

Межполушарная асимметрия церебрального аминокислотного пула при субтотальной ишемии головного мозга крыс

Ю.Е. Разводовский, В.Ю. Смирнов, Э.И. Троян, Н.Е. Максимович

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Республика Беларусь

Патогенетические механизмы развития ишемического инсульта сложны и до конца не изучены, включая роль межполушарной асимметрии биохимической организации мозга.

Цель исследования: изучить содержание свободных аминокислот (АК) и их производных в коре больших полушарий головного мозга крыс при его субтотальной ишемии.

Материалы и методы. У 6 крыс опытной группы субтотальную ишемию головного мозга моделировали путем перевязки обеих сонных артерий в течение 2 ч. Контролем служили 6 ложнооперированных крыс. Анализ содержания АК и их производных проводили в хлорнокислом экстракте ткани методом обращенно-фазной хроматографии.

Результаты. Субтотальная ишемия головного мозга сопровождалась изменениями пула АК, характер которых в коре левого и правого полушарий был различным. В коре левой лобной доли больших полушарий снижались уровни глутамата, треонина, таурина, тирозина, триптофана и α -аминоадипиновой кислоты, а также повышался уровень орнитина. В коре правой лобной доли больших полушарий снижались уровни аспарагина, серина и фенилаланина.

Заключение. Характер изменений уровня АК в левом и правом отделах коры больших полушарий свидетельствуют о межполушарной асимметрии аминокислотного дисбаланса, развивающегося при ишемии головного мозга.

Ключевые слова: полушария мозга, субтотальная ишемия, аминокислоты, асимметрия.

Адрес для корреспонденции: 230009, Беларусь, Гродно, ул. Горького, д. 80. ГрГМУ. E-mail: razvodovsky@tut.by. Разводовский Ю.Е.

Для цитирования: Разводовский Ю.Е., Смирнов В.Ю., Троян Э.И., Максимович Н.Е. Межполушарная асимметрия церебрального аминокислотного пула при субтотальной ишемии головного мозга крыс. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2019; 13(2): 41–46.

DOI: 10.25692/ACEN.2019.2.5

Interhemispheric asymmetry of the cerebral amino acid pool in rat with subtotal cerebral ischaemia

Yury E. Razvodovsky, Vitaliy Yu. Smirnov, Elina I. Troyan, Natalya E. Maksimovich

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

The pathogenetic mechanisms of ischaemic stroke are complex and have not been fully studied, including the role of interhemispheric asymmetry in the brain's biochemical organization.

Study objective. To study the levels of free amino acids (AA) and their derivatives in the cerebral cortex of rats with subtotal cerebral ischaemia.

Materials and methods. Subtotal cerebral ischaemia was modelled in 6 rats in the experimental group by ligation of both carotid arteries for 2 hours. Six rats with sham surgeries served as the control. The levels of AA and their derivatives was analysed in perchlorate tissue extract using reversed-phase chromatography. **Results.** Subtotal cerebral ischaemia was accompanied by changes in the AA pool, with differences found between the cortex of the left and right hemispheres. Glutamate, threonine, taurine, tyrosine, tryptophan and α -aminoadipic acid levels decreased in the left frontal lobe cortex, and ornithine levels increased. Asparagine, serine and phenylalanine levels decreased in the right frontal lobe cortex.

Conclusion. The nature of changes in the AA levels in the left and right halves of the cerebral cortex indicates interhemispheric asymmetry of amino acid imbalance, which develops in cerebral ischaemia.

Keywords: cerebral hemispheres, subtotal ischaemia, amino acids, asymmetry.

For correspondence: 230009, Belarus, Grodno, Gor'kogo str., 80. Grodno State Medical University. E-mail: razvodovsky@tut.by. Razvodovsky Yu.E.

For citation: Razvodovsky Yu.E., Smirnov V.Yu., Troyan E.I., Maksimovich N.E. [Interhemispheric asymmetry of the cerebral amino acid pool in rat with subtotal cerebral ischaemia]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2019; 13(2): 41–46. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2019.2.5

Инсульт является одной из ведущих причин инвалидности и смертности во многих странах мира [1–4]. Патогенетические механизмы развития ишемического инсульта сложны и до конца не изучены. В патогенезе ишемического инсульта выделяют стадии биохимического каскада, включающие энергетический дефицит, глутаматную и аспартатную эксайтотоксичность, окислительный стресс, воспалительные реакции, апоптоз [5–8]. Неполное представление о патогенезе ишемических повреждений головного мозга не позволяет осуществлять эффективную терапию. Одним из направлений детализации механизмов развития повреждения головного мозга при его ишемии является изучение изменений аминокислотного пула различных отделов мозга [9, 10].

