

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 18, №1

2019



МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ**ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

УДК 616.441.577.112

СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ЕГО ЧАСТИЧНОЙ ИШЕМИИ© Разводовский Ю.Е.¹, Троян Э.И.¹, Дорошенко Е.М.¹, Смирнов В.Ю.¹,
Переверзев В.А.², Максимович Н.Е.¹¹ Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80² Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, 83*Резюме*

Цель. Характеристика изменений содержания свободных аминокислот (АК) и их производных в лобных отделах больших полушарий головного мозга крыс в различные сроки его частичной ишемии.

Методика. У 21 крыс исследованы показатели фонда свободных АК и их производных в лобных отделах больших полушарий в различные сроки частичной ишемии головного мозга (ЧИГМ): 1, 3 ч. и 1 сут. Анализ содержания АК и их дериватов проводился в хлорнокислом экстракте ткани методом обращенно-фазной хроматографии.

Результаты. Сдвиги в фонде свободных АК отмечались через 3 ч. ЧИГМ в виде повышения уровней АК с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ) – валина, лейцина и лизина, и обеднения пула ароматических аминокислот (ААК) – тирозина и триптофана с двукратным повышением АРУЦ/ААК. Кроме того, отмечалось снижение содержания аспарагина, отношения заменимых АК к незаменимым АК и гликогенных АК к кетогенным АК. Эти изменения нивелировались через 1 сут. ЧИГМ.

Заключение. Характер изменений в фонде свободных АК и их производных в лобных отделах больших полушарий головного мозга крыс меняется в зависимости от срока ишемии. ЧИГМ сопровождается изменениями АК фонда в раннем периоде (3 ч.) в виде повышения содержания энергетически значимых АРУЦ (валина, лейцина) и снижения ААК (тирозина, триптофана) с последующей их нормализацией спустя 1 сут. ишемического воздействия.

Ключевые слова: аминокислоты, головной мозг, частичная ишемия

POOL OF FREE AMINO ACIDS IN BRAIN CORTEX AFTER PARTIAL ISCHEMIARazvodovsky Y.E.¹, Troyan E.I.¹, Doroshenko E.M.¹, Smirnov V.Y.¹, Pereverzev V.A.²,
Maksimovich N.Ye.¹¹Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic of Belarus²Belarusian State Medical University, 83, Dzerzhinsky Prospect., 220116, Minsk, Republic of Belarus

Objective. The aim of this study was to estimate the amino acids (AA) pool in brain hemispheres cortex of rats at different duration of unilateral (left-side filament occlusion of arteria carotis) cerebral ischemia (UCI).

Methods. The changes of AAs pool and their derivatives in the frontal cortex of the cerebral hemispheres at different duration of UCI (1 hour, 3 hours, 1 day) were studied in 21 rats. The analyses of the levels of AAs and their derivatives were carried out in the supernatant of protein-free tissue homogenates by reversed-phase liquid chromatography using chromatograph Agilent 1100.

Results. The results show that the concentration of several AA was altered 3 hours following ischemia. In particular, we detected a reduction in the levels of valine, leucine and lysine. Ischemia during 3 hours also resulted in decreased levels of asparagine and tyrosine. The ratio of essential/nonessential AA and the

ratio of glycogenous/ketogenous AA were also reduced. In contrast, the ratio of the total branched-chain AA (BCAA) levels to aromatic amino acids (AAA) levels was increased. All these changes were normalized 24 hours following ischemia.

Conclusion. The results of present study suggest that the changes in the AA pool in brain hemispheres cortex of rats depend on duration of ischemia. In the early period (3 hours) UCI was accompanied by increase in the level of BCAA (valine and leucine) and reduction in the levels of AAA (tyrosine and tryptophan) with the normalization all these changes 24 hours following ischemia.

