

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.441.577.112

3.3.3 Патологическая физиология

DOI: 10.37903/vsgma.2022.1.1

ВЛИЯНИЕ L-ТРИПТОФАНА НА СПЕКТР АМИНОКИСЛОТ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**© Разводовский Ю.Е.¹, Смирнов В.Ю.², Троян Э.И.², Дорошенко Е.М.²,
Переверзев В.А.³, Максимович Н.Е.², Семененя И.Н.¹**¹ГП «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, 80³Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 220116, Минск,
пр. Дзержинского, 83*Резюме*

Цель. Характеристика изменений пула аминокислот и биогенных аминов коры лобной и теменной доли обоих больших полушарий мозга крыс при введении L-триптофана на фоне субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ).

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-триптофан (в дозе 100 мг/кг массы тела) вводили внутривенно непосредственно перед перевязкой общих сонных артерий. Содержание аминокислот и их дериватов в хлорнокислых гомогенатах тканей определяли методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Результаты. СИГМ вызвала снижение в коре больших полушарий уровней глутамата, аспарагина, тирозина, триптофана, орнитина, лизина и 1-метилгистидина. Введение триптофана при СИГМ повышало уровни треонина, триптофана, серина, лейцина, валина, глутатиона, фосфоэтанолamina, α-аминоадипиновой и α-аминомасляной кислот, а также снижало концентрации цитруллина, аргинина, аланина, гистидина, 1-метилгистидина, этаноламина. Кроме того, введение триптофана нормализовало суммарный пул аминокислот, а также пулы незаменимых, гликогенных, нейротрансмиттерных аминокислот.

Заключение. СИГМ индуцирует аминокислотный дисбаланс в коре больших полушарий, который выражается в снижении уровней ряда аминокислот, в том числе триптофана. Введение L-триптофана препятствует снижению уровня некоторых аминокислот, в том числе триптофана, а также нормализует ряд интегральных показателей аминокислотного фонда коры больших полушарий головного мозга.

Ключевые слова: аминокислоты, кора больших полушарий, субтотальная ишемия головного мозга, L-триптофан

THE EFFECT OF L-TRYPTOPHAN ON THE SPECTRUM OF FREE AMINO ACIDS IN THE BRAINCORTEX OF RATS UNDERGOING CEREBRAL ISCHEMIA**Razvodovsky Y.E.¹, Smirnov V.Y.², Troyan E.I.², Doroshenko E.M.², Pereverzev V.A.³,
Maksimovich N.Ye.², Semenenya I.N.¹**¹Institute biochemistry of biologically active substances Academy of science of Belarus, 50, St. Boulevard of Lenin's
komsomol, 230009, Grodno, Republic of Belarus²Grodno State Medical University, 80, St. Gorky, 230009, Grodno, Republic of Belarus³Belarusian State Medical University, 83, Dzerzhinsky Av., 220116, Minsk, Republic of Belarus

Abstract

Objective. Characteristics of changes in the pool of amino acids in the cortex of the frontal and parietal lobes of both cerebral hemispheres of rats after administration of L-tryptophan against the background of subtotal cerebral ischemia (SCI).

Methods. The experiment was carried out on 18 white outbred female rats. SCI was simulated in 12 rats by ligation of both common carotid arteries for one hour. L-tryptophan (at a dose of 100 mg/kg body weight) was injected intravenously just before ligation of the common carotid arteries. The content of amino acids and their derivatives in perchloric acid homogenates of tissues was determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results. SCI caused a decrease in the cerebral cortex levels of glutamate, asparagine, tyrosine, tryptophan, ornithine, lysine and 1-methylhistidine. The administration of tryptophan during SCI increased the levels of threonine, tryptophan, serine, leucine, valine, glutathione, phosphoethanolamine, α -amino adipic and α -aminobutyric acids, and also decreased the concentrations of citrulline, arginine, alanine, histidine, 1-methylhistidine. In addition, the administration of tryptophan normalized the total pool of amino acids, as well as the pools of essential, glycolytic, neurotransmitter amino acids.