Аминокислоты (АК) 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, гормонов и регуляторных пептидов [7]. Они также выступают в качестве источника энергии через цикл трикарбоновых кислот и участвуют в образовании углеводов путем глюконеогенеза при их избытке [11]. До настоящего времени, однако, практически нет данных о межполушарной асимметрии АК-пула в норме и о ее возможной роли при развитии церебральной ишемии. Между тем изучение функциональной асимметрии при различных патологических процессах, в том числе асимметрии биохимической организации мозга, является актуальной задачей, поскольку может раскрыть закономерности течения заболеваний и выявить характерные признаки, улучшающие их диагностику.

Целью настоящего исследования явилось изучение пула свободных АК в коре левой (ЛЛД) и правой (ПЛД) лобных долей больших полушарий головного мозга крыс при его субтотальной ишемии.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 12 белых беспородных крысах-самках (по 6 животных в опытной и контрольной группах) массой 180–220 г. Контролировали температурный, световой и шумовой режимы. При выполнении экспериментов руководствовались принципами гуманного отношения к животным с соблюдением всех требований Директивы № 2010/63/EU от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей.

Крысам опытной группы моделировали субтотальную ишемию головного мозга путем перевязки обеих сонных артерий в течение 2 ч. Контрольную группу составили ложнооперированные животные. Все оперативные манипуляции проводили в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (60 мг/кг). После извлечения головного мозга осуществляли забор фрагментов коры ЛЛД и ПЛД больших полушарий, которые замораживали в жидком азоте. Выбор коры лобной области больших полушарий головного мозга в качестве объекта исследования обусловлен техническим удобством симметричного забора материала левого и правого полушарий.

Спектр определяемых соединений включал: протеиногенные АК, орнитин, цитруллин, а также ряд родственных соединений (таурин, оксипролин, α -аминобутират и этаноламин). Анализ АК и их дериватов проводили на хроматографе «Agilent 1100» методом обращенно-фазной хрома-

тографии с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой в Na-боратном буфере [12].

Для статистической обработки данных с помощью программы «StatSoft Statistica 10.0» применяли методы описательной статистики, двухфакторный дисперсионный анализ связанных выборок, метод Bonferroni программы R для нахождения наиболее значимых показателей.

Результаты и обсуждение

У контрольных животных не выявлено существенных различий в содержании АК в коре ЛЛД и ПЛД. Субтотальная ишемия головного мозга сопровождалась изменениями пула АК, характер которых в коре обоих полушарий был разным. В коре ЛЛД снижался уровень глутамата, треонина, таурина, тирозина, триптофана и α -аминоадипиновой кислоты (α AAA) и повышался уровень орнитина (рис. 1). Снижение уровней ароматических АК, как следствие, приводило к повышению соотношения АК с разветвленной углеводородной цепью и ароматических АК (табл. 1).

В коре ПЛД снижался уровень глутамата, аспарагина, серина, α AAA, треонина, таурина, фенилаланина, а также повышался уровень орнитина (рис. 2).

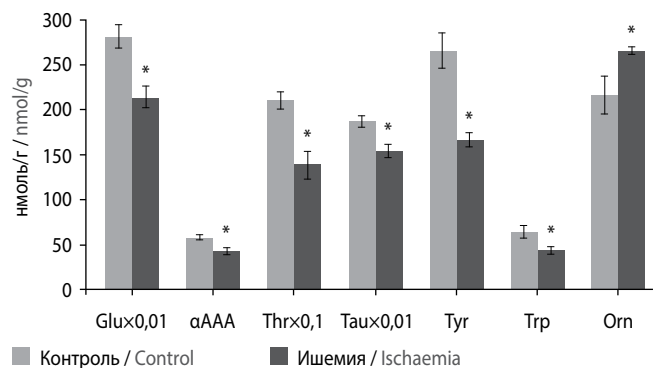


Рис. 1. Уровни свободных АК и их производных в коре ЛЛД крыс (мкмоль/г). Здесь и на рис. 2 приведены только показатели, уровни которых статистически значительно изменялись

