

ISSN 2225-6016

# ВЕСТНИК

*Смоленской государственной  
медицинской академии*

*Том 18, №4*

2019



## МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.441.577.112

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И БЛОКАТОРА СИНТЕЗА МОНООКСИДА АЗОТА L-NAME НА СПЕКТР АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**  
© Разводовский Ю.Е.<sup>1</sup>, Смирнов В.Ю.<sup>2</sup>, Переверзев В.А.<sup>3</sup>, Максимович Н.Е.<sup>2</sup>, Семененя И.Н.<sup>1</sup><sup>1</sup>Государственное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси» Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Бульвар ленинского комсомола, 50<sup>2</sup>УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, 83*Резюме*

**Цель.** Характеристика изменений пула свободных аминокислот и их метаболитов в плазме крови крыс при субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) на фоне введения L-аргинина и 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-аргинин и L-NAME вводили 6 животным внутривенно в дозе 5 мг/кг непосредственно перед перевязкой сонных артерий. Содержание аминокислот и их дериватов в экстрактах плазмы крови определяли методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

**Результаты.** СИГМ индуцировала аминокислотный дисбаланс плазмы крови, проявлением которого явилось повышение уровней целого ряда соединений. Предварительное введение композиции L-аргинина и L-NAME предотвращает рост ряда компонентов аминокислотного фонда плазмы крови (в том числе аспартата, глицина, таурина, аланина и фенилаланина) при субтотальной ишемии головного мозга.

**Заключение.** Предварительное введение композиции L-аргинина и L-NAME снижает выраженность дисбаланса пула аминокислот и родственных соединений плазмы крови при СИГМ.

*Ключевые слова:* аминокислоты, плазма крови, субтотальная ишемия головного мозга, L-аргинин, L-NAME

**EFFECT OF L-ARGININE AND L-NAME NITRIC OXIDE SECRETIONBLOCATOR ON THE SPECTRUM OF FREE AMINO ACIDS IN BLOOD PLASMA OF RATS UNDERGOING SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA**Razvodovsky Y.E.<sup>1</sup>, Smirnov V.Y.<sup>2</sup>, Pereverzev V.A.<sup>3</sup>, Maksimovich N.Ye.<sup>2</sup>, Semeneniya I.N.<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute biochemistry of biologically active substances, 50, Boulevard of Lenin's Komsomol, St., 230009, Grodno, Belarus<sup>2</sup>Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230023, Grodno, Belarus<sup>3</sup>Belarusian State Medical University, 83, Dzerzhinsky Av., 220116, Minsk, 83, Belarus*Abstract*

**Objective.** To estimate the changes in the pool of free amino acids and their derivatives in plasma of rats undergoing subtotal cerebral ischemia (SCI) and treated with L-arginine and L-NAME.

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

**Results.** Subtotal cerebral ischemia induced imbalance in the pool of plasma amino acids. Concentrations of several amino acids were elevated after subtotal cerebral ischemia, including aspartate, glycin, taurine, alanine and phenylalanine. Administration of L-arginine and L-NAME partially prevented the imbalance of the amino acids pool, caused by SCI.

**Conclusions.** Preventive injection of L-arginine and L-NAME alleviate the imbalance in the pool of free amino acids of blood plasma caused by SCI.

*Keywords:* amino acids, blood plasma, subtotal cerebral ischemia, L-arginine, L-NAME

## Введение

Оксид азота является многофункциональным биологическим медиатором, играющим важную роль в поддержании гомеостаза, включая участие в передаче сигнала, контроле гемодинамики, регуляции клеточной пролиферации, процессах воспаления, свободнорадикального окисления [7]. Моделирование дефицита оксида азота с помощью блокатора его синтеза N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) приводит к развитию артериальной гипертензии, гипертрофии кардиомиоцитов, увеличению коэффициента эндотелиальной дисфункции [8]. Имеющиеся в настоящее время данные о роли оксида азота при ишемии головного мозга достаточно противоречивы [2].