Conclusions. SCI induces an amino acid imbalance in the cerebral cortex, which results in decreased levels of a number of amino acids, including tryptophan. The introduction of L-tryptophan prevents a decrease in the level of certain amino acids, including tryptophan, and also normalizes a number of integral indicators of the amino acid fund of the cerebral hemispheres.

Keywords: amino acids, biogenic amines, brain cortex, subtotal cerebral ischemia, L-tryptophan

Введение

Актуальным направлением экспериментальных исследований является поиск нейропротекторных средств, улучшающих восстановление нервных клеток, поврежденных ишемией-реперфузией, среди биологически активных соединений и естественных метаболитов [2-4, 10]. Как известно, аминокислоты и их производные (в частности, биогенные амины) играют важную роль в функционировании головного мозга, как в норме, так и при патологии, участвуя в биосинтезе мембранных белков, сигнальных молекул и регуляторных пептидов [5]. Поэтому развитие дисбаланса фонда аминокислот в головном мозге может стать причиной возникновения различных нервно-психических расстройств [6, 7]. Незаменимая аминокислота L-триптофан является предшественником нейромедиатора серотонина, участвующего в регуляции различных процессов, происходящих в центральной нервной системе [8,9]. Известно, что уровень серотонина в головном мозге находится в прямой зависимости от содержания триптофана в плазме крови [11].

В предыдущих исследованиях была показана прогностическая значимость изменения уровня триптофана в плазме крови у больных с острым ишемическим инсультом [8]. Было установлено, что уровень триптофана в плазме пациентов с ишемическим инсультом ниже, по сравнению с контролем [8]. Низкий уровень триптофана в плазме снижает его биодоступность в головном мозге, что может стать причиной снижения синтеза серотонина, нарушение обмена которого имеет отношение к патогенезу ишемического поражения головного мозга [7].

Целью исследования была характеристика изменений пула аминокислот и биогенных аминов коры лобной и теменной доли левого и правого больших полушарий мозга крыс при введении L-триптофана на фоне СИГМ.

Методика

Эксперименты выполнены на 18 белых беспородных крысах-самках (по 6 животных в каждой группе), массой 180-220 г. СИГМ моделировали путём перевязки обеих сонных артерий в течение одного часа. L-триптофан (в дозе 100 мг/кг массы тела) вводили внутривенно 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 извлечения головного мозга осуществляли изъятие фрагментов лобной и теменной долей коры левого и правого больших полушарий с его последующим замораживанием в жидком азоте. Подготовка пробы для исследования включала гомогенизацию в 10-ти кратном объеме 0,2M хлорной кислоты, центрифугирование в течение 15 мин. при 13 000 g при 4°C с последующим отбором супернатанта.

Спектр определяемых соединений включал протеиногенные аминокислоты, орнитин, цитруллин, ряд родственных соединений (таурин, α -аминобутират и др. 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. Использовалась колонка Zorbax Eclipse Plus C18, 3,5 мкм, 2,1×150 мм, Идентификацию и количественный анализ производили в программе Agilent ChemStation B.04.01 [1], калибровка метода осуществлялась с применением концентрата стандартной смеси аминокислот фирмы «Sigma-Aldridge». Используемые подвижные фазы: 0,1M 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 °С. 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.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы R. Для оценки влияния факторов применялся параметрический дисперсионный анализ с апостериорным сравнением по Тьюки. В случае нарушения однородности дисперсий дисперсионный анализ выполнялся в модификации Уэлча с апостериорным сравнением по Геймс-Хоувелл. При отсутствии нормальности распределения показателей использовался непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с поправкой Беньямини-Хохберга на множественность сравнений. 95% доверительные интервалы получены методом непараметрического бутстрэпа (R=500).

Результаты исследования и их обсуждение

Существенной межполушарной асимметрии, а также межрегиональных различий в содержании свободных аминокислот, как в контрольной, так и в опытных группах обнаружено не было (рис.).

