neuronal activity / Y. M. Kang // Int. J. Neurosci. – 2004. – 114, № 3. – P. 299–319.
13. Lam D. D. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes / D. D. Lam, L. L. Heisler // Cambridge University Press. – 2007. – 9. – P. 5.
14. Sangwan R. Direct fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay of L-tryptophan decarboxylase from Catharanthus roseus leaf / R. Sangwan, S. Mishra, S. Kumar // Analytical biochemistry. – 1998. – 255, № 1. – P. 39–46.
15. Tryptophan metabolism in central nervous system: medical implication / J. Ruddick, A. Evans, D. Nutt [et al.] // Cambridge University Press. – 2006. – 8.

Е. Р. Середницькая, В. В. Конопельнюк, А. Н. Савчук
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА СЕРОТОНИНА В МОЗГЕ КРЫС С СТРЕПТОЗОЦИНИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Резюме

Исследованы особенности функционирования пути биосинтеза серотонина в мозге крыс в условиях экспериментального сахарного диабета 2-го типа. В ходе исследований установлено снижение содержания

триптофана и серотонина, рост триптофан-гидроксилазной и моноаминоксигеназной активности в головном мозге крыс. Полученные результаты свидетельствуют о привлечении пути биосинтеза серотонина в развитие стрептозоточининдуцированного сахарного диабета 2-го типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: серотонин, триптофан, триптофан-гидроксилаза, моноаминоксидаза, сахарный диабет 2-го типа.

K. R. Serednytska, V. V. Konopelniuk, O. M. Savchuk
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

PECULIARITIES OF SEROTONIN SYNTHESIS IN THE BRAIN OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Summary

The peculiarities of biosynthesis of serotonin in the brain of rats with experimental model of type 2 diabetes mellitus were studied. Conducted experiments indicate that the content of tryptophan and serotonin decreases, and activity of tryptophan-hydroxylase and monoamineoxydase increases in rat's brain. The results show that biosynthesis of serotonin is involved into pathogenesis of streptozotocin-induced 2 type diabetes mellitus.

KEY WORDS: serotonin, tryptophan, tryptophan-hydroxylase, monoamineoxydase, 2 type diabetes mellitus.

Отримано 03.12.12

Адреса для листування: К. Р. Середницька, вул. Васильківська, 94, Київ, Україна, e-mail: kateserednytska@gmail.com.