Предполагается, что генерация NO при ишемии мозга может иметь двойные последствия, приводя с одной стороны к увеличению мозгового кровотока, повышению антитромбогенных свойств крови [8, 9], а с другой стороны, к усилению повреждения мозга посредством стимуляции глутамат-чувствительных NMDA-рецепторов мозга и индукции глутаматной нейротоксичности [6].

Повреждающие эффекты NO при развитии патологического процесса в условиях ишемии мозга находятся в хрупком равновесии с NO-зависимыми механизмами многоуровневой, многокомпонентной защиты мозга от повреждения [2]. Различия в результатах исследований с использованием доноров и ингибиторов NO могут зависеть от концентраций NO, источника NO, стадии ишемического процесса, в которую используются препараты, а также других факторов [6]. В настоящее время обсуждается вопрос о неоднозначной роли оксида азота, образуемого при участии различных изоформ NOS в ишемическом повреждении головного мозга (ГМ) [9].

Использование неселективных ингибиторов NOS, в частности N-нитро и N-метильных аналогов L-аргинина в качестве возможных нейропротекторов при ишемическом повреждении дало противоречивые результаты. По данным одних авторов, однократное применение ингибитора NOS L-NAME вызывало защитный эффект на модели фокальной ишемии мозга у крыс, проявлявшийся в уменьшении зоны инфаркта [4]. По данным других - использование NG-nitro-L-arginine (50-100 мг/кг интраперитонеально) за 15 ч. до моделирования ишемии головного мозга у крыс оказывало нейропротекторный эффект, что дало основание автору предположить о ключевой роли NO в патогенезе ишемических инсультов [9].

Использование в эксперименте неселективного ингибитора NOS- L-NAME, обладающего необратимым ингибиторным действием в отношении обеих конституциональных изоформ NOS (нейрональной и эндотелиальной) снижало антигипоксическую резистентность экспериментальных крыс с субтотальной ишемией головного мозга, усиливая проагрегационные, провоспалительные и прооксидантные эффекты [2]. Учитывая, что введение селективного ингибитора нейрональной NOS 7-нитроиндазола такого эффекта не вызывало [6], отрицательный эффект L-NAME можно отнести к его ингибирующему эндотелиальную изоформу NOS действию. Противоречивость результатов предыдущих исследований обуславливает актуальность поиска факторов, способных оказывать влияние на реализацию эффектов NO.

Целью исследования явилась характеристика изменений пула аминокислот и их метаболитов в плазме крови крыс при субтотальной ишемии ГМ на фоне ведения композиции L-аргинина и 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 течение одного часа. Композицию L-аргинина и L-NAME вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг непосредственно перед перевязкой общих сонных артерий. Контрольную группу составили ложнооперированные животные, получавшие эквивалентное количество изотонического раствора NaCl. Все оперативные манипуляции проводились в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг). После декапитации животных отобранную в гепаринизированные пробирки кровь центрифугировали 15 мин. при 3000 g. К полученной плазме добавляли равный объем среды, содержащей 0,1М хлорную кислоту и 250 мкмоль/л δ-аминовалериановой кислоты в качестве внутреннего стандарта. После центрифугирования (15 мин. при 13000 g и +4°C) полученный супернатант немедленно отбирали.

Спектр определяемых соединений включал, помимо протеиногенных аминокислот, орнитин, цитруллин и ряд их производных (таурин, α-аминобутират и др.). Анализ проводился на хроматографе Agilent 1100 методом обращенно-фазной жидкостной хроматографии [1, 3, 5]. В работе использовались реактивы квалификации не ниже хч.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы R. В случае выполнения условий применимости применялся параметрический дисперсионный анализ с поправкой Тьюки на множественность сравнений (данные для этих переменных представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего). В случае невыполнения этих условий применялся непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с поправкой Бенъямини-Хохберга на множественность сравнений (в таблицах для этих переменных приведены значения медианы и квартилей). Также использовался корреляционный и линейный дискриминантный анализ.

