

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 19, №2

2020



УДК 616.441.577.112

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2020:2.3

ВЛИЯНИЕ L-NAME НА ФОНД АМИНОКИСЛОТ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**© Разводовский Ю.Е.¹, Смирнов В.Ю.², Дорошенко Е.М.², Короткевич Т.В.³
Переверзев В.А.⁴, Максимович Н.Е.², Семененя И.Н.¹**¹Государственное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси» 230009, Республика Беларусь, Гродно, ул. Бульвар ленинского комсомола, 50²УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, 230009, ул. Горького, 80³Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Республика Беларусь Минск, Долгиновский тракт, 152⁴Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, 83*Резюме*

Цель. Характеристика изменений пула свободных аминокислот и биогенных аминов в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) на фоне введения N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME).

Методика. Эксперимент выполнен на 18 белых беспородных крысах-самках. СИГМ моделировали у 12 крыс путём перевязки обеих общих сонных артерий в течение одного часа. L-NAME вводили 6 животным внутривенно в дозе 5 мг/кг непосредственно перед перевязкой сонных артерий. Содержание аминокислот и их дериватов в хлорнокислых гомогенатах тканей определяли методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Результаты. СИГМ вызывала нарушение уровней ряда АК и их производных гиппокампа крыс (в том числе фенилаланина, гистидина, глутамина, тирозина и аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ)), а также нарушение активности серотониновой и дофаминовой систем. Предварительное введение L-NAME предотвращает ряд нарушений, в том числе в серотониновой системе, однако не влияло на уровень АРУЦ и снижало уровень тирозина.

Заключение. Предварительное введение L-NAME снижает выраженность индуцированного СИГМ аминокислотного дисбаланса в гиппокампе, нормализует серотониновую систему, снижает уровень тирозина и долю заменимых компонентов пула свободных АК.

Ключевые слова: аминокислоты, биогенные амины, гиппокамп, субтотальная ишемия головного мозга, L-NAME

THE EFFECT OF L-NAME ON THE SPECTRUM OF FREE AMINO ACIDS AND BIOGEN AMINES IN HIPPOCAMPUS OF RATS UNDERGOING SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA**Razvodovsky Y.E.¹, Smirnov V.Y.², Doroshenko E.M.², Korotkevich T.V.³, Pereverzev V.A.⁴, Maksimovich N.Ye.², Semeneya I.N.¹**¹Institute biochemistry of biologically active substances Academy of science of Belarus, 50, Boulevard of Lenin's komsomol St., 230009, Grodno, Republic of Belarus²Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic of Belarus³Republicans scientific-practical centre of psychic health, 152, Dolginovsky Tract, Minsk, Republic of Belarus⁴Belarusian State Medical University, 83, Dzerzhinskogo Av., 220116, Minsk, Republic of Belarus*Abstract*

Objective. The aim of this study was to estimate the changes in the pool of free amino acids and their derivatives in hippocampus of rats undergoing subtotal cerebral ischemia (SCI) and treated with L-NAME.

Methods. The experiment was held on 18 rats: 12 animals underwent bilateral filament occlusion of carotid arteries; L-NAME was administrated to 6 of them. The analyses of free amino acids and their derivate levels in the blood plasma extracts were carried out by reversed-phase HPLC.

Results. Subtotal cerebral ischemia induced imbalance in the pool of amino acids and their derivatives in hippocampus (including phenylalanine, histidine, glutamine, tyrosine, and bran chain amino acids (BCAA), as well as the activity of serotonin and dopamine system. Administration of L-NAME partially prevented the imbalance of the amino acids pool, caused by SCI.

Conclusions. Preventive injection of L-NAME alleviates the imbalance in the pool of free amino acids and biogenic amines in hippocampus caused by SCI, normalizes the serotonin system, decreases the level of tyrosine and share of the replaceable components of free amino acids pool.

Keywords: amino acids, biogenic amines, hippocampus, subtotal cerebral ischemia, L-NAME

Введение

Инсульт является одной из ведущих причин инвалидности и смертности во многих странах мира [6]. Высокая летальность от ишемического инсульта в значительной степени объясняется недостаточной изученностью его патогенеза [5]. Поэтому одной из важнейших задач экспериментальной медицины является выяснение и детализация механизмов ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга.