Keywords: amino acids, brain hemispheres, partial ischemia

Введение

Инсульт является одной из ведущих причин инвалидности и смертности во многих странах мира [1, 4, 6, 7]. В 85% случаев инсульт возникает вследствие локальной ишемии головного мозга (ГМ) с развитием необратимых повреждений в виде некроза из-за отсутствия адекватного коллатерального кровообращения на уровне концевых артерий виллизиева круга [1]. Механизмы развития ишемического инсульта сложны и до конца не изучены. К настоящему времени в патогенезе ишемического инсульта выделяют так называемые стадии биохимического каскада, включающие энергодифицит, глутаматную и аспартатную эксцитотоксичность, окислительный стресс, воспаление, апоптоз [3, 8].

Несмотря на широкий арсенал средств, используемых в лечении ишемического инсульта, отсутствие полных представлений о звеньях патогенеза, лежащих в основе ишемических повреждений, не позволяет осуществлять эффективную терапию. Предполагается, что одним из возможных направлений детализации механизмов развития повреждения ГМ при его ишемии является изучение изменений аминокислотного фонда мозговой ткани [3].

Как известно, аминокислоты (АК) и их производные (в частности, биогенные амины) играют важную роль в функционировании ГМ, как в норме, так и при патологии, участвуя в биосинтезе мембранных белков и сигнальных молекул, гормонов и регуляторных пептидов. Они выступают в качестве источника энергии через цикл трикарбоновых кислот и участвуют в образовании углеводов путем глюконеогенеза в печени при их избытке [9].

В центральной нервной системе АК отводится, прежде всего, нейромедиаторная функция. Известна роль АК в регуляции активности процессов возбуждения и торможения не только в норме, но и при патологии. Поэтому развитие дисбаланса уровней АК в головном мозге может явиться не только причиной медиаторных нарушений, но и стать причиной возникновения различных нервно-психических расстройств [2, 3, 8].

В предыдущих исследованиях показана прогностическая значимость изменения уровня нейроактивных АК в плазме крови [2] и в спинномозговой жидкости [5] у больных с острым ишемическим инсультом. Однако, несмотря на несомненную научную ценность, результаты ранее проведенных исследований достаточно противоречивы и не дают полной картины изменения АК пула и их активных метаболитов в динамике ишемического инсульта. Наличие таких данных позволит детализировать патогенез повреждения ГМ при его ишемии и в последующем разработать новые патогенетически обоснованные пути коррекции этой патологии.

Целью исследования явилась характеристика изменений содержания свободных АК и их производных в лобных отделах больших полушарий головного мозга крыс в различные сроки его частичной ишемии.

Методика

Эксперименты выполнены на 21 белых беспородных крысах-самках, массой 180-220 г. Содержание животных осуществлялось в условиях контролируемого температурного, светового и шумового режима. При выполнении экспериментов руководствовались принципами гуманного отношения к животным. Оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной анестезии в соответствии с этическими нормами, рекомендованными комиссией по гуманному обращению с экспериментальными животными (приказ ректора УО ГрГМУ от 27.12.2006 г. №125).

Животные разделены на 4 группы, включая контроль. Крысам опытных групп моделировали частичную ишемию головного мозга (ЧИГМ) путем перевязки общей сонной артерии слева длительностью: опыт 1 – 30 мин. (n=5); опыт 2 – 3 ч. (n=7); опыт 3 – 1 сут. (n=5). Контрольную группу составили ложнопериованные животные (n=4). Оперативные манипуляции проводились

в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг). После извлечения ГМ осуществляли изъятие фрагмента лобной доли больших полушарий (кора с подлежащим белым веществом) на стороне перевязки 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. Спектр определяемых соединений включал протеиногенные АК, орнитин, цитруллин, а также ряд родственных соединений (таурин, α -аминобутират и этаноламин). Анализ АК и их дериватов проводился методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой в Na-боратном буфере на хроматографе Agilent 1100 [17].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы StatSoft Statistica 10.0. Применялись методы описательной статистики, непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса а также метод многомерной статистики – линейный дискриминантный анализ.