Fig. 1. Levels of free AA and their derivatives in the left frontal lobe cortex of rats (μ mol/g) Here and in Fig. 2 only indicators whose levels were statistically significantly changed shown

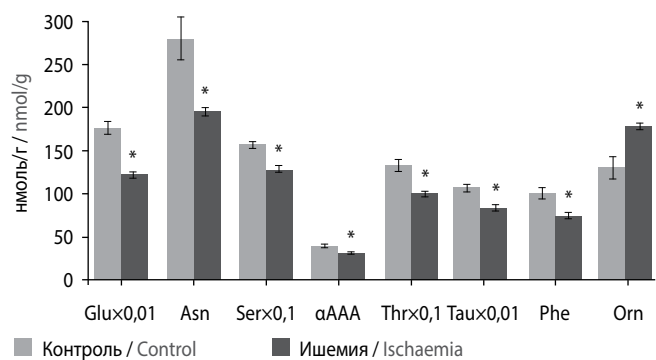


Рис. 2. Уровни свободных АК и их производных в коре правой лобной доли больших полушарий головного мозга крыс (мкмоль/г)

Fig. 2. Levels of free AA and their derivatives in the right frontal lobe cortex of rat cerebral hemispheres (μ mol/g)

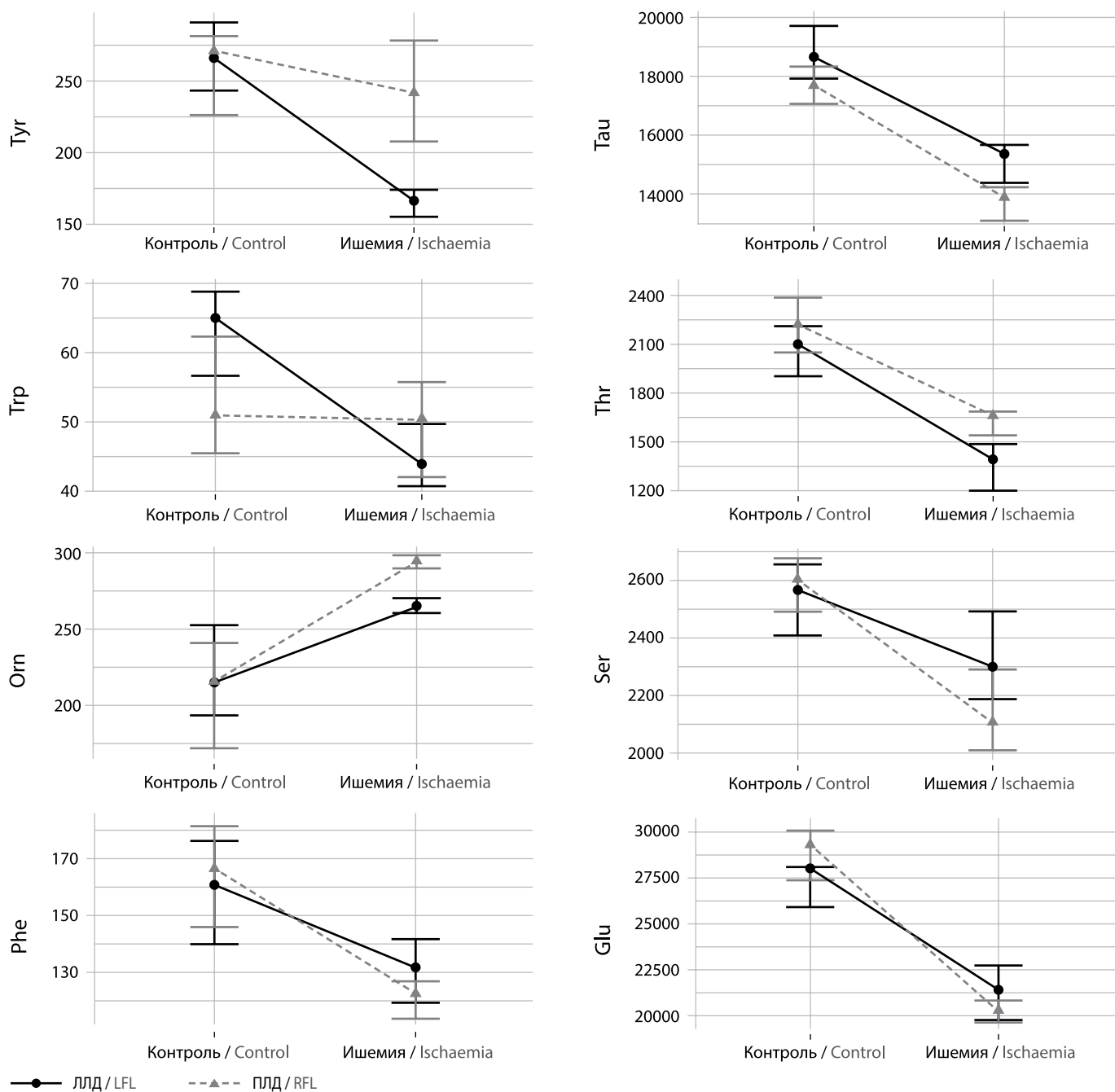


Рис. 3. Анализ взаимодействия факторов «сторона лобной доли» и «наличие/отсутствие ишемии». На графиках показаны средние (мкмоль/г) и 95% ДИ.

Fig. 3. Analysis of the interaction between the 'frontal lobe side' and 'presence/absence of ischaemia' factors. The graphs show the averages ($\mu\text{mol/g}$) and 95% CI

В обеих долях происходило обеднение суммарного пула АК (заменимых и незаменимых), при этом пул кетогенных АК оставался неизменным (табл. 1). В целом изменения интегральных показателей в коре обеих долей совпадали, различия касались только пулов ароматических АК: в ПЛД соотношение АК с разветвленной углеводородной цепью и ароматических АК не увеличивалось.

Нарушения пула АК затронули и уровни нейроактивных АК: в обеих долях снижалась концентрация возбуждающих

(аспартат, глутамат) и тормозных (таурин, глицин) нейротрансмиттерных АК, однако их соотношение не изменялось (табл. 1).

Анализ взаимодействия двух факторов (сторона больших полушарий и наличие/отсутствие ишемии) свидетельствует о различии влияния субтотальной ишемии на уровни тирозина, триптофана и орнитина в обеих долях. Уровень тирозина и триптофана изменялся только в ЛЛД, уровень орнитина повышался в коре обеих долей, однако в ПЛД это