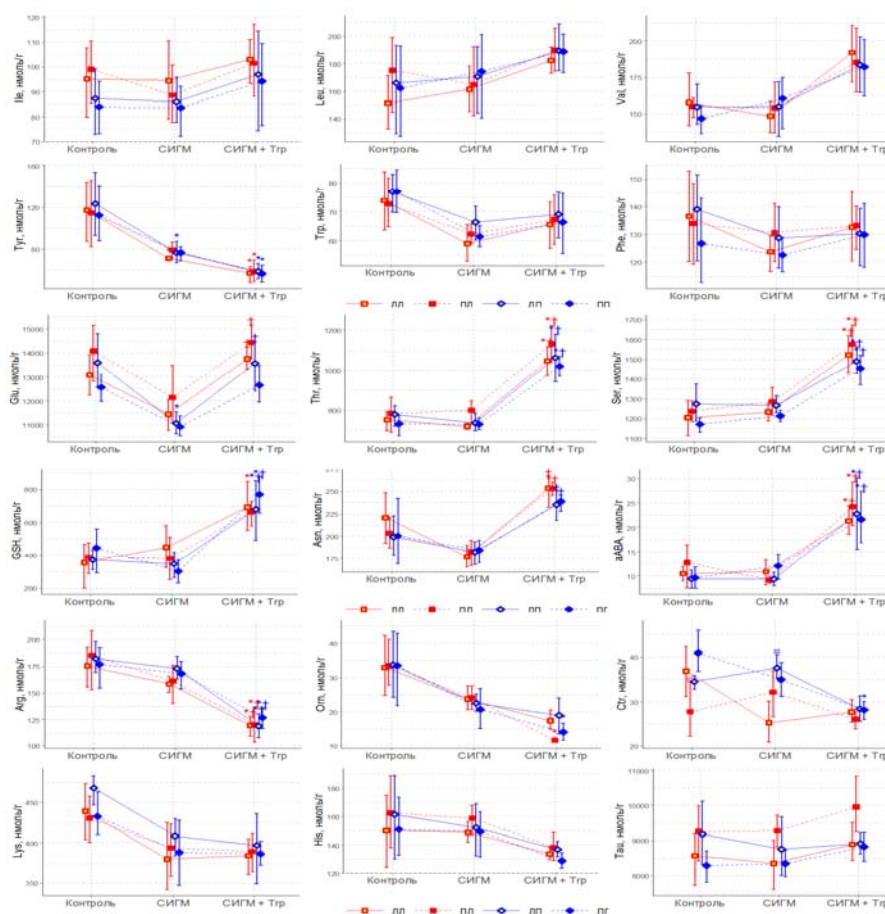


Рис. Концентрация свободных аминокислот и родственных соединений в различных зонах коры больших полушарий крыс при СИГМ на фоне введения L-триптофана (показатели представлены в виде среднего и 95% доверительного интервала). ЛЛ/ЛП – Лобная левая / правая доля. ПЛ/ПП – Pariетальная левая / правая доля

Поэтому концентрации изучаемых показателей были объединены в один массив данных (табл. 1). СИГМ вызвала снижение в коре больших полушарий уровней глутамата, аспарагина, тирозина, триптофана, орнитина, лизина и 1-метилгистидина. Понижалось также и содержание суммарного пула аминокислот, причём наиболее существенное снижение наблюдалось для его заменимых компонентов (табл. 2).

Анализ изменений других интегральных показателей аминокислотного пула свидетельствует об обеднении пулов гликогенных, нейротрансммиттерных и возбуждающих аминокислот. Снижение уровней ароматических аминокислот (ААК) при неизменном уровне АРУЦ обусловило повышение соотношения АРУЦ/ААК.

