

ISSN 2225-6016

# ВЕСТНИК

*Смоленской государственной  
медицинской академии*

*Том 19, №3*

2020



**МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ****ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

УДК 616.441.577.112

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2020.3.1

**ВЛИЯНИЕ СОВМЕШНОГО ВВЕДЕНИЯ L-АРГИНИНА И N-НИТРО-L-АРГИНИНМЕТИЛОВОГО ЭФИРА НА ФОНД АМИНОКИСЛОТ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА****© Разводовский Ю.Е.<sup>1</sup>, Смирнов В.Ю.<sup>2</sup>, Дорошенко Е.М.<sup>2</sup>, Бонь Е.И.<sup>2</sup>, Переверзев В.А.<sup>3</sup>, Максимович Н.Е.<sup>2</sup>, Семененя И.Н.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси» 230009, Республика Беларусь, Гродно, ул. Бульвар ленинского комсомола, 50<sup>2</sup>УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, 230009, 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 биогенных аминов в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) на фоне совместного 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-NAME (в дозе 5 мг/кг) и L-аргинин (в дозе 100 мг/кг) 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 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. Совместное введение L-NAME и L-аргинина предотвращало нарушение уровней фенилаланина, гистидина, глутамина, α-аминобутирата, α-аминоадипиновой кислоты.

**Заключение.** Совместное введение L-NAME и L-аргинина частично нормализует нарушения в фонде аминокислот гиппокампа, вызванные СИГМ, а также оказывает нормализующий эффект на серотониновую систему.

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

**EFFECT OF COMBINED ADMINISTRATION OF L-ARGININE AND L-NAME ON THE SPECTRUM OF FREE AMINO ACIDS AND BIOGEN AMINES IN HYPPOCAMPUS OF RATS UNDERGOING SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA****Razvodovsky Yu.E.<sup>1</sup>, Smirnov V.Yu.<sup>2</sup>, Doroshenko E.M.<sup>2</sup>, Bon E.I.<sup>2</sup>, Pereverzev V.A.<sup>3</sup>, Maksimovich N.E.<sup>2</sup>, Semenenya I.N.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Institute biochemistry of biologically active substances Academy of science of Belarus, 50, Boulevard of Lenin's komsomol St., 230009, Grodno, Republic of Belarus<sup>2</sup>Grodno State Medical University, 80, Gor'kogo St., 230009, Grodno, Republic of Belarus<sup>3</sup>Belarusian State Medical University, 83, Dzerzhinsky 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-arginine and L-NAME.

**Methods.** The experiment was held on 18 rats: 12 animals were undergoing bilateral filament occlusion of carotid arteries, in 6 cases L-arginine and L-NAME was administrated. The analyses of free amino acids and their derivatives levels in 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-arginine and L-NAME partially prevented the imbalance of the amino acids pool, caused by SCI, by preventing the changes in the levels of phenylalanine, histidine, glutamate,  $\alpha$ -aminobutyrate,  $\alpha$ -amino adipic acid.

**Conclusions.** Preventive injection of L-arginine and L-NAME alleviates the imbalance in the pool of free amino acids and biogenic amines in hippocampus caused by SCI, and normalizes the serotonin system.

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

### Введение

Ишемический инсульт является ведущей причиной инвалидности и смертности в развитых странах мира [9, 11]. В связи со старением населения, прогнозируется рост бремени экономических потерь, связанных с данной патологией [9]. Актуальной задачей является повышение эффективности терапии инсульта посредством использования биологически активных соединений и естественных метаболитов. Перспективными в этом плане представляются аминокислоты и их производные, которые играют важную роль в функционировании нервной ткани [3, 5, 12].

Аминокислота L-аргинин играет важную роль в метаболических процессах, в том числе является предшественником монооксида азота (NO), участвующего в регуляции сосудистого тонуса [1]. Имеются экспериментальные и клинические подтверждения биологической активности L-аргинина при различных патологических состояниях, в том числе при ишемическом инсульте [1, 3, 4]. В одном из исследований было показано, что включение L-аргинина в стандартную терапию больных с ишемическим инсультом оказывает положительное влияние на течение заболевания, ускоряет восстановление двигательных функций и способствует снижению спастического мышечного тонуса [8].

Накопленные данные указывают на важную роль NO в патогенезе ишемического инсульта [4, 10]. Применение неселективных ингибиторов NO синтазы при ишемическом повреждении мозга оказывало нейропротекторный эффект [1]. В одном из исследований было показано, что однократное введение ингибитора NO синтазы L-NAME вызывало защитный эффект на модели фокальной ишемии мозга у крыс, проявлявшийся в уменьшении зоны инфаркта [14].