Таблица 1. Интегральные показатели АК-пула коры ЛЛД и ПЛД головного мозга крыс при субтотальной ишемии (мкмоль/г)
Table 1. Integral indicators of the AA pool in the left frontal lobe and the right frontal lobe cortices of rats with subtotal ischaemia (µmol/g)

Показатель / Indicator	ЛЛД / Left frontal lobe		ПЛД / Right frontal lobe	
	контроль / control	ишемия / ischaemia	контроль / control	ишемия / ischaemia
Ароматические АК / Aromatic AA	491±30,5	342±15,2*	488±37,6	415±30,7
АК с разветвленной углеводородной цепью / AA with a branched hydrocarbon chain	821±56,9	839±43,6	814±69,2	853±54,1
Заменимые АК / Non-essential AA	52 800±1560	45 500±1130*	54 200±1340	44600±1170*
Незаменимые АК / Essential AA	3900±92,9	3250±214*	4010±110	3570±164*
Гликогенные АК / Glycogenic AA	55500±1630	47600±1120*	56 900±1330	46 900±1210*
Кетогенные АК / Ketogenic AA	799±29,8	915±65,1	842±38,2	952±93,4
Нейротрансмиттерные АК / Neurotransmitter AA	62 500±1820	50 100±1750*	62 000±2590	48 200±1070*
Возбуждающие АК / Excitatory AA	34 300±1590	27 700±978*	35 900±1470	27 200±1100*
Тормозные АК / Inhibitory AA	28 200±2360	22 400±1020*	26 100±1870	21 000±1080*
Соотношение АК с разветвленной углеводородной цепью и ароматических АК / Ratio of AA with a branched hydrocarbon chain and aromatic AA	1,71±0,136	2,48±0,177*	1,73±0,177	2,11±0,205
Заменимые/незаменимые АК / Non-essential/essential AA	13,6±0,342	14,3±1,12	13,6±0,522	12,6±0,401*
Гликогенные/кетогенные АК / Glycogenic/ketogenic AA	70,4±4,34	53,3±4,96*	68,3±2,99	50,6±3,58*
Возбуждающие/тормозные АК / Excitatory/inhibitory AA	1,28±0,139	1,24±0,0493	1,41±0,0965	1,31±0,101
Суммарный пул АК / Total AA pool	83 600±2320	70 100±1550*	83 000±2590	68 300±1430*