## Результаты исследования и их обсуждение

При субтотальной ишемии ГМ наблюдалось повышение уровней аспартата, аспарагина, глутамина, глицина, аланина, фенилаланина, гистидина, треонина, цитруллина, орнитина, аминокислот с разветвлённой углеводородной цепью (АРУЦ), а также ряда производных аминокислот – таурина, α-аминоадипината, 3-метилгистидина, β-аланина (табл. 1). Таким образом, изменения касались в основном гликогенных аминокислот и носили односторонний (в сторону повышения концентраций) характер. Тем не менее, повышения соотношения гликогенных и кетогенных аминокислот не наблюдалось (табл. 2) вследствие более чем двукратного повышения уровня лейцина. Несмотря на рост уровней глицина и таурина (играющих, как известно, роль тормозных нейромедиаторов в ЦНС), соотношение сумм возбуждающих и тормозных соединений в плазме крови не изменялось. Анализ интегральных показателей аминокислотного фонда выявил повышение суммарного пула протеиногенных аминокислот, рост содержания как заменимых, так и незаменимых его компонентов, а также соотношения АРУЦ и ароматических аминокислот (ААК).

Введение композиции L-аргинина и L-NAME предотвращало ряд проявлений аминокислотного дисбаланса, индуцируемого субтотальной ишемией ГМ, в том числе повышение уровней аспартата, глутамина, гистидина, глицина, таурина, аланина, 3-метилгистидина и фенилаланина. В то же время уровни аспарагина, β-аланина, цитруллина и АРУЦ сохранялись выше нормы. Кроме этого, наблюдалось повышение концентраций серина, гомосерина, треонина, лизина и аргинина (табл. 1). Следствием этих изменений явилось повышение содержания кетогенных аминокислот и отношения заменимых / незаменимых аминокислот в плазме крови (табл. 2). Введение композиции не предотвращало рост суммарного пула протеиногенных АК (в том числе его гликогенных компонентов), а также соотношения АРУЦ и ААК.

Наиболее значимыми показателями в дискриминации групп являлись аргинин, 3-метилгистидин, α-аминоадипиновая кислота (F-искл >10) и, сравнительно менее значимыми, тирозин, метионин и триптофан (табл. 3). При этом наборе предикторов достигалась высокодостоверная дискриминация между группами (Лямбда Уилкса = 0,00326, F=27,51, p<10<sup>-9</sup>).

На рисунке представлено расположение групп на плоскости двух главных компонент. Видно, что наибольшие изменения происходят относительно 1-го корня дискриминантной функции, объясняющей более 78% общей дисперсии. Вдоль этой оси наблюдалась максимальная дискриминация групп «контроль» и «СИГМ + препараты» с одной стороны и группы СИГМ – с другой.

Таблица 1. Концентрация аминокислот и их производных в плазме крови крыс при субтотальной ишемии головного мозга на фоне введения композиции L-аргинина и L-NAME, мкмоль/л

Аминокислоты	Контроль	СИГМ	L-NAME + L-аргинина + СИГМ
Asp	20,8±2,56	45,8±7,15*	29,3±4,15
Glu	155±24,2	228±36,9	203±19,6
Asn	63,1±6,06	97,4±8,94*	91,9±7,85*
Ser	202±27,1	298±37,7	316±26,5*
aAAA	2,27±0,164	4,78±0,882*	5,4±0,463*
Gln	404±68,5	907±111*	573±33,8†
His	63,7±7,17	113±10,7*	96,2±9,79
HSer	11,5 (11,3/14,9)	11,9 (10,7/13,6)	19,6 (16,8/20,2)*†
3-MHis	10,1±1,27	26,1±3,1*	16,1±2,16†
Gly	243±33,7	450±80,1*	256±31
PEA	12±0,895	12,8±1,06	13,9±1,76
Thr	143 (120/166)	266 (211/297)*	640 (379/783)*†
1-MHis	6,1±1,05	6,28±1,24	3,72±0,144
Chr	60,7±7,87	125±14,5*	136±8,72*
Arg	86,9 (44,9/89,6)	24,2 (3,94/79,5)	298 (190/411)*†
Ans	8,09±1,81	15,5±4,47	8,34±0,823
βAla	5,61 (5,34/5,72)	7,84 (6,74/25,6)*	8,93 (7,99/9,17)*
Car	8,99±1,4	7,94±1,12	8,64±1,02
Ala	433±70,8	1070±190*	575±63,8†
Tau	280±25,8	468±58,1*	320±23†
GABA	7,57±1,06	6,05±0,283	14,8±4,49
Tyr	54,8±5,14	73,6±8,07	47,3±3,77†
αABA	12,4±2,13	13,3±1,79	13,1±1,04
Val	106±8,95	223±22,4*	276±42,3*
Met	31,1±4,3	47,9±4,39*	47,5±5,22
Trp	44,3 (40,2/51,2)	37,5 (33/42,2)	72 (67,6/81,1)†
Phe	50,8±4,08	95±10,9*	76,6±7,74
Ile	49,6±4,23	117±13,5*	137±22,8*
Leu	80,5±6,08	187±22,7*	213±38,6*
Orn	59,8 (47,8/85)	130 (108/148)*	132 (99,2/287)*
Lys	233±39,1	351±43,3	448±82,8*