Исследования, проведенные с использованием ингибиторов различных изоформ NO-синтазы, свидетельствуют о важной роли монооксида азота (NO) в патогенезе ишемического повреждения головного мозга [2, 9]. Одним из направлений детализации патогенетических механизмов ишемического инсульта является изучение изменений пула аминокислот и биогенных аминов головного мозга [3, 4, 7].

Целью исследования явилась характеристика изменений пула аминокислот и биогенных аминов гиппокампа крыс при субтотальной ишемии головного мозга на фоне ведения L-NAME.

Методика

Эксперименты выполнены на 18 белых беспородных крысах-самках (по 6 животных в каждой группе), массой 180-220 г. Крысам опытных групп моделировали субтотальную ишемию головного мозга (СИГМ) путём перевязки обеих сонных артерий в течении одного часа. L-NAME вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг непосредственно перед перевязкой общей сонной артерии. Контрольную группу составили ложнооперированные животные, получавшие эквивалентное количество изотонического раствора NaCl. Все оперативные манипуляции проводились в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг). После извлечения головного мозга осуществляли изъятие фрагмента гиппокампа с его последующим замораживанием в жидком азоте. Подготовка пробы для исследования включала гомогенизацию в 10-ти кратном объеме 0,2М хлорной кислоты, центрифугирование в течение 15 мин. при 13000 g при 4°C с последующим отбором супернатанта. Выбор гиппокампа в качестве объекта исследования обусловлен тем, что данный отдел (в особенности его поля CA1) наиболее чувствительны к недостатку кислорода [8].

Спектр определяемых соединений включал протеиногенные аминокислоты, орнитин, цитруллин, ряд родственных соединений (таурин, α -аминобутират и др.) и биогенные амины. Анализ проводился на хроматографе Agilent 1100 методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой в Na-боратном буфере. Детектирование фотометрическое на длине волны 338 нм (определение АК) и флуориметрическое (для биогенных аминов). Использовалась колонка Zorbax Eclipse Plus C18, 3,5 мкм, 2,1×150 мм, Идентификацию и количественный анализ производили в программе Agilent ChemStation V.04.01[1], калибровка метода осуществлялась с применением концентрата стандартной смеси аминокислот фирмы "Sigma-Aldridge". Используемые подвижные фазы: 0,1М Na-ацетатный буфер (pH 6,25 и 5,75); водные растворы ацетонитрила и метанола (60% об/об). Разделение проводили с градиентным элюированием за 78 мин.; температура колонки 34°C. В работе использовались реактивы квалификации не ниже хч. Тридистиллированную воду для подвижных фаз пропускали через патрон «Norganic» (Millipore, США), подвижные фазы фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм [4].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы R. В случае выполнения условий применимости (нормальность выборок и гомогенность дисперсий) применялся параметрический дисперсионный анализ с поправкой Тьюки на множественность сравнений. В случае невыполнения этих условий применялся непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с поправкой Бенъямини-Хохберга на множественность сравнений. Также использовался корреляционный анализ.

Результаты исследования и их обсуждение

Субтотальная ишемия головного мозга вызвала в гиппокампе крыс повышение уровней фенилаланина, гистидина, 3-метилгистидина, глутамина, α -аминобутирата, АРУЦ и снижение уровней треонина, тирозина и α -аминоадипиновой кислоты (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация аминокислот и их производных в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии головного мозга на фоне введения L-NAME, нмоль/г