Примечание. *p<0,05 по отношению к соответствующему контролю.
Note. *p<0.05 relative to the corresponding control.

повышение было статистически значимо выше, чем в ЛЛД (рис. 3). Уровни фенилаланина, таурина, серина, треонина и глутамата снижались однонаправленно в обеих долях мозга.

Для нахождения наиболее информативных показателей традиционно используются пошаговые процедуры. Однако такой подход зачастую зависит от выбора начальных условий поиска, что может приводить к неоднозначным результатам. Поэтому для решения этой задачи нами была применена процедура Boruta из пакета статистических программ R, алгоритм которой не зависит от начальных условий.

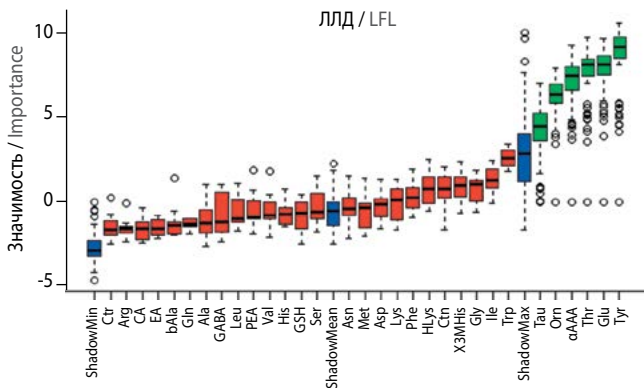
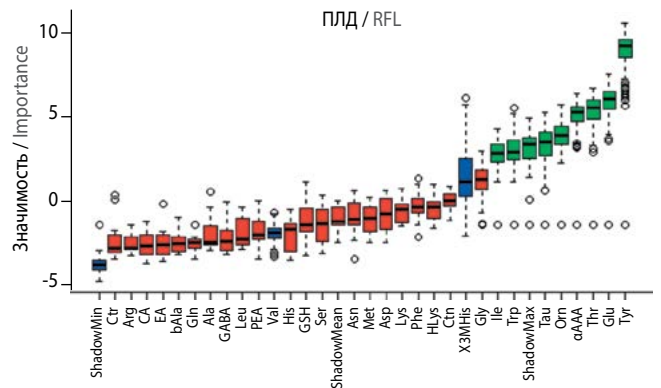


Рис. 4. Результаты применения алгоритма Boruta по отбору наиболее значимых показателей

Fig. 4. Results of Boruta algorithm application to select the most significant indicators

Результаты применения процедуры Boruta (рис. 4) показали, что наиболее значимыми показателями, характеризующими изменения АК-фонда коры ЛЛД при субтотальной ишемии головного мозга, являлись треонин, глутамат, орнитин, тирозин, αAAA и таурин. В ПЛД наиболее значимыми были треонин, аспарагин, глутамат, серин, орнитин, β-аланин, фенилаланин и таурин.

Развитие асимметрии пула свободных АК коры лобной доли больших полушарий подтверждается методом многомерного анализа. Линейный дискриминантный анализ показал увеличение на плоскости двух главных



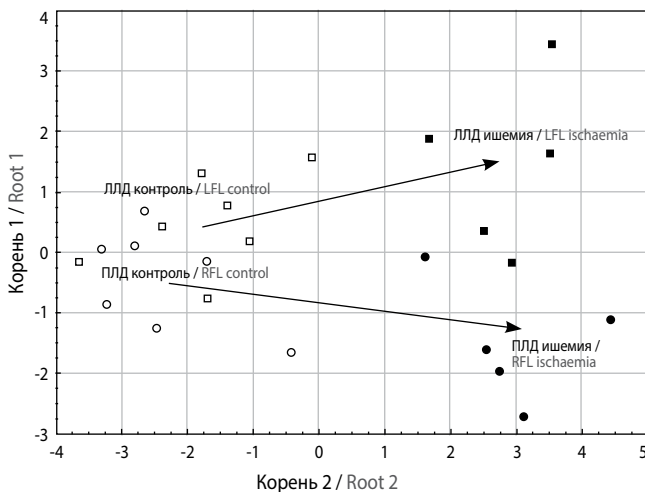


Рис. 5. Расположение групп на плоскости первых двух корней дискриминантной функции