Таблица 1. Концентрация свободных аминокислот и родственных соединений в коре больших полушарий крыс при СИГМ на фоне введения L-триптофана, нмоль/г

Свободные аминокислоты	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-триптофан
GSH	390±38,1	370±37,9	702±45,5*†
Glu	13333±340	11392±275*	13604±297†
Asn	206±9,41	182±4,59*	245±4,67*†
Ser	1222±26,7	1249±17,7	1511±29,9*†
α-AAA	46,6±1,65	41,8±1,39	52,9±1,65*†
His	156±8,47	152±4,6	134±2,3*
PEA	2080±94,6	2158±103	2543±126*†
Thr	763±21,1	747±15,5	1065±31,7*†
1-MHis	20,9±1,86	16,2±0,945	13,8±0,574*
Ctr	35,1±1,97	32,5±1,76	27,6±0,804*†
Arg	180±6,33	165±4,48	121±4,26*†
Ala	1937±113	1818±81,9	1605±56,2*
GABA	4017±195	3491±180	2783±104*†
Tyr	117±9,52	76±2,49*	58,1±2,82*†
α-ABA	10,6±1	10,4±0,802	22,5±1,78*†
EA	1550±79,6	1775±96,7	1341±23,1†
Val	154±4,58	154±5,59	186±6,89*†
Trp	75,1±2,87	62,3±1,77*	67,1±3,21
Leu	164±10,1	168±8,43	188±4,67*
Orn	33,4±3,3	22,8±1,4*	15,5±1,2*†
Lys	443±10,5	393±12*	389±8,45*

Примечания: p<0,05 при сравнении с группами: * – контроль; † – СИГМ

Введение триптофана при СИГМ предотвращало снижение уровня этой аминокислоты в коре больших полушарий головного мозга (табл. 1). Кроме того, введение триптофана повышало уровни треонина, серина, лейцина, валина и родственных соединений – глутатиона, фосфоэтанолamina, α-аминоадипиновой и α-аминомасляной кислот, а также снижало концентрации цитруллина, аргинина, аланина, гистидина, 1-метилгистидина, ГАМК и этаноламина. Введение триптофана также предотвращало снижение уровней глутамата и аспарагина при СИГМ (уровень последнего повышался даже выше контрольных значений). В то же время, триптофан не оказывал влияния на уровни тирозина, орнитина и лизина – аминокислот, содержание которых снижалось при СИГМ. Снижение уровня лизина, предшественника α-аминоадипиновой кислоты, а также рост уровня последней может свидетельствовать об активации катаболизма лизина.

Среди интегральных показателей аминокислотного фонда следует отметить нормализацию пулов незаменимых, гликогенных, нейротрансммиттерных, возбуждающих аминокислот, а также суммарного пула аминокислот. Триптофан вызывал повышение суммарного содержания АРУЦ, обусловленное, в первую очередь, ростом концентрации валина. Нормализация пула незаменимых и рост содержания заменимых аминокислот объясняет снижение соотношения заменимых и незаменимых компонентов аминокислотного пула. В целом введение триптофана сдвигает баланс возбуждающих и тормозных аминокислот-трансммиттеров в сторону первых.

Снижение уровня триптофана в коре больших полушарий на фоне СИГМ хорошо согласуется с данными о его снижении в плазме крови [8]. Уменьшение биодоступности триптофана в мозге в острой фазе ишемического инсульта может являться одной из причин снижения синтеза серотонина. Провоспалительная реакция в ответ на острую ишемию является другой возможной причиной снижения скорости синтеза серотонина [7]. Показано, что нейропротекторный потенциал противовоспалительного цитокина IL-10 реализуется посредством повышения биодоступности триптофана для синтеза серотонина [8].