	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-NAME
Asp	1812±174	1534±142	1583±91
GSH	50±7,45	75,1±18,6	54,2±6,16
Glu	6394±694	5636±346	6289±424
Asn	44,2±2,17	44,7±2,23	49,6±3,51
Ser	484±54,7	575±56,3	604±80,7
α AAA	31±1,41	21±1,77*	30,7±1,69†
Gln	1880±158	2626±193*	1904±117†
His	66,8±5,59	95,3±8,31*	58,4±2,77†
HSer	10,3±1,19	11,7±0,968	11,9±1,11
3-MHis	6,96±0,856	13,9±2,16*	7,71±1,01†
Gly	643±60,8	669±69,1	651±30,5
PEA	675±45,2	971±148	944±77,5
Thr	277±14,6	165±5,51*	513±36,9*†
1-MHis	3,18±0,403	3,26±0,327	2,29±0,17
Ctr	18,8±1,95	24,4±2,73	20,3±1,84
Arg	69,6±6,79	85,4±8,82	104±7,85*
β Ala	37,1±10,1	45,5±6,95	29±4,13
Car	29,7±3,11	27±5,77	29,3±3,97
Ala	463±55,7	606±72,3	655±99
Tau	3250±363	3805±589	3208±377
GABA	2261±265	2469±184	2338±219
α ABA	7,42±0,772	14,2±0,619*	5,87±0,16†
EA	594±5,34	641±12,8	743±39,6*†
Val	47,4±3,21	65,9±3,26*	63,9±3,7*
Met	23±3,5	21,5±1,58	22,7±1,18
Ctn	68,1±10,2	59,3±10,6	59,1±7,7
Phe	36±1,68	44±3*	32,4±1,24†
Ile	18,1±1,59	28,9±2,01*	28,2±2,43*
Leu	42±3,45	87,9±8,21*	74,6±5,25*
Orn	15,8±1,33	19,9±1,19	20±1,67
Lys	121±11,9	92±6,61	119±10,6
Tyr	31,8±1,16	21,4±1,43*	15,2±0,905*†
Trp	14,5±1,25	14±0,693	11,4±1,5

Примечание (здесь и в табл. 2, 3): * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем; † – $p < 0,05$ при сравнении с СИГМ

Изменений концентраций биогенных аминов при СИГМ не происходило (за исключением роста уровня диоксифенилацетата (DOPA)). (табл. 2). Однако анализ корреляций свидетельствует о

влиянии ишемии на активность их превращений. Так, в норме серотонин и его метаболит, 5-оксиндолацетат (5-НИАА), коррелируют отрицательно, при СИГМ их связь нарушается, уровень 5-НИАА начинает положительно коррелировать с уровнем 5-окситриптофана (5-НТФ). Также, при СИГМ происходит нарушение связей между тирозином и его метаболитами (ДОРА и ДОРАС). Все это может свидетельствовать о функциональных нарушениях серотониновой и дофаминовой систем при ишемии, которые, однако, не сопровождаются изменениями уровней их компонентов.

Таблица 2. Концентрация биогенных аминов в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии головного мозга на фоне введения L-NAME, пмоль/г.

	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-NAME
ДОРА	10,2±0,861	26,4±3,89*	17±2,35* t=2,717;p<0,05
NE	1487±93,8	1399±290	1346±179
МНPG	37,9±4,63	55,4±9,7	41,1±5,85
5-НТФ	7,56±0,92	11±1,83	9,78±1,37
NM	54,5±12,4	60,7±22,8	56,6±7,46
ДОРАС	374±70,2	1675±1210	387±66,9
DA	1484±496	966±187	867±298
5-НИАА	2606±714	2582±601	1483±140
HVA	536±75,8	964±414	421±50,8
5-НТ	1315±342	1629±205	799±119 † t _r =3,502;p<0,01

Анализ интегральных показателей аминокислотного фонда гиппокампа не выявил значимых изменений, за исключением роста при ишемии соотношения АРУЦ и ароматических аминокислот (ААК), обусловленного, очевидно, повышением концентраций АРУЦ (табл. 3).

Таблица 3. Интегральные показатели аминокислотного фонда гиппокампа крыс (нмоль/г) и их соотношения при субтотальной ишемии.