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

### 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 (в дозе 5 мг/кг) и L-аргинином (в дозе 100 мг/кг) вводили внутривенно непосредственно перед перевязкой общих сонных артерий. Контрольную группу составили ложноперированные 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 [13].

Спектр определяемых соединений включал протеиногенные аминокислоты, орнитин, цитруллин, ряд родственных соединений (таурин,  $\alpha$ -аминобутират и др.) и биогенные амины. Анализ проводился на хроматографе Agilent 1100 методом обращенно-фазной хроматографии с предколоночной дериватизацией *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой в Na-боратном буфере. Детектирование фотометрическое на длине волны 338 нм (определение АК) и флуорометрическое (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 B.04.01 [7], 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°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 [2].

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 ГМ вызвала через 1 сут. в гиппокампе крыс повышение уровней фенилаланина, гистидина, глутамина,  $\alpha$ -аминобутирата ( $\alpha$ -АВА), аминокислот с разветвлённой углеводородной цепью (АРУЦ) и снижение уровней треонина, тирозина, лизина и  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты ( $\alpha$ -ААА) (рис. 1).

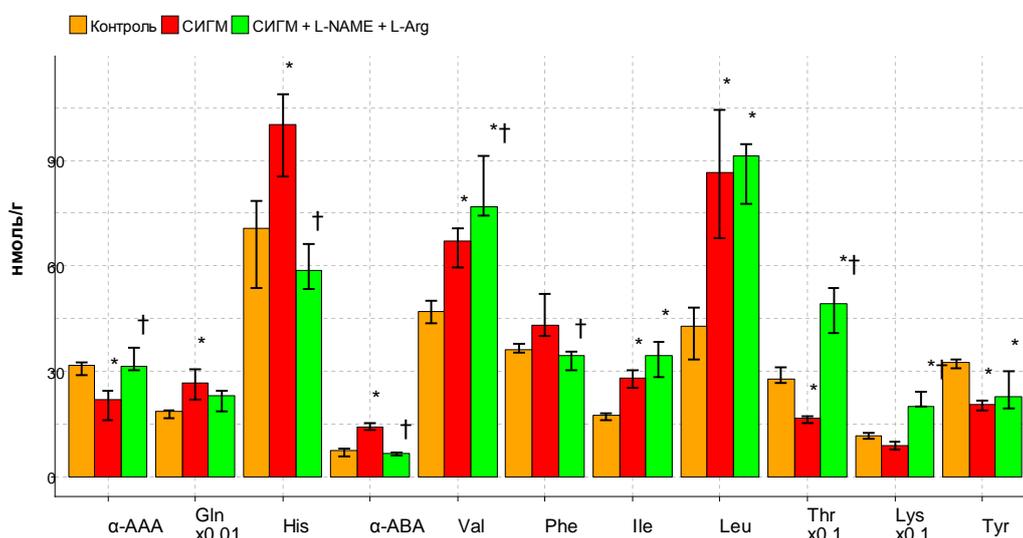


Рис. 1. Концентрация аминокислот и их производных в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии ГМ на фоне введения L-NAME и L-Arg. \* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю, † –  $p < 0,05$  по отношению к СИГМ

Изменения концентраций АРУЦ и ароматических аминокислот (ААК) вызвало повышение соотношения АРУЦ/ААК (рис. 2). Как известно, ГМ является одним из мест катаболизма АРУЦ с образованием соответствующих  $\alpha$ -кетокислот и образующихся при их катаболизме ацил-КоА [12]. Повышение уровней АРУЦ может быть следствием патологии первого этапа – трансаминирования

с  $\alpha$ -кетоглутаратом под действием аминотрансферазы, что может явиться причиной нарушения функции мозга при ишемии, либо изменениями в системе транспорта аминокислот в мозг.

Субтотальная ишемия ГМ не вызвала значительных изменений пула биогенных аминов гиппокампа, кроме роста уровня DOPA (диоксифенилаланин) (рис. 2). Однако с помощью статистического анализа было установлено ослабление корреляций серотонин – 5-Н1АА (5-оксииндолацетат), тирозин – DOPA и тирозин – DOPAC (диоксифенилацетат), что может свидетельствовать о функциональных нарушениях серотониновой и дофаминовой систем при ишемии (табл.).

