

МАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА В МОЗГЕ КРЫС КАК ВОЗМОЖНЫЕ МИШЕНИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ

Надольник Л.И., *Дорошенко Е.М., Чумаченко С.С.

*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, БЛК-50, lnadolnik@tut.by, *Гродненский государственный медицинский университет*

Хронический стресс рассматривается как один из факторов раннего старения мозга, что, согласно современной гипотезе, обусловлено нарушением функции митохондрий. Молекулярные механизмы биологической адаптации к стрессу сложны и остаются неизученными, отсутствуют данные о мишенях и маркерах хронического стресса в мозге. При гиперкортицизме снижается экспрессия белка BDNF и его рецептора TrkB в отделах лобной коры головного мозга и гиппокампа. Биогенные амины играют важную протективную роль в механизмах адаптации ЦНС к хроническому психоэмоциональному стрессу. Рецепторы нейротрансмиттеров, в том числе в аминергических системах, регулируют процессы нейрогенеза, причем экспрессия рецепторов регулируется нейроростовыми факторами. Для катехоламинов и серотонина известно, что изменения в содержании их предшественников – ароматических аминокислот – в крови могут оказывать влияние на их синтез и даже скорость деградации медиаторов в моноаминергических системах. Так называемый «прекурсорный контроль» может являться метаболическим обоснованием для применения препаратов аминокислот с целью достижения стимуляции соответствующей аминергической системы.

Цель работы: выявить маркеры хронического стресса в мозге крыс, исследуя метаболизм свободных аминокислот и биогенных аминов.

Материалы и методы исследования. Отделы головного мозга крыс Вистар препарировали на холоду и в течение не более 90 сек. фиксировали в жидком азоте. Для определения уровней свободных аминокислот и родственных соединений в отделах головного мозга и плазме крови использовался жидкостной хроматограф Agilent 1200 в конфигурации, включающей 4-канальную систему подачи растворителя с вакуумным дегазатором, термостатируемый автосамплер (ALS), термостат колонок, детектор флуоресценции. Разделение биогенных аминов и родственных соединений проводили с помощью ион-парной ВЭЖХ и детектированием по флуоресценции. Колонка 2,1x150 мм Zorbax Eclipse Plus C₁₈, 3,5 мкм (Agilent Technologies) термостатировалась при 28°C. Подвижная фаза: 0,1 М NaH₂PO₄, 0,034 М CH₃COOH, pH 3,65; 110 мг/л октансульфоната натрия, 50 мг/л ЭДТА, 4,5% (об.) ацетонитрила. Скорость потока 0,2 мл/мин. Детектирование по флуоресценции при длинах волн: возбуждения 280 нм, излучения – 340 нм.

Результаты. Исследование эффектов стресса проводились в трех отделах мозга крыс – больших полушариях, гиппокампе, гипоталамусе. После 30-суточного воздействия стресса в больших полушариях крыс (лобной доле) обнаружено повышение содержания триптофана (на 34,7%) (таблица 1), а также уровней тирозина (на 24,4%), дофамина (на 162,2%), метионина (на 22,9%) и серина (на 11,7%). Тенденция к общему обогащению пула свободных аминокислот не сопровождалась такими же сдвигами в уровнях свободных аминокислот в плазме крови. Наиболее значимые изменения выявлены в гиппокампе;

метаболизм свободных аминокислот и биогенных аминов в меньшей степени изменялся в больших полушариях и в наименьшей степени – в гипоталамусе.

Было обнаружено, что в гиппокампе крыс при стрессе повышался уровень триптофана (на 27,59%) (таблица 1). Кроме этого, повышались уровни метаболитов дофамина и серотонина – DOPAC и 5-НИАА, что может свидетельствовать о повышении функциональной активности (выброса медиатора) в соответствующих аминергических системах. В гиппокампе не наблюдалось обогащения пула свободных аминокислот при стрессе. Как и в больших полушариях, в гиппокампе при стрессе исчезала положительная корреляция уровней 5-НТР-5-НТ, имевшаяся в контроле; кроме этого, исчезала и корреляция 5-НТР-5-НИАА, также фиксировавшаяся в контрольной группе. Это может свидетельствовать о том, что и в этой структуре мозга имело место возрастание оборота медиатора (повышение уровня 5-НИАА), а также замедление декарбоксилирования 5-НТР.