	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-NAME
ААК	83,3 (76/88,7)	82,1 (74,6/83,8)	55,3 (54,4/61,6)*†
АРУЦ	110 (99/117)	175 (166/205)*	171 (148/190)*
Заменимые АК	11538 (9176/14363)	11915 (10507/12506)	11629 (11028/12313)
Незаменимые АК	667 (584/690)	603 (563/642)	872 (862/1053)*†
Гликогенные АК	11983 (9571/14830)	12372 (10890/12914)	12403 (11753/13127)
Кетогенные АК	161 (158/173)	176 (165/187)	190 (177/211)
Нейротрансмиттерные АК	13919 (12177/16852)	14877 (12471/15194)	13933 (12680/14730)
Возбуждающие АК	7990 (6215/10480)	7006 (6621/7928)	7653 (7255/8089)
Тормозные АК	6222 (5961/6373)	7424 (5725/7927)	6453 (6069/6641)
АРУЦ/ААК	1,31 (1,26/1,43)	2,29 (2,08/2,54)*	3,06 (2,28/3,13)*
Заменимые / Незаменимые АК	18,3 (15,4/21,9)	19,4 (18,2/20,5)	12,1 (11/14,3)*†
Гликогенные / Кетогенные АК	76,4 (56,7/95)	69,4 (57,2/75,4)	67,8 (57/72,3)
Возбуждающие / Тормозные АК	1,35 (1,04/1,64)	1,08 (0,917/1,18)	1,17 (1,11/1,55)
Суммарный пул АК	17673 (15594/21123)	19935 (16355/20416)	18366 (16881/19578)

Введение L-NAME предотвращало нарушение при СИГМ уровней фенилаланина, гистидина, 3-метилгистидина, глутамина, α-аминобутирата, α-аминоадипиновой кислоты и ДОРА, что может свидетельствовать о нормализующем влиянии L-NAME в отношении пула этих соединений в гиппокампе. С другой стороны, введение L-NAME никак не сказалось на концентрациях АРУЦ, способствовало повышению уровней треонина и аргинина. Также, снижение уровня тирозина при ишемии усиливалось введением L-NAME. Стоит отметить, что уровни фенилаланина, глутамина, гистидина и 3-метилгистидина в гиппокампе и плазме крови изменялись синхронно [3], что может свидетельствовать о периферическом характере этих изменений.

Введение L-NAME не оказывало влияния на уровни биогенных аминов, за исключением нормализации уровня ДОРА. В то же время, корреляционный анализ свидетельствует о нормализующем действии L-NAME в отношении серотониновой системы гиппокампа на фоне

СИГМ. Рост уровней ААК с одной стороны, и сниженный уровень АРУЦ – с другой, вызвали усиление роста отношения АРУЦ/ААК (табл. 3). Помимо этого, отмечался рост суммарной концентрации незаменимых компонентов АК пула, и связанное с ним снижение доли заменимых аминокислот в общем пуле.

Наиболее значимыми показателями в дискриминации групп являлись треонин, тирозин и лейцин (F -искл=30,3; 11,9 и 3,79 соответственно). При этом наборе предикторов достигалась высокодостоверная дискриминация между группами (Лямбда Уилкса = 0,012, $F=35,3$, $p<10^{-10}$). На рисунке представлено соответствующее расположение групп на плоскости двух главных компонент. Здесь стоит отметить, что треонин и тирозин являлись наиболее значимыми показателями в данной экспериментальной ситуации также и в коре головного мозга [7].

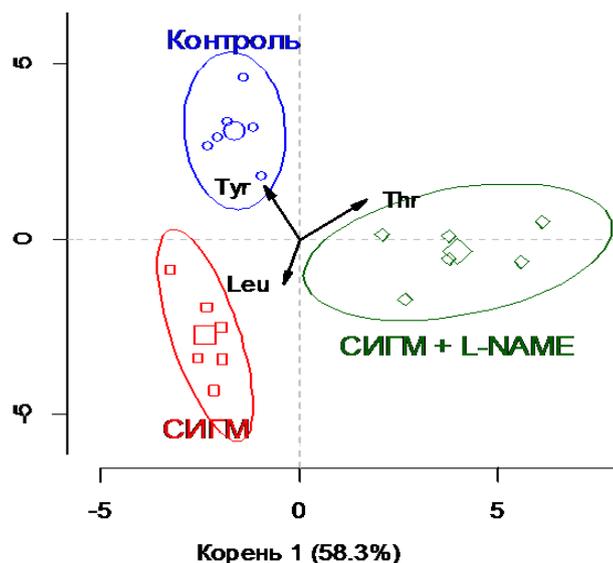


Рис. Расположение канонических значений и векторов стандартизированных канонических переменных на плоскости 2-х главных компонент

Выводы

1. Субтотальная ишемия головного мозга крыс индуцирует нарушение уровней ряда АК и их производных в гиппокампе крыс (в том числе фенилаланина, гистидина, глутамина, тирозина, АРУЦ), а также нарушение активности серотониновой и дофаминовой систем.
2. Предварительное введение L-NAME частично нормализует нарушения, вызванные СИГМ в гиппокампе, активность серотониновой системы, снижает уровень тирозина и долю заменимых компонентов пула свободных аминокислот.