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

Наибольший вклад в эту компоненту вносили концентрации 3-метилгистидина, аргинина, метионина и триптофана. Группа контроля и СИГМ + препараты дискриминировали только относительно 2-го корня, значение которого в наибольшей степени зависела от тирозина и α-аминоадипиновая кислота. Однако, различия вдоль этой оси имеют меньшую выраженность, т.к. второй корень дискриминантной функции объясняет менее 22% общей дисперсии.

Всё это может свидетельствовать о снижении выраженности дисбаланса пула аминокислот и родственных соединений, индуцированного СИГМ в плазме крови, при предварительном введении композиции L-аргинина и L-NAME.

Таблица 2. Интегральные показатели аминокислотного фонда плазмы крови крыс при субтотальной ишемии головного мозга на фоне введения композиции L-аргинина и L-NAME

Аминокислоты	Контроль	СИГМ	L-NAME + L-аргинина + СИГМ
ААК	152 (144/155)	215 (190/236)	203 (190/210)
АРУЦ	236±18,9	527±58*	625±104*
Заменяемые	1580±214	3170±464*	2090±161
Незаменяемые	803 (684/956)	1530 (1160/1600)*	1910 (1630/2320)*
Гликогенные	1940±243	3770±492*	3350±316*
Кетогенные	314±42,6	538±38,8	661±120*
Нейротрансмиттерные	706±78,3	1200±175*	823±72,5
Возбуждающие	176±25,9	274±42,4	232±23,7
Тормозные	530±56,8	924±135*	591±50†
АРУЦ/ААК	1,53±0,0882	2,57±0,153*	3,09±0,334*
Заменяемые/Незаменяемые	1,69 (1,65/1,93)	2,06 (1,81/2,12)	1,15 (1,04/1,31)*†
Гликогенные/Кетогенные	5,42 (4,98/5,93)	6,73 (5,23/7,61)	5,77 (4,96/6,27)
Возбуждающие/Тормозные	0,328±0,029	0,299±0,019	0,392±0,0141†
Суммарный пул протеиногенных АК	2380±257	4600±524*	4040±428*

Таблица 3. Результаты дискриминантного анализа. Анализ канонических дискриминантных функций

Аминокислоты	Лямбда Уилкса	Частная Лямбда Уилкса	F-искл.(2,10)	p	Толерантность
Arg	0,0121	0,271	13,47	0,00145	0,406
3-MHis	0,0313	0,104	43,03	0,0000122	0,216
αAAA	0,0115	0,284	12,58	0,00186	0,319
Tyr	0,00826	0,395	7,655	0,00963	0,252
Trp	0,00711	0,459	5,901	0,0203	0,415
Met	0,00858	0,380	8,157	0,00793	0,218