Таблица 5. – Содержание свободных аминокислот, биогенных аминов и их метаболитов в гиппокампе крыс после кратковременного неизбежного стрессорного воздействия в течение 30 суток, нмоль/г ткани, среднее \pm средняя ошибка

Показатели	Контроль N=8	Стресс 20' x 30 сут n=8	Стресс + 24ч n=8
CA	7,24 \pm 1,187	8,32 \pm 1,426	6,37 \pm 1,0871
PSer	8,13 \pm 1,149	8,05 \pm 1,098	5,60 \pm 0,5905
CSA	11,66 \pm 1,204	13,34 \pm 1,619	9,67 \pm 1,6364
Asp	3783,44 \pm 250,939	3762,21 \pm 339,882	3888,02 \pm 193,5643
GSH	4828,58 \pm 321,997	5052,89 \pm 303,991	5260,50 \pm 100,9540
Glu	15567,25 \pm 1082,337	16259,85 \pm 1025,396	16796,75 \pm 439,0039
Asn	191,23 \pm 10,493	190,32 \pm 14,966	193,49 \pm 6,9384
Ser	1659,23 \pm 110,998	1543,42 \pm 100,355	1629,00 \pm 58,1888
aAAA	8,39 \pm 1,280	11,98 \pm 1,689	10,42 \pm 1,4308
Gln	9610,64 \pm 605,007	10092,71 \pm 682,589	10033,66 \pm 457,5939
His	163,44 \pm 14,239	131,89 \pm 10,336	142,54 \pm 9,4017
3MHis	3,57 \pm 0,717	3,52 \pm 0,823	3,21 \pm 0,5740
Gly	431,72 \pm 25,251	378,16 \pm 25,113	440,26 \pm 11,7188**
PEA	497,58 \pm 35,419	485,49 \pm 29,204	481,64 \pm 15,7506
Thr	898,64 \pm 89,086	1016,57 \pm 110,955	1018,51 \pm 66,6266
1MHis	4,73 \pm 0,476	4,70 \pm 0,553	4,18 \pm 0,4142
Ctrl	54,07 \pm 2,946	47,49 \pm 3,344	47,03 \pm 2,5003
Arg	146,09 \pm 11,842	133,41 \pm 12,759	124,91 \pm 6,0799
Ans	73,05 \pm 9,667	72,63 \pm 11,575	81,36 \pm 6,1789
bAla	8,67 \pm 1,081	12,52 \pm 4,470	11,56 \pm 0,7017*
Car	53,44 \pm 8,316	57,70 \pm 5,464	59,83 \pm 16,1577
Ala	966,81 \pm 64,107	977,93 \pm 72,164	1016,63 \pm 45,2948

Tau	6020,72 ± 408,809	5529,01 ± 296,701	6229,88 ± 276,8168
bABA	5,73 ± 1,652	4,19 ± 0,453	3,77 ± 0,4253
GABA	1821,82 ± 153,114	1831,29 ± 137,851	1906,43 ± 70,8719
aABA	11,44 ± 1,090	13,08 ± 0,875	12,85 ± 0,7469
EA	192,41 ± 14,010	183,49 ± 10,993	192,38 ± 6,4601
Val	174,36 ± 22,206	153,54 ± 10,701	153,75 ± 9,5723
Met	50,68 ± 4,162	54,82 ± 4,447	53,60 ± 3,5310
Ctn	28,26 ± 1,868	23,74 ± 2,055	29,84 ± 3,9610
Phe	176,33 ± 14,237	158,94 ± 9,724	155,51 ± 5,7801
Leu	110,51 ± 44,071	78,72 ± 14,561	64,80 ± 7,2854
Orn	287,92 ± 100,577	196,83 ± 50,043	209,44 ± 17,7082
Lys	722,45 ± 200,272	487,14 ± 44,069	505,37 ± 34,5827
DOPA	0,425 ± 0,306	0,113 ± 0,019	0,104 ± 0,0116
Tyr	72,40 ± 4,787	85,48 ± 5,013	83,75 ± 2,6360
NE	3,51 ± 1,105	3,02 ± 0,210	3,69 ± 0,3820
MHPG	0,180 ± 0,020	0,158 ± 0,025	0,149 ± 0,0126
E	0,011 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,011 ± 0,0016
5-HTP	0,027 ± 0,003	0,035 ± 0,004	0,029 ± 0,0057
NM	0,081 ± 0,018	0,098 ± 0,017	0,114 ± 0,0169
DOPAC	1,73 ± 0,318	2,69 ± 0,273*	1,42 ± 0,2475**
DA	0,630 ± 0,081	0,667 ± 0,059	0,602 ± 0,0639
5-HIAA	1,62 ± 0,185	2,05 ± 0,063*	1,92 ± 0,1425
Trp	27,58 ± 1,789	35,19 ± 1,644*	32,10 ± 1,0560*
HVA	2,25 ± 0,473	2,17 ± 0,203	2,39 ± 0,2982
5-HT	1,60 ± 0,234	2,08 ± 0,074	2,34 ± 0,3044

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контролю, ** – $p < 0,05$ по отношению к группе стресс 20 мин.×30 сут

Через 24 ч после последнего воздействия стресса уровни всех исследованных соединений в гиппокампе возвращались к контрольным значениям, кроме уровня триптофана, который оставался повышенным (на 16,39%). По сравнению с группой стрессированных животных, группа 24 ч после последнего стрессорного воздействия характеризовалась снижением уровня DOPAC и повышением уровня глицина, – следовательно, активация дофаминовой системы при стрессе через 24 ч после последнего воздействия не наблюдалась.

В отличие от больших полушарий, дискриминантный анализ всего пула показателей в плазме и гиппокампе выявил более выраженные различия групп, чем только пул показателей в гиппокампе. Величина лямбда Уилкса составила 0,02731. В данном случае уровень триптофана также обладал наибольшей информативностью ($F=36,0$) и коррелировал со значением первой дискриминантной функции, по которой различались группы контроля и стресса.

Необходимо отметить, что глюкокортикоиды могут регулировать синтез серотонина благодаря усиленному поглощению триптофана нервными терминалями или путем ингибирования экспрессии триптофангидроксилазы 2, [1]. Кортикостерон регулирует дофаминергическую нейротрансмиссию на уровне D1-дофаминергических рецепторов. Кортикостерон также усиливает дофаминергический фон, изменяя синтез тирозингидроксилазы, к тому же способствуя транслокации этого фермента из клеточных тел дофаминергических нейронов к их терминалям.

Заключение. Установлено, что уровень триптофана в больших полушариях, гиппокампе и гипоталамусе крыс является наиболее устойчивым индикатором психоэмоционального стресса. Его повышение не может быть полностью связано с изменением функционирования системы активного транспорта в мозг, – а, по крайней мере, в гипоталамусе может быть обусловлено изменением периферического метаболизма триптофана. Повышение содержания триптофана в отделах мозга при стрессе может сопровождаться некоторой активацией синтеза и деградации серотонина. Ускорение метаболизма дофамина, обнаруженное при стрессе в гиппокампе, возможно, также связано с повышением доступности предшественника. При стрессорном воздействии декарбоксилирование 5-окситриптофана может играть значимую роль, помимо гидроксирования триптофана, в скорости синтеза серотонина. Метаболический «след» стресса (24 ч) менее заметен при регистрации пула свободных аминокислот мозга, и становится более очевидным при анализе объединенного пула свободных аминокислот и биогенных аминов мозга и свободных аминокислот плазмы крови.

Модификация доступности триптофана для мозга может рассматриваться как возможный способ влияния на ответ ЦНС при хроническом психоэмоциональном стрессе, нейропротекторные эффекты композиций на основе триптофана могут представлять интерес.

Выполнение работы финансировалось БРФФИ, грант М13МС-034

Литература

1. Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/B16 mice / J.H. Clark [et.al] // Mol Psychiatry. – 2008. – Vol.13, №5. – P. 498-506.

MARKERS OF CHRONIC STRESS IN THE RAT BRAIN AS TARGETS FOR NEUROPROTECTIVE PHARMACOTHERAPY

Nadolnik L.I., *Doroshenko Ye.M., Chumachenko S.S.

Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus

*Grodno State Medical University

It was found that tryptophan level in the rat large hemispheres, hippocamp and hypothalamus is the most stable indicator of chronic psychoemotional stress. Increased brain region tryptophan content under stress can be accompanied by some activation of serotonin synthesis and degradation. Modification of tryptophan availability for the brain can be considered as a possible effect on the brain response in chronic psychoemotional stress and the neuroprotective effects of tryptophan-based compositions can be of interest.