Литература (references)

1. Барковский Е.В., Бокуть С.Б., Бородинский А.Н. и др. Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Высшая школа, 2013. – 491 с. [Barkovskiy E.V., Bokun S., Borodinskiy A.N. i dr. *Sovremennye problemy biochimii. Metody issledovaniya*. The contemporary problems of biochemistry. Methods of investigation. – Minsk: Highest school, 2013. – 491 p. (in Russian)]
2. Максимович Н.Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга. – Гродно, ГрГМУ. – 2004. – 180 с. [Maximovitz N.E. *Role oksida asota v patogenese ischemitzskich Ireperfusionnych povrezdeniy mosga*. Role of nitric oxide in the ischemic and reperfusion damage to the brain. – Grodno, GrGMU. – 2004. – 180 p. (in Russian)]
3. Разводовский Ю.Е. Троян Э.И., Дорошенко Е.М. и др. Содержание аминокислот и их производных в коре головного мозга крыс при его частичной ишемии // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2019. – Т.18, №1. – С. 5-9. [Razvodovskiy Y.E., Troyan E.I., Doroshenko Ye.M. et

- al. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Proceedings of the Smolensk State Medical Academy. – 2019. – V.18, N1. – С. 5-9. (in Russian)]
4. Смирнов В.Ю., Разводовский Ю.Е., Дорошенко Е.М., Островский С.Ю. Влияние композиции аминокислот с разветвленной углеводородной цепью, триптофана и таурина на обмен аминокислот в экспериментальных моделях алкоголизма // Украинский биохимический журнал. – 2003. – Т.75, №4. – С. 101-107. [Smirnov V.Y., Razvodovsky Y.E., Doroshenko E.M., Ostrovsky S.Y. *Ukrainskiy biochimitzeskiy zurnal*. Ukrainian biochemical journal. – 2003. – V.75, N4. – P. 101-107. (in Russian)]
 5. Maksimovich N.Ye. Tolerance of hypoxic hypoxia in rats with cerebral ischemia treated by NO-synthasemodulators // *Hypoxia medical*. – 2004. – V.1-2. – P. 20-23.
 6. Razvodovsky Y.E. Alcohol attributable fraction of stroke mortality in Russia // *Journal of the Neurological Science*. – 2013. – V.33, N1. – P. 231.
 7. Razvodovsky Y.E., Troyan E.I., Doroshenko Ye.M. et al. Levels of Free Amino Acids and their Derivatives in the Brain Cortex of Rats During Unilateral Ischemia // *International Journal Neuroscience and Behavior*. – 2017. – V.1, N1. – P. 18-21.
 8. Ryosuke M.D. Effect of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia // *Anesthesiology*. – 2002. – V. 96. – P. 705-710.
 9. Salter M., Duffy C., Garthwaite J., Strijbos P.J. Substantial regional and hemispheric differences in brain nitric oxide synthase (NOS) inhibition following intracerebroventricular administration of N-nitro-L-arginine (L-NA) and its methyl ester (L-NAME) // *Neuropharmacology*. – 1995. – N34. – P. 639-649.

Информация об авторах

Разводовский Юрий Евгеньевич – заведующий отделом проблем регуляции метаболизма Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук, Беларусь. E-mail: razvodovsky@tut.by

Смирнов Виталий Юрьевич – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: vit_sm@mail.ru

Дорошенко Евгений Михайлович – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: vit_sm@mail.ru

Короткевич Татьяна Валерьевна – кандидат медицинских наук, заместитель директора ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья» по организационно-методической работе, Беларусь. E-mail: kor-1965@mail.ru

Переверзев Владимир Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: Pereverzev2010@mail.ru; PereverzevVA@bsmu.by

Максимович Наталья Евгеньевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: mne@grsmu.by

Семененя Игорь Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, директор Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук, Беларусь. E-mail: insemenenya@yandex.by