Совместное введение L-NAME и L-аргинина предотвращало нарушение при СИГМ уровней фенилаланина, гистидина, глутамина,  $\alpha$ -аминобутирата,  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты (рис. 1). С другой стороны, сохранялось повышение концентраций АРУЦ (рост уровня валина оказался даже больше при введении композиции) и понижение – уровня тирозина. Введение L-NAME и L-аргинина также способствовало повышению уровней треонина и лизина. Повышение уровня аргинина в гиппокампе не зарегистрировано, несмотря на рост его концентрации в крови [6].

Введение комбинации L-NAME и L-аргинина не вызывало значительных изменений пула биогенных аминов гиппокампа. Так, рост уровня DOPA, индуцированный ишемией, сохранялся, одновременно повышалась концентрация серотонина (рис. 2).

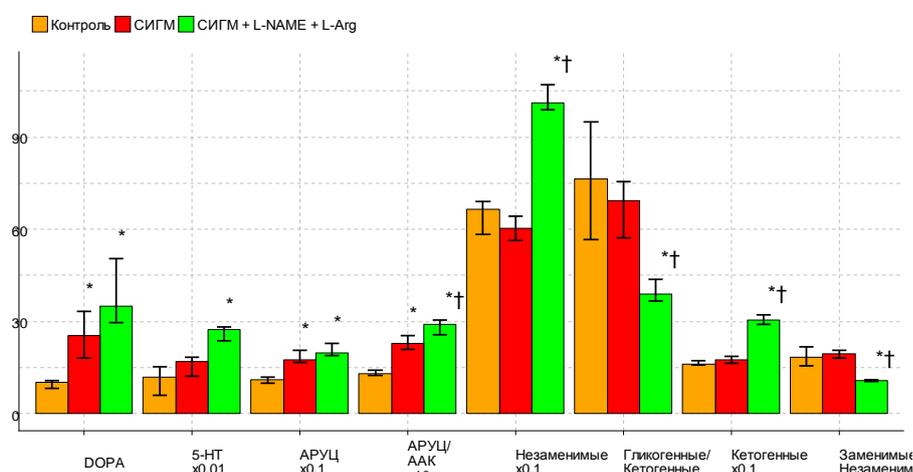


Рис. 2. Концентрация биогенных аминов (пмоль/г), интегральные показатели аминокислотного фонда гиппокампа крыс (нмоль/г) и их соотношения при СИГМ. \* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю, † –  $p < 0,05$  по отношению к СИГМ

Несмотря на повышение последнего, можно предположить нормализующий эффект на серотониновую систему гиппокампа вследствие восстановления в нем нормальной корреляции между серотонином и 5-Н1АА (табл.). В то же время, нарушение в дофаминовой системе сохранялось (табл.).

Таблица. Коэффициенты корреляций между уровнями биогенных аминов

Биогенные амины	Контроль	СИГМ	СИГМ + L-NAME + L-Arg
5-НТ – 5-Н1АА	0,984*	-0,148	0,923*
5-НТР – 5-Н1АА	-0,273	-0,862*	0,175
Тур – DOPA	-0,700	0,209	0,263
Тур – DOPAC	0,703	-0,286	0,148

Примечание: \* – статистически значимые корреляции ( $p < 0,05$ )

Все эти изменения отразились на величинах интегральных показателей аминокислотного фонда гиппокампа (рис. 2). Так, введение L-NAME и L-аргинина повышало суммарное содержание незаменимых и кетогенных компонентов АК пула (и, как следствие, их долю в этом пуле) и соотношение АРУЦ/ААК.

Наиболее значимыми показателями в дискриминации групп являлись валин ( $F_{\text{искл}}=15,7$ ), тирозин ( $F_{\text{искл}} = 9,63$ ), а также  $\alpha$ -АВА, ДОФА и треонин ( $F_{\text{искл}} = 6,85; 6,49$  и  $6,32$  соответственно). При этом наборе предикторов достигалась высокодостоверная дискриминация между группами (Лямбда Уилкса =  $0,0036$ ,  $F=34,7$ ,  $p<10^{-10}$ ). На рис. 3 представлено соответствующее расположение канонических значений содержания аминокислот и векторов стандартизированных канонических переменных в 3-х рассматриваемых группах (контроль; СИГМ; СИГМ + L-NAME + L-Arg) на плоскости 2-х главных компонент.