Fig. 5. The position of the groups on the first two discriminant function roots plane

компонент расстояния между областями ПЛД и ЛЛД животных с ишемией (D^2 Махаланобиса = 8,8) по сравнению с таковым для контрольной группы (D^2 Махаланобиса = 2,3; рис. 5). Наибольший относительный вклад в значение 1-го корня дискриминантной функции вносили глутамат, треонин и триптофан, в значение 2-го корня — треонин и таурин (рис. 5). Анализ внутригрупповых коэффициентов корреляции переменных и стандартизованных канонических дискриминантных функций показал, что 1-й корень тесно связан с уровнем глутамата, а 2-й — тирозина (рис. 5). Можно предположить интерпретацию корней как «общее» (т.е. не зависящее от стороны лобной доли — 1-й корень) и «специфическое» (2-й корень) действие ишемии, поскольку именно сдвигом группы «ЛЛД ишемия» вдоль 2-го корня обусловлена асимметрия АК-пула коры головного мозга при ишемии. Поскольку на долю 1-го корня приходится более 83% общей дисперсии (что значительно превышает соответствующий показатель для 2-го корня — 14,3%), «асим-

Стандартизованные коэффициенты канонических дискриминантных функций

Standardized coefficients of canonical discriminant functions

	Корень 1 / Root 1	Корень 2 / Root 2	Корень 3 / Root 3
Glu	0,632	-0,545	-0,520
Thr	0,706	0,722	0,151
Tau	0,604	-0,636	0,199
Tyr	-0,150	1,217	-0,048
Trp	0,839	-0,408	0,792

Факторная структура

Factor structure

	Корень 1 / Root 1	Корень 2 / Root 2	Корень 3 / Root 3
Thr	0,454*	0,365	-0,326
Tau	0,406*	-0,301	0,023
Tyr	0,232	0,438*	0,156
Trp	0,167	0,012	0,843*
Glu	0,520	-0,032	-0,740*

метрия» АК-дисбаланса незначительна по сравнению с его выраженностью.

Таким образом, субтотальная ишемия головного мозга сопровождается выраженным дисбалансом АК-пула коры больших полушарий. Имеющиеся различия в характере изменений уровня АК в ЛЛД и ПЛД больших полушарий свидетельствуют о межполушарной асимметрии АК-дисбаланса при ишемии головного мозга. Полученные результаты подтверждают предвзятый характер не только из-за ограниченного количества животных, но и потому, что на основе данного материала трудно выдвинуть целостную гипотезу о различиях пула АК в правом и левом полушарии после субтотальной ишемии. В дальнейшем предполагается провести анализ возможных причин формирования асимметрии АК в полушариях, вызванной нарушением кровоснабжения мозга.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare that there is no conflict of interest.

Список литературы

1. Feigin V.L., Norrving B., Mensah G.A. Global burden of stroke. *Circ Res* 2017; 120: 439–448. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308413. PMID: 28154096.
2. Стаховская Л.В., Ключичина О.А., Богатырева М.Д., Коваленко В.В. Эпидемиология инсульта в России по результатам территориально-популяционного регистра (2009–2010). *Журнал неврологии и психиатрии* 2013; 5: 1–10.
3. Разводовский Ю.Е. Потребление алкоголя и смертности от инсульта в Беларуси. *Вопросы наркологии* 2009; 6: 82–92.
4. Razvodovsky Y.E. Alcohol-attributable fraction of stroke mortality in Russia. *J Neurol Sci* 2013; 333: e231. DOI: 10.1016/j.jns.2013.07.905
5. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М., 2001.
6. Максимович Н.Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга. Гродно, 2004.
7. Кулеш С.Д. Патогенез ишемического инсульта: Биохимические механизмы и роль нейроактивных аминокислот. *Медицинские новости* 1998; 1: 21–24.
8. Zablocka B., Domanska-Janik K. Enhancement of ^3H D-aspartate release during ischemia like conditions in rat hippocampal slices: source of excitatory amino acids. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1996; 56: 63–70. PMID: 8787212.
9. 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. *Int J Neurosci Behavior Sci* 2017; 1 (1): 18–21.
10. 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): 34–38.

