

ФАРМАКОЛОГИЯ

М.М. Золотухин, Е.М. Дорошенко,
В.Ю. Смирнов, А.В. Наумов

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ВВЕДЕНИЯ L-ТРИПТОФАНА И ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА УРОВНИ ТРИПТОФАНА И МЕТАБОЛИТОВ ГИДРОКСИЛАЗНОГО ПУТИ ЕГО ОБМЕНА В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ТЕМНОВУЮ ФАЗУ НОРМАЛЬНОГО СВЕТОВОГО ЦИКЛА

Гродненский государственный
медицинский университет

Исследовали влияние комбинированного введения L-триптофана (Trp, 100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (VPA, 400 мг/кг) на уровни Trp и его метаболитов в плазме крови, печени и в структурах головного мозга крыс. Оба соединения вводились внутрижелудочно в световой период. В темновую фазу уровни Trp в плазме крови и печени не изменялись. Содержание Trp и 5-оксииндолуксусной кислоты повышалось в гипоталамусе, среднем мозге, стриатуме, лобной доле больших полушарий, а Trp – также в мозжечке. В стриатуме повышалось содержание серотонина. Уровни N-ацетилсеротонина (NAS), триптомина (TRN), N-ацетилтриптофана (NAT) повышались в лобной доле коры. В стриатуме содержание NAS и TRN снижалось. Полагаем, что сочетание Trp и VPA стимулирует серотонинергическую систему и влияет на минорные ветви метаболизма Trp в мозге.

Гидроксилазный путь обмена триптофана является источником синтеза серотонина и мессенджера (мелатонин) в мелатонинергической системе. Торможение этой ветви метаболизма триптофана отмечается при маниах, депрессиях, алкогольной интоксикации и т.д. [1]. Для стимуляции синтеза метаболитов этой цепочки применяют сам L-триптофан [2], а также

некоторые синтетические соединения (например, вальпроевую кислоту) [3]. Последняя способна увеличивать оборот серотонина и дофамина в некоторых отделах мозга [3], и возможно реализовывать свои эффекты на ГАМК-ергическую систему через изменения в уровнях этих моноаминов [4].

Имеются работы, описывающие усиление влияния VPA на функционирование серотонинергической системы мозга при совместном введении с аминокислотами [5]. Поэтому представляется целесообразным оценить эффекты комбинированного применения L-триптофана и VPA на уровни триптофана и метаболитов гидроксилазного пути его превращений в темновую фазу, так как синтез и катаболизм некоторых из них активен в ночное время.

Цель работы: оценить метаболические эффекты сочетанного введения L-триптофана и вальпроевой кислоты на уровни триптофана и его метаболитов в некоторых отделах головного мозга в темновую фазу нормального светового цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 18 белых беспородных крыс-самцов массой 150-200 г, которые содержали на стандартном рационе вивария. В течение двух недель животные проходили период фотоадаптации. Во время эксперимента крыс содержали при нормальном световом цикле (12 ч / 12 ч). Начало световой фазы приходилось на 9:00 ч, темновой – 21:00 ч. Животным опытной группы в течение 7 дней внутрижелудочно вводили 0,5% раствор L-триптофана (100 мг/кг) [2] в 11:00 ч и вальпроевую кислоту (400 мг/кг) [6-8] в 20:00 ч. Контрольная группа получала эквивалентные количества изотонического раствора хлорида натрия. Декапитацию проводили в 23:00 ч., спустя 3 ч после последнего введения VPA. Печень и отделы головного мозга быстро извлекали и помещали в жидкий азот. Гомогенизацию биологического материала (гипоталамус, стриатум, средний мозг, лобную долю ко-

ры, мозжечок, печень) производили тифлоновым пестиком в 10-кратном объеме (эпифизов – в фиксированном объеме 100 мкл) экстракционной среды, содержащей 0,2 М хлорную кислоту, 25 мг/л ЭДТА и 1 мкМ ванилиновую кислоту (VA) (внутренний стандарт). Центрифугировали 15 мин при 13000 g. Супернатанты замораживали и хранили при -78 °С.