Результаты исследования и их обсуждение

Моделирование ЧИГМ в течение 30 мин. не вызывало изменений содержания свободных АК и их производных в лобном отделе полушарий ГМ, при этом отмечена тенденция к увеличению содержания ряда АК (лейцина, лизина, гистидина, тирозина) и ГАМК (рис. 1).

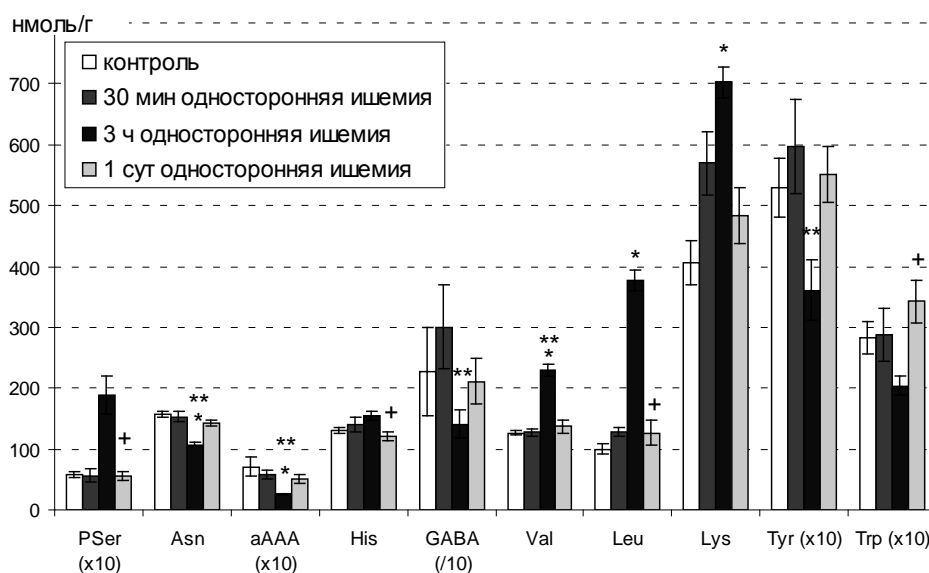


Рис. 1. Содержание аминокислот и их производных в лобной доле полушария головного мозга крыс на стороне ишемии. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** – $p < 0,05$ по отношению к ишемии 30 мин.; + – $p < 0,05$ по отношению к ишемии 3 ч.; PСer – фосфосерин, Asn – аспарагин, α -ААА – α -аминоадипиновая кислота, His – гистидин, GABA – γ -аминомасляная кислота (ГАМК), Val – валин, Leu – лейцин, Lys – лизин, Tyr – тирозин, Trp – триптофан

При 3-х часовой ЧИГМ отмечено увеличение концентрации АРУЦ и лизина в лобных отделах ишемизированного полушария головного мозга. Кроме этого, наблюдалось повышение содержания серина и гистидина ($p < 0,05$). В то же время показано, что при острой ишемии мозга имеет место снижение АРУЦ в спинномозговой жидкости [5].

Как известно, ГМ является одним из мест катаболизма АРУЦ с образованием соответствующих α -кетокислот и образующихся при их катаболизме ацил-КоА [9]. Повышение уровней АРУЦ может быть следствием патологии первого этапа – трансаминирования с α -кетоглутаратом под действием аминотрансферазы, что может явиться причиной нарушения функции мозга при ишемическом воздействии, либо изменениями систем транспорта АК в мозг.

Также отмечено снижение уровня аспарагина, являющегося метаболитом возбуждающего медиатора аспартата, а также тирозина и триптофана (ароматических аминокислот), α -аминоадипиновой кислоты и ГАМК, по сравнению с их содержанием в лобных отделах головного

мозга в контроле ($p < 0,05$) и через 30 мин. ЧИГМ ($p < 0,05$). Как известно, ароматические аминокислоты в головном мозге являются предшественниками медиаторов (тирозин – катехоламинов, триптофан – серотонина и мелатонина). Причиной имеющегося дефицита ароматических АК (ААК) при избытке АРУЦ может быть конкуренция последних за транспортные системы гематоэнцефалического барьера.