Таблица 2. Интегральные показатели аминокислотного фонда коры больших полушарий крыс (нмоль/г) и их соотношения при СИГМ

Показатели аминокислотного фонда	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-триптофан
ААК	326±16,6	265±6,01*	257±7,48*
АРУЦ	409±17,7	410±16,7	472±15,5*†
Заменимые	29905±592	27269±535*	29874±435†
Незаменимые	2078±55,4	1989±40,6	2350±38,3*†
Гликогенные	31139±611	28509±549*	31413±444†
Кетогенные	606±16,8	560±16	577±10,9
Нейротрансмиттерные	32656±644	29832±538*	32277±529†
Возбуждающие	18380±367	16325±338*	18945±363†
Тормозные	14276±421	13508±356	13332±292
АРУЦ/ААК	1,29±0,0617	1,55±0,0529*	1,86±0,064*†
Заменимые/незаменимые	14,5±0,307	13,7±0,219	12,8±0,223*†
Гликогенные/кетогенные	51,9±1,37	51,4±1,2	54,7±1,01
Возбуждающие/тормозные	1,3±0,0397	1,22±0,0343	1,43±0,037*†
Суммарный пул АК	45142±931	41729±740*	44402±620†

Выводы

1. Субтотальная ишемия головного мозга индуцирует аминокислотный дисбаланс в коре больших полушарий, который выражается в снижении уровней ряда аминокислот, в том числе триптофана.
2. Введение L-триптофана препятствует снижению уровня некоторых аминокислот, в том числе триптофана, а также нормализует ряд интегральных показателей аминокислотного фонда коры больших полушарий головного мозга.
3. Существенной межполушарной асимметрии, а также межрегиональных различий в содержании свободных аминокислот как в контрольной, так и в опытных группах обнаружено не было.

Литература (references)

1. Барковский Е.В., Бокун 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 Ireperfusionnykh povrezdeniy mosga*. Role of nitric oxide in the ischemic and reperfusion demedge 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. i dr. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy medicinscoy akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2019. – V.18, N1. – P. 5-9. (in Russian)]

4. Разводовский Ю.Е., Смирнов В.Ю., Переверзев В.А. и др. Влияние L-аргинина и блокатора синтеза монооксида азота L-NAME на спектр аминокислот плазмы крови крыс при субтотальной ишемии головного мозга. // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2019. – Т.18, №4. – С. 5-10. [Razvodovsky Y.E., Smirnov V.Y., Pereversev V.A. i dr. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2019. – V.18, N4. – P. 5-10. (in Russian)]
5. 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 biochimicheskiy zhurnal*. Ukrainian biochemical journal. – 2003. – V.75, N4. – P. 101-107. (in Russian)]
6. Brouns R. The role of tryptophan catabolism along the kynurenine pathway in acute ischemic stroke. // *Neurochemistry Research*. – 2010. – V.35, N.9. – P. 1315-1322.
7. Hajsł M., Hlavackova A., Broulikova K. et al. Tryptophan Metabolism, Inflammation, and Oxidative Stress in Patients with Neurovascular Disease // *Metabolites*. – 2020. – V.10, N208. – P. 2-19.
8. Mangge H., Stelzer I., Reininghaus E. et al. Disturbed Tryptophan Metabolism in Cardiovascular Disease // *Medicine Chemistry*. – 2014. – V.21, N17. – P. 1931-1937.
9. Ormstad H., Verkerk R., Aass C.H.D. et al. Inflammation-Induced Catabolism of Tryptophan and Tyrosine in Acute Ischemic Stroke // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2013. – N51. – P. 893-902
10. 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.
11. Roth W., Zadeh K., Vekariya R. et al. Tryptophan Metabolism and Gut-Brain Homeostasis // *International Journal of Molecular Science*. – 2021. – V.22, N2973. – P. 2-23.

Информация об авторах

Разводовский Юрий Евгеньевич – заведующий отделом медико-биологических проблем алкоголизма государственного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», Гродно, Республика Беларусь. E-mail: razvodovsky@tut.by

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

Троян Элина Ивановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова, УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: mne@grsmu.by

Дорошенко Евгений Михайлович – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник 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 им. Д.А. Маслакова, УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: mne@grsmu.by

Семененя Игорь Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, директор государственного предприятия «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», Гродно, Республика Беларусь. E-mail: insemenenya@yandex.by

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.