Кровь собирали в пластиковые пробирки, содержащие 10% раствор Na₂ЭДТА, и центрифугировали 15 мин. при 3000 g. К полученной плазме добавляли равный объем среды для депротеинизации, содержащей 1 М хлорную кислоту, 25 мг/л ЭДТА и 5 мкМ VA. Центрифугировали 15 мин. при 13000 g, супернатанты хранили при -78°С. В работе использовали L-триптофан (Sigma, США), препарат «Орфирил», содержащий 60 мг/мл вальпроевой кислоты (Pharmacia). Для приготовления подвижных фаз использовали ацетонитрил, метанол (Merck, Германия), КН₂РО₄, трилон Б (Reanal, Венгрия), октилсульфонат натрия, гептилсульфонат натрия (Элсико, Россия), хлорную кислоту, уксусную кислоту хч (НеваРеактив, Россия). В качестве эталонных соединений применяли серотонин креатинин-сульфат (5-НТ), N-ацетилтриптофан (NAT) (Reanal, Венгрия), L-триптофан (Трп), мелатонин (Mel), 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-НИАА), N-ацетилсеротонин (NAS), ванилиновую кислоту (VA), 5-гидрокситриптофан (5-НТР), триптамин (TRN), 5-метоксииндолуксусную кислоту (5-МИАА) (Sigma, США). Воду для подвижных фаз подвергали тройной дистилляции в стеклянном аппарате с последующим удалением следов органических со-

единений пропусканием через патрон «Norganic». Подвижную фазу фильтровали через мембранный фильтр GV 0,22 мкм (Millipore, США).

Определение Трп и его метаболитов проводили методом изократической обращено-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 с детектором флуоресценции (G1321A, Германия). Колонку 3 x 250 мм Separon SGX C₁₈, 8 мкм (Элсико, Россия) термостатировали при 30°С. Скорость потока 0,5 мл/мин. Введение образцов осуществлялось автосамплером (ALS G1313A), объем 20 мкл. Детектирование проводили по природной флуоресценции 280/340 нм.

При определении Трп, 5-НТР, 5-НТ и 5-НИАА использовали подвижную фазу, содержащую 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 концентраций NAS, NAT, TRN, 5-МИАА и Mel проводили по методу, описанному в работе [9]. Интегрирование и расчет концентраций проводили с помощью программы ChemStation A.10.01. Для статистической обработки данных использовали корреляционный анализ и t-критерий Стьюдента. В случае отклонения от нормального распределения достоверность проверяли U-тестом Манна-Уитни. Методы реализованы с помощью программы Statistica 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Совместное введение Трп и VPA не изменяло уровней Трп в плазме крови и печени крыс в ночное время (табл. 1).

Таблица 1 - Содержание триптофана в плазме крови и печени крыс в ночное время после комбинированного введения L-триптофана (100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в световую фазу, среднее ± средняя ошибка среднего

	Контроль	Триптофан+VPA
Трп, плазма (мкмоль/л)	35,1±1,55	39,1±2,35
Трп, печень (нмоль/г)	14,0 ± 1,0	13,2 ± 0,7

В эпифизе отмечалась тенденция к увеличению содержания 5-НТ (табл. 2), сопровождавшееся появлением корреляционной связей Трп–5-НТ (r=0,71), 5-НТР–

5-НТ (r=0,79), p<0,05. Кроме этого, отмечалась тенденция увеличения уровня 5-НИАА с появлением корреляций 5-НТР–5-НИАА (r=0,79), 5-НТ–5-НИАА (r=0,82) с па-

раллельной тенденцией к снижению уровня NAS, Mel и 5-MIAA. Эти изменения могут быть связаны с переключением метаболизма 5-НТ с N-ацетилирования на

окислительное дезаминирование, сопровождаемое угнетением O-метилирования как самого 5-НТ, так и 5-НIAA.