Отмечалась тенденция к увеличению содержания гетероциклической аминокислоты гистидина ($p > 0,05$) – субстрата для образования гистамина, одного из важных нейромедиаторов, в реакциях декарбоксилирования.

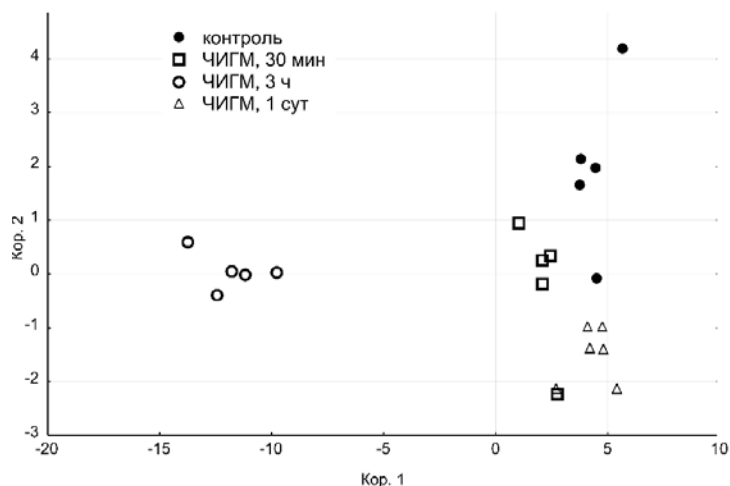


Рис. 2. График значений дискриминантной функции на плоскости двух главных компонент, характеризующий распределение аминокислотного пула лобной доли полушария головного мозга крыс при его частичной ишемии (ЧИГМ)

Через 3 ч. ЧИГМ отмечалось снижение по отношению к контролю соотношения заменимых и незаменимых АК за счет повышения содержания последних, по-видимому, из-за нарушения процессов их дезаминирования и трансаминирования. Также снизилось отношение суммы концентраций гликогенных АК к кетогенным (вследствие повышения содержания кетогенных АК).

Выявленные изменения АК в лобной доле головного мозга через 3 ч. ЧИГМ нивелировались через 1 сут. ишемии головного мозга. При этом отмечалось снижение содержания гистидина, лейцина и фосфосерина, по сравнению с их уровнем при ЧИГМ продолжительностью 3 ч., достигая при этом контрольных значений ($p > 0,05$). О нормализации аминокислотного фонда в лобных отделах коры головного мозга через 1 сут. ЧИГМ свидетельствуют результаты дискриминантного анализа полученных данных (рис. 2), согласно которым расстояние между центрами опытных и контрольной групп на плоскости двух главных компонент было максимальным при ЧИГМ продолжительностью 3 ч. и минимальным – через 1 сут. ЧИГМ.

Изменений концентрации тормозного медиатора (ГАМК) и возбуждающих аминокислот-трансммиттеров (аспартат, глутамат), а также отношения тормозных медиаторов к возбуждающим в изучаемые периоды ЧИГМ не наблюдалось. Эта картина не совпадает с данными литературы, в которых показано снижение уровня возбуждающих и тормозных АК на фоне субтотальной ишемии головного мозга [1]. Однако, в других исследованиях при мозговой ишемии показано повышение выброса возбуждающих аминокислот – глутамата и аспартата с одновременным подавлением их поглощения [8]. Эти различия могут быть обусловлены использованием авторами для изучения эффектов ишемии модели субтотальной ишемии головного мозга, предполагающей перевязку обеих общих сонных артерий, в отличие от используемой нами модели частичной ишемии, предполагающей перевязку одной общей сонной артерии. Таким образом, полученные нами данные указывают на возможные механизмы развития энергетического и медиаторного дисбаланса и связанных с ними последствий функционирования головного мозга при изучаемой патологии. Можно предполагать, что ограничение либо полное исключение поступления с пищей АРУЦ (лейцина, изолейцина и валина) позволит снизить последствия медиаторных нарушений, обусловленных дефицитом медиаторных АК – тирозина и триптофана, в поздние сроки ишемии.