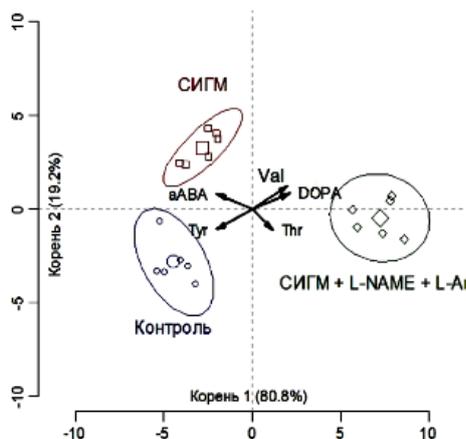


Рис. 3. Расположение канонических значений и векторов стандартизированных канонических переменных на плоскости 2-х главных компонент

Результаты настоящего исследования указывают на то, что аминокислотный дисбаланс играет существенную роль в патогенезе ишемического повреждения головного мозга. Данные о повышении уровня АРУЦ в гиппокампе при ишемии, полученные в ходе настоящего исследования, воспроизводят полученные ранее данные о повышении уровня этих аминокислот в коре головного мозга [5], что позволяет считать данный сдвиг в фонде аминокислот биохимическим маркером ишемического повреждения головного мозга.

## Выводы

1. Субтотальная ишемия головного мозга крыс индуцирует нарушение уровней ряда аминокислот и их производных в гиппокампе крыс (в том числе фенилаланина, гистидина, глутамина, тирозина, АРУЦ), а также нарушение активности серотониновой и дофаминовой систем.
2. Совместное введение L-NAME и L-аргинина частично нормализует нарушения в фонде аминокислот гиппокампа, вызванные СИГМ, предотвращая изменения уровней фенилаланина, гистидина, глутамина,  $\alpha$ -аминобутирата,  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты, а также оказывает нормализующий эффект на серотониновую систему.

## Литература (references)

1. Алмакаева Л.Г., Литвинова Е.В. Аргинин и его применение в медицине и фармации // Ліки України. – 2011. – №1. – С. 23-26. [Almakaeva L.G., Litvinova E.V. *Liki Ukraini. The drugs of Ukraine.* – 2011. – N1. – P. 23-26. (in Russian)]
2. Барковский Е.В. Бокуть С.Б., Бородинский А.Н. и др. Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 491 с. [Barkovskiy E.V., Bokun S., Borodinskiy A.N., i dr. *Sovremennye problemy biochimii. Metody issledovania.* The contemporary problems of biochemistry. Methods of investigation. – Minsk: Highest school, 2013. – 491 p. (in Russian)]
3. Бородинский А.Н., Разводовский Ю.Е. Аминокислоты как скэвенджеры свободных радикалов. – LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbruchen, 2013. – 57 с. [Borodinskiy A.N., Razvodovskiy Y.E. *Aminokisloty kak skevendzhery svobodnykh radikalov.* Aminoacids as the scavengers of free radicals. – LAP LAMBERT Academic Publishing. Saarbruchen, 2013. – 57 p. (in Russian)]
4. 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 ishemitskikh Ireperfusionnykh povrezdeniy mosga.* Role of nitric oxide in the ischemic and reperfusion demedge to the brain. – Grodno, GrGMU. – 2004. – 180 p. (in Russian)]

5. 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. [Razvodovsky Y.E., Troyan E.I., Doroshenko Ye.M. i dr. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Proceedings of the Smolensk State Medical Academy. – 2019. – V.18, N1. – P. 5-9. (in Russian)]
6. 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., Pereverzev V.A. i dr. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Proceedings of the Smolensk State Medical Academy. – 2019. – V.18, N4. – P. 5-10. (in Russian)]
7. 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 biokhimitseskiy zurnal*. Ukrainian biochemical journal. – 2003. – V.75, N4. – P. 101-107. (in Russian)]
8. Халимова Х.М., Рашидова Н.С. Опыт применения L-аргинина в лечении больных с ишемическим инсультом // Украинский химиотерапевтический журнал. – 2012. – №3. – С. 247-248. [Halimova H.M., Rashidova N.S. *Ukrainskiy himioterapevticheskiy zurnal*. Ukraine hemioterapeutical journal. – 2012. – N3. – P. 247-248. (in Russian)]
9. GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional and national burden of stroke, 1990-2016: a systemic analysis for the Global burden of disease stroke study 2016 // *Lancet Neurology*. – 2019. – N18. – P. 439-458.
10. 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.
11. Razvodovsky Y.E. Alcohol attributable fraction of stroke mortality in Russia. // *Journal of the Neurological Science*. – 2013. – V.33, N1. – P. 231.
12. 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.
13. 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.
14. Salter M., Duffy C., Garthwaite J., Stribos 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 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

*Дорошенко Евгений Михайлович* – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: vit\_sm@mail.ru

*Бонь Елизавета Игоревна* – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Беларусь. E-mail: asphodela@list.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