Таблица 2 - Содержание триптофана и его метаболитов в эпифизе крыс в ночное время после комбинированного введения L-триптофана (100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в световую фазу (нмоль/эпифиз), среднее ± средняя ошибка среднего

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Триптофан+VPA
Трп	8,94±1,03	7,38 ± 1,10
5-НТP	0,572±0,1494	0,473±0,0966
5-НТ	25,4 ± 8,6	42,1 ± 10,9
5-НIAA	1,45 ± 0,40	2,37 ± 0,50
NAS	0,278 ± 0,071	0,147 ± 0,021
NAT	0,0526 ± 0,0099	0,0452 ± 0,0109
TRN	0,0538 ± 0,0123	0,0390 ± 0,0136
5-MIAA	2,04 ± 0,44	1,20 ± 0,26
Mel	0,125 ± 0,029	0,0742 ± 0,0218

В гипоталамусе повышались уровни Трп, 5-НIAA с явной тенденцией к повышению содержания 5-НТ и снижению – NAS. Появление корреляционных связей 5-НТ и 5-НIAA ($r=0,88$) и исчезновение связи Трп–NAS свидетельствует об увеличении синтеза и деградации 5-НТ, сопро-

вождаемое угнетением его N-ацетилирования. Возможно, в регуляцию активности арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы вносит вклад Mel, поскольку отмечалось появление корреляционных связей Mel–5-НТ ($r=0,77$) и Mel–5-НIAA ($r=0,77$) (табл. 3).

Таблица 3 - Содержание триптофана и его метаболитов в гипоталамусе крыс в ночное время после комбинированного введения L-триптофана (100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в световую фазу (нмоль/г ткани, среднее ± средняя ошибка среднего)

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Триптофан +VPA
Трп	15,2 ± 1,5	22,6 ± 2,1*
5-НТP	0,151±0,0086	0,160±0,0061
5-НТ	1,69 ± 0,26	2,13 ± 0,17
5НIAA	1,13 ± 0,17	1,92 ± 0,15*
NAS	0,118 ± 0,056	0,0550±0,0047
NAT	0,0187±0,0021	0,0278±0,0041
TRN	0,0227±0,0024	0,0217±0,0028
Mel	0,0572±0,0054	0,0481±0,0035

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

В среднем мозге повышалось содержание Трп и 5-НIAA, с отмечаемой тенденцией к увеличению уровня 5-НТ (табл. 4), сопровождаемое появлением связи 5-НТ–NAS ($r= -0,70$) при неизменном содержании NAS и свидетельствующем об увеличении окисления серотонина. Характер этих изменений говорит об увеличении синтеза и катаболизма 5-НТ в серотонинергических нейронах среднего мозга за

счет увеличения доступности предшественника (Трп). Возможно, стимуляция серотонинергической системы связана с изменением свойств биологических мембран нейроцитов, сопровождаемая изменением их проницаемости под действием вальпроевой кислоты [10]. Сочетание двух факторов: изменение свойств мембран и увеличение доступности Трп приводит к активации метаболизма 5-НТ.

Таблица 4 - Содержание триптофана и его метаболитов в среднем мозге крыс в ночное время после комбинированного введения L-триптофана (100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в световую фазу (нмоль/г ткани, среднее \pm средняя ошибка среднего)

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Триптофан+VPA
Trp	15,7 \pm 1,6	25,2 \pm 1,9*
5-HTP	0,167 \pm 0,0126	0,170 \pm 0,0199
5-НТ	1,55 \pm 0,30	2,22 \pm 0,30
5HIAA	1,45 \pm 0,25	2,59 \pm 0,30*
NAS	0,0493 \pm 0,0054	0,0654 \pm 0,014
NAT	0,0218 \pm 0,0038	0,0172 \pm 0,009
TRN	0,0216 \pm 0,0032	0,0205 \pm 0,0030
Mel	0,0719 \pm 0,0048	0,0750 \pm 0,0073

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

В лобной доле коры больших полушарий крыс опытной группы отмечалось достоверное повышение содержания Trp, 5-HIAA, NAS и тенденция к увеличению уровня 5-НТ, сопровождавшееся по-

явлением связей Trp-5-НТ ($r=0,68$). Кроме того, достоверно повышались уровни NAT, TRN и появлялась корреляционная связь между их концентрациями ($r= 0,76$) (табл. 5).