References

1. Feigin V.L., Norrving B., Mensah G.A. Global burden of stroke. *Circ Res* 2017; 120: 439–448. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308413. PMID: 28154096.
2. Stakhovskaya L.V., Klutchichina O.A., Bogatyreva M.D., Kovalenko V.V. [Epidemiology of stroke in Russia according to results of territory-population register (2009–2010)]. *Zhurnal neurologii i psichiatrii* 2013; 5: 1–10. (In Russ.)
3. Razvodovsky Yu.E. [Alcohol consumption and stroke mortality in Belarus]. *Voprosy narcologii* 2009; 6: 82–92. (In Russ.)
4. Razvodovsky Y.E. Alcohol-attributable fraction of stroke mortality in Russia. *J Neurol Sci* 2013; 333: e231. DOI: 10.1016/j.jns.2013.07.905
5. Gusev E.I., Skvortsova V.I. [Ischemia of the brain]. Moscow, 2001. (In Russ.)
6. Maksimovich N.E. [Role of nitrogen oxide in the pathogenesis of ischemic reperfusion brain damage]. Grodno, 2004. (In Russ.)
7. Kulesh S.D. [Pathogenesis of ischemic stroke: biochemical mechanisms and role of neuroactive amino acids]. *Meditinskije novosti* 1998; 1: 21–24. (In Russ.)
8. Zablocka B., Domanska-Janik K. Enhancement of ^3H D-aspartate release during ischemia like conditions in rat hippocampal slices: source of excitatory amino acids. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1996; 56: 63–70. PMID: 8787212.
9. 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. *Int J Neurosci Behavior Sci* 2017; 1 (1): 18–21.
10. Skvortsova V.I., Raevskiy K.S., Kovalenko A.V. [Concentration of neurotransmitters amino acids in the spinal cord liquid in patients with acute ischemic stroke]. *Zhurnal neurologii i psichiatrii* 1999; 2: 34–38. (In Russ.)

11. Fernstrom J.D. Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr* 2005; (6 Suppl): 1539S–1546S. DOI: 10.1093/jn/135.6.1539S. PMID: 15930466.
12. Барковский Е.В., Бокунь С.Б., Бородинский А.Н. и др. *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. Минск, 2013.

Поступила 07.12.2018
Принята в печать 04.03.2019

11. Fernstrom J.D. Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr* 2005; (6 Suppl): 1539S–1546S. DOI: 10.1093/jn/135.6.1539S. PMID: 15930466.
12. Barcovskiy E.V., Bokun' S.B., Borodinskiy A.N. et al. [Contemporary problems of biochemistry. Methods of investigation]. Minsk, 2013. (In Russ.)

Received 07.12.2018
Accepted 04.03.2019

Информация об авторах: Разводовский Юрий Евгеньевич — ассистент каф. патологической физиологии им. Д.А. Маслакова ГрГМУ, Гродно, Беларусь;
Смирнов Виталий Юрьевич — к.б.н., с.н.с. научно-исследовательской лаборатории ГрГМУ, Гродно, Беларусь;
Троян Элина Ивановна — к.м.н., доц. каф. патологической физиологии им. Д.А. Маслакова ГрГМУ, Гродно, Беларусь;
Максимович Наталья Евгеньевна — д.м.н., проф., зав. каф. патологической физиологии им. Д.А. Маслакова ГрГМУ, Гродно, Беларусь.

Information about the authors: Yury E. Razvodovsky, assistant, D.A. Maslakov Department of pathophysiology, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus;
Vitalyi Yu. Smirnov, PhD (Biol.), senior researcher, Science and research laboratory, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus;
Elina I. Troyan, PhD (Med.), Assoc. Prof., D.A. Maslakov Department of pathophysiology, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus;
Natalya E. Maksimovich, D. Sci. (Med.), Prof., Head of D.A. Maslakov Department of pathophysiology, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus.