

М.М. ЗОЛОТУХИН, Е.М. ДОРОШЕНКО

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ И ЭТАНОЛАМИНА НА МЕТАБОЛИЗМ СЕРОТОНИНА В СРЕДНЕМ МОЗГЕ И БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЯХ КРЫС В ТЕМНОВУЮ ФАЗУ

Исследовано влияние однократного внутрижелудочного введения вальпроевой кислоты (VPA, 400 мг/кг) и этаноламина (ЭА, 100 мг/кг) на показатели гидроксилазного пути обмена триптофана в среднем мозге и больших полушариях головного мозга интактных крыс в темновую фазу нормального фоточикла. Установлено, что через 1,5 ч VPA увеличивала оборот серотонина и угнетала его N-ацетилирование в среднем мозге и больших полушариях. Последний процесс, вероятно, модулировался норадрен- и GABA-ергической системами. Этаноламин угнетал N-ацетилирование серотонина в среднем мозге, вовлекая в этот механизм GABA-ергическую систему и норадренергическую систему в больших полушариях.

Гидроксилазный путь обмена L-триптофана в ЦНС является источником синтеза 5-гидрокситриптамина (серотонина) и эпифизарного мелатонина, которые вовлекаются в регуляцию физиологических процессов организма [1; 2]. Уровни мелатонина, серотонина и некоторых метаболитов последнего в ткани мозга подвержены суточным колебаниям, обусловленные генерированием циркадианного ритма супрахиазматическими ядрами гипоталамуса [3].

Для стимуляции центральной серотонинергической системы головного мозга чаще всего применяют предшественники серотонина, а именно – L-трипто-

фан и 5-гидрокси-L-триптофан [4]. Однако, применение первого ограничено тем, что он может повышать уровни минорных метаболитов и продуктов диоксигеназного пути обмена триптофана в мозге, а второго – ввиду его неспецифического действия на продукцию данного моноамина [5]. По этой причине представляется целесообразным поиск соединений, способных повышать оборот серотонина в структурах головного мозга и уменьшать его катаболизм по альтернативным метаболическим путям. Среди потенциальных агентов выступают вальпроевая кислота (VPA, Valproate) и этаноламин (ЭА, EA). Вальпроевая кислота обладает способностью изменять скорость обмена дофамина и серотонина в некоторых структурах головного мозга [6], а ЭА – опосредованно повышать уровни этих биогенных аминов, реализуя тем самым частично свое антиоксидантное действие [7]. Способность этих соединений увеличивать уровень и катаболизм дофамина, а следовательно, и норэпинефрина, может быть использована в регуляции активности экстраэпифизарной N-ацетилтрансферазы (повышение уровня NE увеличивает активность этого фермента) [8], изменяя тем самым приоритет деградации серотонина по его метаболическим путям.

Таким образом, представляет интерес оценить влияние вводимых ЭА и VPA на показатели гидроксилазного пути обмена триптофана в структурах головного мозга с высокой скоростью обмена серотонина в темновую фазу, поскольку синтез и катаболизм некоторых метаболитов активен в ночное время.

Целью данной работы явилось выяснение особенностей влияния однократного внутривентрикулярного введения ЭА и VPA на показатели гидроксилазного пути обмена триптофана в среднем мозге и больших полушариях головного мозга в темновую фазу нормального фоточикла.

Материалы и методы

В работе использовались 17 белых беспородных крыс-самцов массой 150-200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария, в течение двух недель до опыта – при искусственном световом режиме день/ночь (12 ч/12 ч). Внутривентрикулярное введение 0,5% раствора этаноламина (100 мг/кг) [9] или VPA (400 мг/кг) [9] осуществлялось с наступлением темновой фазы. В работе использовался препарат “Орфирил”, содержащий 60 мг/мл вальпроевой кислоты (Farmacia, Польша) и этаноламин гидрохлорид (Reanal, Венгрия). Контрольная группа получала эквивалентные количества воды. Спустя 1,5 ч животных декапитировали и извлеченные структуры головного мозга (средний мозг и большие полушария головного мозга) помещали в жидкий азот. Гомогенизацию биологического материала производили тефлоновым пестиком в 10-кратном объеме экстракционной среды, содержащей 0,2 М хлорную кислоту, 25 мг/л ЭДТА и 1 мкМ ванилиновой кислоты (внутренний стандарт для Tyr, Trp и их метаболитов) и д-аминовалериановую кислоту (внутренний стандарт для GABA). Центрифугировали 15 мин при 20000 г. Супернатанты хранили при –80°C.

Для приготовления подвижных фаз, гомогенизационной среды и реагента для дериватизации использовали: CH_3OH , CH_3CN хч (Merck, Германия), KH_2PO_4 , CH_3COONa , NaOH , H_3BO_3 ЭДТА (Reanal, Венгрия), октилсульфонат натрия, гептилсульфонат натрия (Элсико, Россия), 3-меркаптопропионовую кислоту, о-фталевый альдегид (Sigma, США), ледяную CH_3COOH , HClO_4 хч (НеваРеактив, Россия). В качестве эталонных соединений применяли L-триптофан (Trp), серотонин креатинин-сульфат (5-HT), триптамин гидрохлорид (Trp), N-ацетил-L-триптофан (NAT), L-тирозин (Tyr) (Reanal, Венгрия), мелатонин (Mel), 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-HIAA), N-ацетилсеротонин (NAS), 5-гидрокси-триптофан (5-HTP), норэпинефрин (NE),

3-метокси-4-гидрокси-фенилгликоль (МНPG), γ -аминомасляную кислоту (GABA), ванилиновую кислоту, δ -аминовалерьяновую кислоту (Sigma, США).

Для определения Тур, Тгр и их метаболитов проводили методом обращено-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 с детектором флуоресценции (G1321A, Германия). Колонка 3 x 250 мм Separon SGX C₁₈ с зернением 8 мкм (Элсико, Россия) термостатировалась при 30°C в термостате колонок (G1316A). Скорость потока 0,5 мл/мин. Автоматический ввод проб осуществлялся при помощи автосамплера (ALS G1313A), объем 20 мкл. Детектирование по природной флуоресценции при 280/340 нм для Тгр и его метаболитов и 280/320 нм для Тур и его метаболитов. Для определения Тгр и его метаболитов использовали подвижную фазу, содержащую дигидрофосфат калия 0,1 М, октилсульфонат натрия 1,67 мМ, уксусную кислоту 17 мМ, ЭДТА 25 мг/л и ацетонитрил 18,67% (об.) [10], для определения 5-НТР [10], Тур, NE, МНPG (неконъюгированный с сульфатом) – 0,1 М дигидрофосфат калия,

17 мМ уксусной кислоты, 25 мг/л ЭДТА, 1 мМ гептилсульфоната натрия, 0,8 мМ октилсульфоната натрия и 11 % метанола (об.). Определение GABA проводилось методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм) на колонке 3x150 мм Диасорб 130 C₁₆ T, 6 мкм (Элсико, Россия). Подвижная фаза содержала 0,1 М Na-ацетатный буфер pH 5,7 / 50% метанол – 100 / 54 (об/об). Скорость потока 0,7 мл/мин, температура колонки 30°C. Для дериватизации смешивали пробы с 5 объемами 0,4% раствора о-фталевого альдегида и 0,3 % 3-меркаптопропионовой кислоты в 0,4 М Na-боратном буфере, pH 9,4, затем нейтрализовали добавлением равного объема 0,1 М хлорной кислоты [11]. Объем вводимой пробы 5 мкл.

Интегрирование и расчет содержания определяемых веществ проводили с помощью программы ChemStation A.10.01. Статистическая обработка данных (описательная статистика, t-критерий Стьюдента, корреляционный и дискриминантный анализы) реализована программой Statistica 7.0.

Результаты и обсуждения

В среднем мозге спустя 1,5 ч ВРА достоверно увеличивала уровни Тгр, 5-НТР и снижала содержание NAS (рисунок 1, А), в то время как в данной структуре мозга повышалась концентрация МНPG (продукта восстановительного пути катаболизма NE) (таблица 1). Этанолламин в данной структуре мозга снижал содержание NAS (рисунок 1, А), в то время как уровень Тур повышался (таблица 1). В больших полушариях головного мозга вальпроевая кислота и ЭА понижали уровень NAS (рисунок 1, Б) и повышали содержание МНPG (таблица 2).

Таблица 1

Содержание GABA, Тур и его метаболитов в среднем мозге крыс (нмоль/г ткани) через 1,5 ч после внутрижелудочного введения вальпроевой кислоты (400 мг/кг) и этаноламина (100 мг/кг) в темновую фазу нормального фотоцикла, М \pm s.e.m. (данные предоставлены Е.М. Дорошенко)

Показатели	Контроль n = 6	Вальпроевая кислота n = 5	Этанолламин n = 6
GABA	2581,563 \pm 144,318	2593,96 \pm 302,641	2975,071 \pm 161,755
Тур	6,678 \pm 0,487	7,755 \pm 0,433	8,695 \pm 0,756*
NE	0,27 \pm 0,029	0,296 \pm 0,022	0,321 \pm 0,028
МНPG	0,062 \pm 0,008	0,091 \pm 0,01*	0,086 \pm 0,009

Примечание: P < 0,05; * – при сравнении с контролем

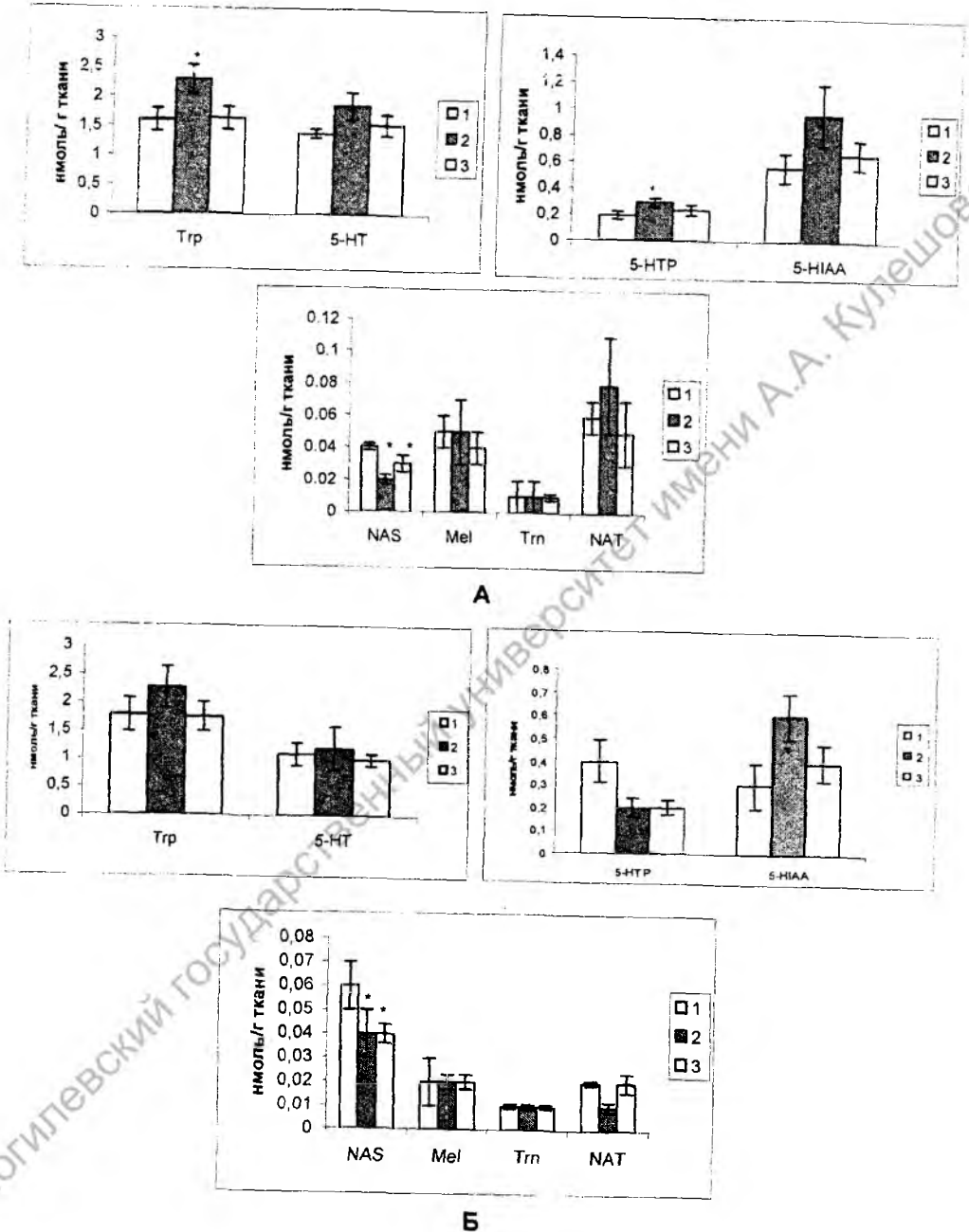


Рис. 1. Содержание триптофана и его метаболитов в среднем мозге (А) и больших полушариях головного мозга (Б) крыс (нмоль/г ткани) через 1,5 ч после однократного введения вальпроевой кислоты (400 мг/кг) и этаноламина (100 мг/кг) в темновую фазу нормального светового цикла, $M \pm s.e.m.$
 1 – контроль $n = 6$, 2 – вальпроевая кислота $n = 5$, 3 – этаноламин $n = 6$.
 Примечание: 1. $P < 0,05$; * – при сравнении с контролем.
 Примечание: 2. Содержание Trp уменьшено в 10 раз.

Таблица 2

Содержание GABA, Trp и его метаболитов в больших полушариях головного мозга крыс (нмоль/г ткани) через 1,5 ч после внутривенного введения вальпроевой кислоты (400 мг/кг) и этаноламина (100 мг/кг) в темновую фазу нормального фотоцикла, $M \pm s.e.m.$ (данные предоставлены Е.М. Дорошенко)

Показатели	Контроль n = 6	Вальпроевая кислота n = 5	Этаноламин n = 6
GABA	1467,49±112,09	1435,18±150,234	1554,59±133,954
Trp	9,55±1,323	9,36±0,586	11,81±1,347
NE	0,31±0,046	0,22±0,011	0,29±0,022
MHPG	0,09±0,023	0,16±0,011*	0,17±0,014*

Примечание: $P < 0,05$; * – при сравнении с контролем

В среднем мозге после введения VPA, повышение уровней Trp и 5-HTP может объясняться усилением гидроксирования триптофана за счет возросшей доступности предшественника. Кроме того, в данной структуре мозга отмечалось повышение уровня 5-HIAA, однако, оно не достигало достоверного значения. Такие изменения в уровне 5-HIAA могли быть связаны с усилением синаптического выброса и катаболизма 5-HT с параллельным угнетением его N-ацетилирования, вероятно, связанное с ослаблением адренергического влияния на активность N-ацетилтрансферазы. Последнее явление, вероятно, обусловлено усилением деградации NE вызванное VPA, на что косвенно указывает повышение содержания MHPG. Косвенным свидетельством об изменении функционально-метаболических взаимосвязей серотонин- и GABA-ергической систем указывает исчезновение отрицательных корреляций между уровнем GABA и 5-HTP, 5-HIAA, сопровождаемое появлением пары GABA – Trp ($r = 0,97$, $p < 0,05$).

В среднем мозге ЭА вызывал достоверное снижение содержание NAS и разрушение положительных корреляционных пар Trp – 5-HT, Trp – 5-HIAA, 5-HT – 5-HIAA, сопровождавшееся появлением связи 5-HTP – NAS ($r = -0,98$), что свидетельствует о качественном сдвиге в гидроксилазном пути и снижении активности N-ацетилтрансферазы. Возможно, в угнетение активности этого фермента вовлекается GABA-ергическая система, о чем говорит появление корреляции GABA – NAS ($r = -0,95$). Этаноламин первично оказывал эффекты на норадренергическую систему, о чем свидетельствует повышение уровня Trp и появление корреляционной связи Trp – NE ($r = 0,89$), тогда как вторичные эффекты на катаболизм серотонина были выражены в меньшей степени.

По данным дискриминантного анализа, наиболее изменяющимися показателями в среднем мозге после введения ЭА и VPA были: NAS ($F_{искл} = 6,33$, $p = 0,033$), MHPG ($F_{искл} = 8,70$, $p = 0,02$), GABA ($F_{искл} = 10,30$, $p = 0,01$), 5-HTP ($F_{искл} = 7,19$, $p = 0,03$), NE ($F_{искл} = 8,92$, $p = 0,02$), Trp ($F_{искл} = 6,82$, $p = 0,03$). Анализ расположения групп на плоскости двух главных компонент (рисунок 2, А) показывает, что метаболические эффекты VPA были сильнее выражены, чем у ЭА (оценивали по расстояниям Махаланобиса).

Таким образом, вальпроат угнетает N-ацетилирование серотонина, вовлекая в этот механизм норадренергическую систему, тогда как вклад в этот процесс GABA-ергической системы менее значителен. Эффекты же VPA в отношении метаболитов гидроксилазного и декарбоксилазного пути обмена триптофана реализуются через доступность этой аминокислоты. В отличие от VPA, этаноламин угнетает N-ацетилтрансферазу, вовлекая в этот механизм GABA-ергическую систему, тогда как вклад норадренергической системы незначителен, однако все эти модулирующие эффекты ЭА менее выражены, чем для VPA.

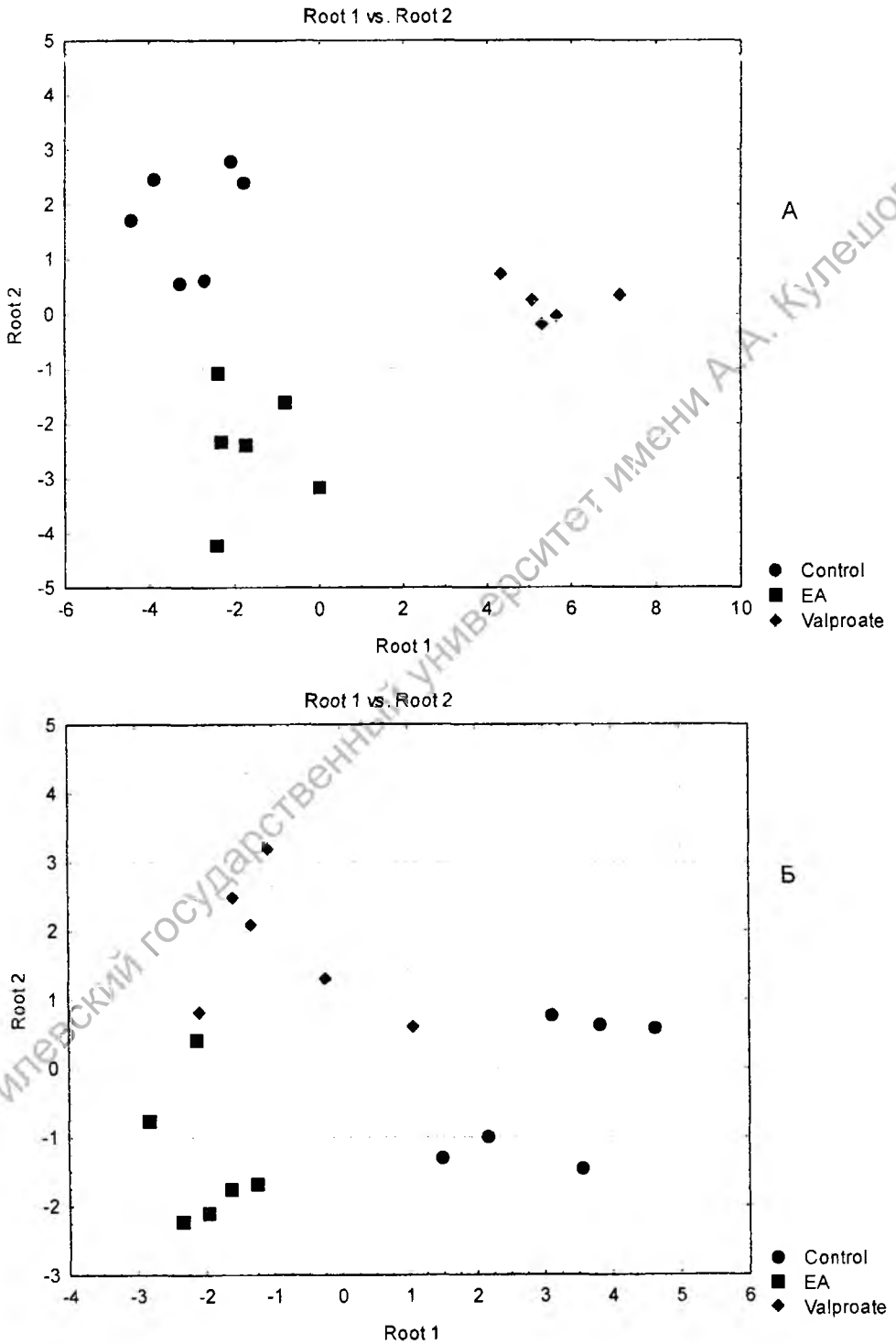


Рис. 2. Расположение экспериментальных групп на плоскости двух главных компонент: средний мозг (А) и большие полушария головного мозга (Б)

Вальпроєвая кислота в больших полушариях, как и в среднем мозге, снижает уровень NAS, которое было также связано с угнетением активности арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы. В отличие от среднего мозга, ведущая роль в регуляции активности этого фермента, а следовательно активности N-ацетилирующего катаболического пути 5-НТ принадлежит GABA-ергической системе, обусловленное действием VPA на метаболизм ее медиатора [12; 13]. В пользу функционально-метаболического влияния аминоксидергической системы указывает появление корреляционных пар GABA – NAS ($r = -1,0$), GABA – 5-НТ ($r = 1,0$). В данном случае норадренергической системе отводится менее существенная роль в регуляции, где отмечалось усиление деградации NE.

На фоне угнетения активности альтернативной цепочки обмена 5-НТ, гидроксилазный путь характеризовался повышением функциональной активности, видимо, также связанной с модулирующим действием VPA на скорость обмена 5-НТ.

После введения ЭА в больших полушариях наблюдалось исчезновение положительных корреляций 5-НТP – 5-НТ и Trp – 5-НIAA. Исчезновение отрицательной корреляционной связи между концентрациями 5-НIAA и NAS свидетельствует о снижении активности N-ацетилтрансферазы. Возможно, угнетение активности этого фермента связано со снижением адренергических влияний, так как отмечалось усиление деградации NE (повышался уровень MHPG). Кроме того, появление корреляционных пар NE – 5-НТ ($r = 0,86$), NE – NAS ($r = 0,88$) также указывает на наличие функционально-метаболических связей между обменом катехоламина и серотонина.

Возможный вклад в регуляцию окислительного дезаминирования 5-НТ могут вносить GABA и Mel, находящихся в функциональном антагонизме, на что указывает появление высоко достоверных корреляционных пар GABA – 5-НIAA ($r = -1,0$) и Mel – 5-НIAA ($r = 1,0$).

По результатам дискриминантного анализа наиболее значимыми показателями после введения VPA и ЭА в больших полушариях головного мозга были: 5-НТP ($F_{\text{искл}} = 5,22$, $p = 0,04$), NAS ($F_{\text{искл}} = 7,89$, $p = 0,01$). Анализ расположения реализаций на плоскости двух главных компонент (рисунок 2, Б) показывает, что после введения VPA сдвиги в метаболизме Trp по гидроксилазному пути были гораздо существеннее, чем в случае введения ЭА (оценивали по расстояниям Махаланобиса).

Таким образом, эффекты VPA в больших полушариях головного мозга в значительной степени затрагивают гидроксилазный путь обмена триптофана, тогда как метаболические изменения в регулирующих нейротрансмиттерных системах менее значимы. Этаноламин оказывая модулирующее действие в отношении N-ацетилирующего и дезаминирующего путей 5-НТ, вовлекает механизмы, связанные с изменением функциональных соотношений медиаторных систем.

Заключение

1. Однократное введение вальпроєвой кислоты (400 мг/кг, внутривентрикулярно) в темновую фазу спустя 1,5 ч в среднем мозге и больших полушариях головного мозга крыс вызывает повышение оборота серотонина (через повышение доступности триптофана) и угнетение синтеза N-ацетилсеротонина, возможно опосредованное модулирующим действием норадренергической системы в среднем мозге и GABA-ергической системой в больших полушариях.

2. Однократное введение этаноламина (100 мг/кг, внутривентрикулярно) в темновую фазу спустя 1,5 ч угнетает N-ацетилирование серотонина в среднем мозге и больших полушариях головного мозга, возможно опосредованное модули-

рующим действием ГАВА-ергической системы в среднем мозге и норадренергической в больших полушариях.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Sandyk, R.** L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review / R. Sandyk // *Int. J. Neurosci.* – 1992. – Vol.67, N1– 4. – P.127-144.
2. **Boguszewska, A.** Melatonin and its biological significance / A. Boguszewska, K.Pasternak // *Pol. Merkuriusz. Lek.* – 2004. – Vol. 101. – P. 523-527.
3. **Науменко, Е.В.** Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы/ Е.В. Науменко, Н.К.Попова. – Новосибирск: Изд-во "Наука". Сибирское отделение, 1975. – С. 37, 47-48.
4. **Золотухин, М.М.** Эффекты триптофана, вводимого в темновую фазу, на содержание метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана в плазме крови и в головном мозге крыс / М.М. Золотухин, Е.М. Дорошенко, В.Ю. Смирнов // *Журнал ГрГМУ.* – 2008. – Т. 23. – № 3. – С. 57-61.
5. **Попова, Н.К.** Серотонин и поведение / Н.К. Попова, Е.В.Науменко, В.Г. Колпаков. – Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1978. – С.48-52.
6. **Loscher, W.** Valproate and its major metabolite E-2-en-valproate induce different effects on behaviour and brain monoamine metabolism in rats / W. Loscher, D. Honack // *Eur. J. Pharmacol.* – 1996.– Vol. 299, N1-3. – P. 61-67.
7. Антиоксидантная активность и угнетение перекисного окисления липидов биомембран в механизме действия противоалкогольных соединений. Алкогольная интоксикация и зависимость. Механизмы развития, диагностика, лечение / Г.Н. Смелянская [и др.].– Мн.: Изд-во "Беларусь", 1988. – С. 58-69.
8. **Pulido, O.** B-adrenergic regulation of N-acetylserotonin (NAS) synthesis in the rat cerebellum/ O. Pulido, G.M. Brown, L.J. Grota // *Life Sci.* – 1983. – Vol. 33, N11. – P. 1081-1089.
9. Метаболизм триптофана в некоторых отделах головного мозга крыс: эффекты однократно вводимых вальпроевой кислоты или этаноламина в световую фазу обращенного фотоцикла / В.Ю. Смирнов, М.М. Золотухин, Е.М.Дорошенко // *Актуальные вопросы медицины: материалы конференции, посвященной 50-летию УО "ГрГМУ"* / Ред. кол. П.В.Гарелик, В.А. Снежицкий, И.Г. Жук [и др.]. – Гродно, 2008. – С. 322-323.
10. **Золотухин, М.М.** Метод определения метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана в эпифизе крысы с помощью ион-парной хроматографии с детектированием по флуоресценции / М.М. Золотухин, Е.М.Дорошенко // *Журнал ГрГМУ.* – 2007. – Т.18, № 2. – С. 25-28.
11. **Шейбак, В.М.** Спектр свободных протеиногенных аминокислот в лимфоцитах / В.М. Шейбак, М.В. Горецкая, Е.М. Дорошенко // *Журнал ГрГМУ.* – 2008. – Т. 23. – № 3. – С. 62-66.
12. The modification of the ethanol withdrawal syndrome in rats by di-n-propylacetate / E.P Noble [et al.] // *Psychopharmacologia.* – 1976. – Vol. 46, N 2. – P. 127-131.
13. **Chapman, A.G.** Sodium valproate – current status of pharmacological research / A.G. Chapman // *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* – 1994. – Vol. 83, N 40. – P. 1106-1110.