Таблица 5 - Содержание триптофана и его метаболитов в лобной доле коры больших полушарий крыс в ночное время после комбинированного введения L-триптофана (100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в световую фазу (нмоль/г ткани, среднее \pm средняя ошибка среднего)

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Триптофан+ VPA
Trp	14,4 \pm 1,8	31,9 \pm 3,7*
5-HTP	0,197 \pm 0,0183	0,213 \pm 0,022
5-НТ	0,664 \pm 0,1004	0,923 \pm 0,139
5-HIAA	0,995 \pm 0,0975	1,75 \pm 0,2249*
NAS	0,0283 \pm 0,0050	0,0564 \pm 0,0067*
NAT	0,0171 \pm 0,0036	0,0308 \pm 0,0062*
TRN	0,0182 \pm 0,0021	0,0280 \pm 0,0034*
Mel	0,0769 \pm 0,0073	0,0874 \pm 0,0089

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Таблица 6 - Содержание триптофана и его метаболитов в стриатуме крыс в ночное время после комбинированного введения L-триптофана (100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в световую фазу (нмоль/г ткани, среднее \pm средняя ошибка среднего)

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Триптофан +VPA
Trp	14,3 \pm 1,1	22,0 \pm 1,3*
5-HTP	0,144 \pm 0,017	0,164 \pm 0,0119
5-НТ	0,419 \pm 0,098	0,657 \pm 0,061*
5-HIAA	0,632 \pm 0,099	1,11 \pm 0,20*
NAS	0,0190 \pm 0,0027	0,0109 \pm 0,0016*
NAT	0,0192 \pm 0,0020	0,0157 \pm 0,0023
TRN	0,0220 \pm 0,0034	0,0140 \pm 0,0013*
Mel	0,0325 \pm 0,0165	0,0162 \pm 0,0019

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Эти изменения говорят о перераспределении Трп между декарбоксилазной, N-ацетилирующей и гидроксимирующей цепочками превращения. Синтезированный 5-НТ в этом отделе мозга подвергался более активному N- ацетилированию, а также усиливался его синаптический выброс и деградация. Таким образом, в коре препараты оказывали стимулирующие влияние на серотонинергическую систему и перераспределение между минорными катаболическими путями.

В стриатуме повышалась содержание Трп, 5-НТ и 5-НИАА, при этом значение коэффициента корреляции для 5-НТ–5-НИАА составило $r=0,84$, против $r=0,96$. Кроме того, снижался уровень NAS, что

свидетельствует об усилении деградации 5-НТ по окислительному пути и снижению его ацетилирования вследствие угнетения N-ацетилтрансферазы. Снижение концентрации TRN и MeI в последнем случае не было достоверно, что, вероятно говорит об увеличении окисления этих индоламинов (табл. 6).

В мозжечке повышалась концентрация Трп (табл. 7), сопровождавшееся появлением корреляционной связи между уровнем Трп в крови и 5-НТР в этом отделе мозга. Это, возможно, означает, что возникающий градиент концентрации между уровнями Трп в крови и мозжечке вносит свой вклад в насыщение субстратом триптофангидроксилазы.

Таблица 7 - Содержание триптофана и его метаболитов в мозжечке крыс в ночное время после комбинированного введения L-триптофана (100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в световую фазу (нмоль/г ткани, среднее \pm средняя ошибка среднего).

Уровни NAT, NAS, TRN и MeI не определялись.

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Триптофан+VPA
Трп	16,2 \pm 0,9	24,4 \pm 1,4*
5-НТР	0,133 \pm 0,0099	0,174 \pm 0,0216
5-НТ	0,175 \pm 0,0352	0,131 \pm 0,0279
5НИАА	0,321 \pm 0,0535	0,429 \pm 0,0573

* — $p < 0,05$ в сравнении с контролем

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинированное введение L-триптофана (100 мг/кг) и вальпроевой кислоты (400 мг/кг) внутрижелудочно крысам в световую фазу в течение 7 дней не вызывает изменений в содержании Трп в плазме крови и печени. Также не выявлено эффектов в отношении основной мелатонин-продуцирующей системы головного мозга. Оценка эффектов в темновую фазу показала, что сочетание обоих соединений оказывает стимулирующее влияние на серотонинергическую систему в гипоталамусе, среднем мозге, лобной доле коры больших полушарий и стриатуме. Содержание минорных метаболитов – NAS, TRN, NAT – повышалось в лобной доле коры больших полушарий за счет увеличения доступности предшественников и снижалось для TRN, NAS в стриатуме за счет усиления катаболизма первого и снижения синтеза второго. Эффекты опосредовались изменением доступности Трп путем сочетанного действия двух факторов: изменения VPA проницаемости биологических мембран, а также повышения уровня триптофана после его экзогенного введения.

довались изменением доступности Трп путем сочетанного действия двух факторов: изменения VPA проницаемости биологических мембран, а также повышения уровня триптофана после его экзогенного введения.

SUMMARY

M.M. Zolotukhin, Ya. M. Darashenka, V.Yu. Smirnov, A.V. Naumov

INFLUENCE OF COMBINED INTRODUCTION OF L-TRYPTOPHAN AND VALPROIC ACIDS ON LEVELS OF TRYPTOPHAN AND IT HYDROXYLASE WAY METABOLITES IN STRUCTURES OF BRAIN OF RATS IN THE DARK PHASE OF THE NORMAL DAY CYCLE

We investigated the effects of combined injection of L-tryptophan (Trp, 100 mg/kg) and valproic acid (VPA, 400 mg/kg) on the levels of Trp and its metabolites in plasma, liver, and brain structures of rats. Both compounds were injected intragastrically

in light period. In the dark phase the liver and plasma levels of Trp were unchanged. The content of 5-hydroxyindoleacetic acid were increased in hypothalamus, midbrain, striatum, and frontal cortex while Trp level raised in all brain structures examined. The content of serotonin was increased in striatum. The levels of N-acetylserotonin (NAS), tryptamine (TRN), N-acetyltryptophan (NAT) were increased in frontal cortex. In the striatum the content of NAS and TRN were decreased. We suppose the combination of Trp and VPA to stimulate serotonergic system and alter the minor branches of Trp metabolism in brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотухин, М.М. Функциональное состояние серотонинергической и мелатонин-продуцирующей систем головного мозга человека при воздействии некоторых физиологических, патологических и фармакологических факторов / М.М. Золотухин // Журнал ГрГМУ (в печати).
2. Попова, Н.К. Серотонин и поведение / Н.К. Попова, Е.В.Науменко, В.Г. Колпаков. – Новосибирск: Наука. Сибирское отделение. – 1978. – С. 51–52.
3. 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, № 1–3. – P. 61–67.
4. Sodium valproate-induced alterations in monoamine levels in different regions of the rat brain / M.H.Baf [et al.] // *Neurochem Int.* – 1994. – Vol. 24, № 1. – P. 67–72.
5. Effects of subchronic treatment with valproate on L-5-HTP-induced cortisol responses in mania: evidence for increased central serotonergic neurotransmission/ M. Maes [et al.] // *Psychiatry Res.* – 1997. – Vol. 71, № 2. – P. 67–76.
6. Whitton, P.S. The effect of valproic acid on 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid concentration in hippocampal dialysates in vivo / P.S. Whitton, L.J. Fowler // *Eur. J. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 200, № 1. – P. 167–169.
7. The modification of the ethanol withdrawal syndrome in rats by di-n-propylacetate / E.P. Noble [et al.] // *Psychopharmacologia.* – 1976. – Vol. 46, № 2. – P. 127–131.
8. The acute effect of valproate on cerebral energy metabolism in mice / C.U. Johannesen [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2001.– Vol. 47, № 3.– P. 247–256.
9. 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. – № 2. – С. 25–28.
10. Perlman, B.J. Membrane-disordering potency and anticonvulsant action of valproic acid and other short-chain fatty acids / B.J. Perlman, D.B. Goldstein // *Mol. Pharmacol.* – 1984. – Vol. 26, № 1. – P. 83–89.

Поступила 23.06.2008 г.