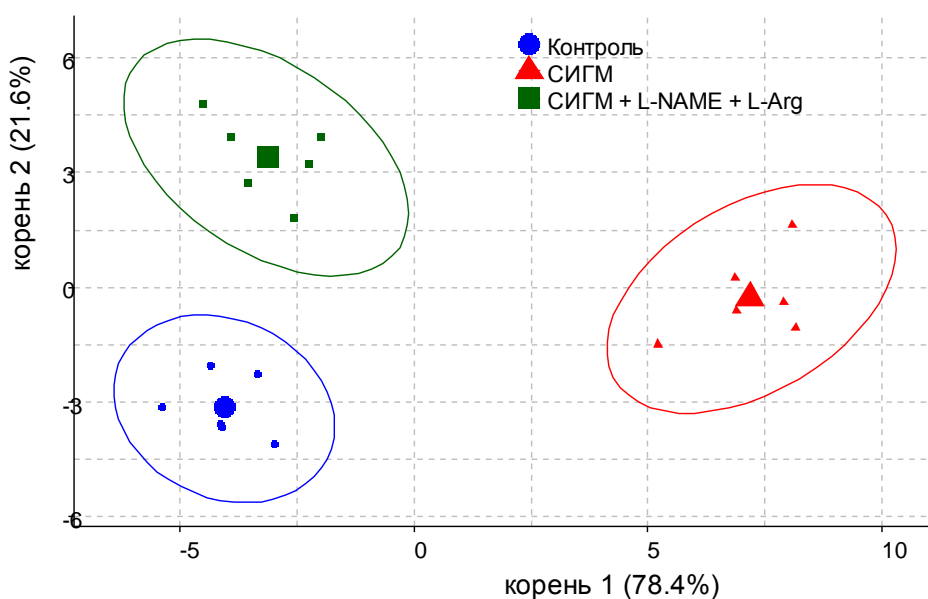


Рис. Расположение канонических значений дискриминантных функций на плоскости 2-х главных компонент

## Выводы

1. Субтотальная ишемия головного мозга крыс индуцирует выраженный аминокислотный дисбаланс плазмы крови, проявляющийся в повышении ряда гликогенных аминокислот, лейцина и таурина.
2. Предварительное введение композиции L-аргинина и L-NAME предотвращает рост ряда компонентов аминокислотного фонда плазмы крови (в том числе аспартата, глицина, таурина, аланина и фенилаланина) при субтотальной ишемии ГМ.
3. Предварительное введение композиции L-аргинина и L-NAME вызывает рост серина, треонина, лизина и аргинина и не предотвращает индуцированный СИГМ рост суммарного пула протеиногенных и гликогенных аминокислот, АРУЦ, а также соотношения АРУЦ и ААК.
4. Предварительное введение композиции L-аргинина и L-NAME снижает выраженность дисбаланса пула аминокислот и родственных соединений плазмы крови при СИГМ.

## Литература (references)

1. Барковский Е.В., Бокунь 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. *Sovremennyye 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. [Maximovitch N.E. *Role oksida asota v patogeneze ishemitskikh I reperfusionnykh povrezhdeniy mosga*. Role of nitric oxide in the ischemic and reperfusion demedged to the brain. – Grodno, GrGMU. – 2004. – 180 p. (in Russian)]
3. 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*. Ukrainal biochemical journal. – 2003. – V.75, N4. – P. 101-107. (in Russian)]
4. Kozniewska E., Roberts T.P., Tsuura M., N sup G-Nitro-L-Arginine delays the development of brain injury during focal ischemia in rats // *Stroke*. – 1995. – V.26(2). – P. 282-288.
5. Maksimovich N.Ye. Tolerance of hypoxic hypoxia in rats with cerebral ischemia treated by NO-synthase modulators // *Hypoxia medical*. – 2004. – V.1-2. – P. 20-23.
6. Moncada S., Palmer R., Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology // *Pharmacological Review*. – 1991. – N43. – P. 109-142.
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. 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.
9. Trifiletti R. R. Neuroprotective effects of NG-nitro-L-arginine in focal stroke in the 7-day old rat // *European Journal of Pharmacology*. – 1992. – V.21. – P. 197-198.

## 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

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