Заключение

Характер изменений в фонде свободных АК и их производных в лобных отделах больших полушарий головного мозга крыс меняется в зависимости от срока ишемии. В раннем периоде (3 ч.) односторонней ишемии головного мозга в лобной доле больших полушарий на стороне ишемии развивается аминокислотный дисбаланс, проявляющийся в виде повышения содержания энергетически значимых АРУЦ (валина, лейцина) и снижения – ААК (тирозина, триптофана) с последующей их нормализацией спустя 1 сут. ишемического воздействия.

Литература (references)

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина, 2001. – 327 с. [Gusev E.I., Skvortsova V.I. *Ishemiya golovnogo mozga*. Ischemia of the brain. – М.: Meditsina, 2001. – 327 p. (in Russian)]
2. Кулеш С.Д., Дорошенко Е.М. Особенности метаболизма нейроактивных аминокислот в остром периоде ишемического инсульта // Журнал невропатологии и психиатрии. – 2000. – №5. – С. 64-72. [Kulesh S.D., Doroshenko E.M. *Zhurn. nevropatol. i psihatrii*. Journal of neurology and psychiatry. – 2000. – N5. – P. 64-72. (in Russian)]
3. Кулеш С.Д. Патогенез ишемического инсульта: Биохимические механизмы и роль нейроактивных аминокислот // Медицинские Новости. – 1998. – №1. – С. 21-24. [Kulesh S.D. *Meditsinskie Novosti*. Medical News. – 1998. – N1. – P. 21-24. (in Russian)]
4. Разводовский Ю.Е. Потребление алкоголя и смертности от инсульта в Беларуси // Вопросы наркологии. – 2009. – №6. – С. 82-92. [Razvodovsky Y.E. *Voprosyi narkologii*. The Questions of Narcology. – 2009. – N6. – P. 82-92. (in Russian)]
5. Скворцова В.И., Раевский К.С., Коваленко А.В. Содержание нейротрансмиттерных аминокислот в спинномозговой жидкости больных острым ишемическим инсультом // Журнал неврологии и психиатрии. – 1999. – №2. – С. 34–38. [Skvortsova V.I., Raevskiy K.S., Kovalenko A.V. *Zhurnal neurologii i psihatrii*. Journal of neurology and psychiatry. – 1999. – N2. – P. 34-38. (in Russian)]
6. Razvodovsky Y.E. The differential effects of beverage type on stroke mortality // *Clinical Experimental Cardiology*. – 2015. – N2. – P. 1-6.
7. Razvodovsky Y.E. Alcohol attributable fraction of stroke mortality in Russia // *Journal of the Neurological Science*. – 2013. – V.33, N 1. – P. 231.
8. Zablocka B., Domanska-Janik K. Enhancement of 3[H]D-aspartate release during ischemia like conditions in rat hippocampal slices: source of excitatory amino acids // *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. – 1996. – V.56, N1. – P. 63-70.
9. Fernstrom J.D. Branched-chain amino acids and brain function // *The Journal of Nutrition*. – 2005(Suppl.). – P. 1539-1546.

Информация об авторах

Разводовский Юрий Евгеньевич – ассистент кафедры патологической физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: razvodovsky@tut.by

Троян Элина Ивановна – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры патологической физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: elina8560@mail.ru

Дорошенко Евгений Михайлович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: vit-sm@mail.ru

Смирнов Виталий Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: vit-sm@mail.ru

Переверзев Владимир Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии УО «Белорусский государственный медицинский университет» Минздрава Республики 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» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: mne@grsmu.by