

УДК 591.436 – 612.82 – 577.11.001.6

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «ГЕПТРАЛ» И АМИНОКИСЛОТЫ МЕТИОНИН НА СОДЕРЖАНИЕ МОНОАМИНОВ И S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА В МОЗГЕ КРЫС С ГЕПАТОЗОМ

Ротенко А.А., Дугин С.Ф., Крылин В.В., Агаджанян З.С.

НИИ экспериментальной кардиологии ФГУ Российского кардиологического научно-производственного комплекса Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Москва

S-аденозилметионин имеется во всех живых клетках. Он образуется из метионина и АТФ. В медицине под названием «Гептрал» в качестве гепатопротектора используется органическая соль S-аденозилметионина. При остром введении у здоровых животных SAM увеличивает содержание в мозге норадреналина и серотонина. Целью данной работы являлось изучение воздействия хронического введения SAM и метионина на метаболизм моноаминов в мозге крыс на модели хронического гепатоза. Полученные данные свидетельствуют о разнонаправленном влиянии SAM и метионина на обмен моноаминов (SAM увеличивает концентрацию дофамина, серотонина и 3-МТ, а метионин - 3-МТ и ДОФУК).

Введение

S-аденозилметионин (SAM) метаболит, имеющийся во всех живых клетках, играющий важную роль как агент трансметилирования, транссульфирования и аминопропилирования [4]. Он образуется из метионина и АТФ. Его участие во многих биохимических процессах послужило основанием к проведению экспериментальных и клинических исследований с целью изучения его эффективности при различных патологических состояниях. Результатом этих исследований стало появление в терапевтической практике нового лекарственного препарата «Гептрал», введенного как гепатопротектор. В последствии у него была выявлена противовоспалительная, анальгетическая, хондропротекторная и антидепрессивная активности [4]. Имеются данные, указывающие на связь концентрации SAM в мозге с развитием неврологических заболеваний: шизофренией, болезнью Альцгеймера, деменцией [1,5,11]. Высокая биологическая активность SAM способствовала возникновению интереса к изучению его влияния на обмен моноаминов в мозге. Экспериментальные работы, проведенные на животных посвященные изучению влияния SAM на различные звенья метаболизма моноаминов, дают противоречивые результаты. Имеются работы, показывающие увеличение содержания норадреналина [9,12] и серотонина [14,7] в мозге крыс при введении SAM. Помимо увеличения содержания нейромедиаторов отмечают также увеличение содержания

продуктов метаболизма моноаминов в мозге (например, метаболита серотонина 5 - гидроксиндолуксеной кислоты [3]), что косвенно свидетельствует об увеличении содержания нейромедиаторов.

Схема метаболизма дофамина: ДА®3-МТ®ДОФУК®ГВК;

Схема метаболизма серотонина: Серотонин®5-ГИУК;

К настоящему времени, наиболее изучено острое влияние SAM на обмен моноаминов в мозге крыс [9,12,14,7], однако его влияние при хроническом введении практически не исследовано. Также не изучено влияние SAM на обмен моноаминов в мозге при сопутствующей патологии печени.

Целью данной работы являлось изучение воздействия хронического введения SAM и метионина на метаболизм моноаминов в мозге крыс на модели хронического гепатоза.

Методика

S-аденозил-L-метионина р - толуолсульфонатная соль (SAM), (“Sigma-Aldrich”, США), гептрал (“Эббот” С.П.А., Италия), L-метионин (“Alfa Aesar”, Великобритания), L-норадреналин (НА), L-дофамина гидрохлорид (ДА), 5-гидрокси-3-индолуксусная кислота (5-ГИУК), 5-гидрокси-L-триптофан (серотонин), 3,4 - дигидроксифенил уксусная кислота (ДОФУК), гомованилиновая кислота (ГВК), 3-метокситриптамиин (3-МТ) (“Fluka”, Швейцария)

В исследовании использованы самцы крыс линии Sprague-Dawley массой 280-300 грамм. Крысы содержались в стандартных условиях вивария с 12-ти часовой синхронизированной сменной светового и ночного периода. Основные правила содержания и ухода соответствуют нормативам, данным в Guide for Care and Use of Laboratory Animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press). Животные получали стандартный корм для грызунов (ПК-120-1) и воду ad libitum.

Хронический гепатоз вызывали пероральным введением четыреххлористого углерода (CCl₄) в дозе 1000мг/кг веса тела (50% раствор в оливковом масле) 5-тикратно через каждые 3 дня (т.е. в 1,4,7,10,13-й день) [8]. CCl₄ вводился в 16 часов с целью увеличения активности микросомального цитохрома P 450. Предварительно животные голодали в течение 12 часов (вечером лишались пищи) [10]. Контрольной группе вводили эквивалентное количество оливкового масла. Гептрал (S-аденозил-L-метионин) и метионин вводились внутривентриально в дозе 300мг/кг веса тела ежедневно [2]. На 14 день эксперимента животных забивали декапитацией, собирали кровь и извлекали головной мозг (без мозжечка). Мозг выделяли, как описано у Чумакова и др. [18] для последующего определения содержания НА, ДА, 5-ГИУК, серотонина, ДОФУК, 3-МТ, ГВК, SAM.

Анализ гомогенатов мозга на содержание моноаминов проводили методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием, как описано у Чумакова и др. [18]

Анализ гомогенатов мозга на содержание SAM проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием как описано у Simon and Shalchi [16].

Кровь центрифугировали при 5000 g 10 минут для получения сыворотки, которую замораживали до последующего определения активности ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), гамма-глутамиламинотрансферазы (ГГАТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и с помощью тест-наборов "Bio-la-test" ("Pliva-Lachema", Чехия) на спектрофотометре "Hitachi 557" (Япония).

Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи компьютерной программы Statistica v. 6.0 по критерию Манн-Уитни, т.к. объем выборки был небольшим (n=6); различия считались достоверно значимыми при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты влияния SAM и метионина на биохимические маркеры гепатоза показаны в таблице 1. В группе гепатоза наблюдается достоверное увеличение в сыворотке (относительно контрольной группы) уровня активности печеночных ферментов, выделяющихся в кровь при разрушении гепатоцитов [8]: АЛТ (в 10 раз), АСТ (в 7,5 раз) и ГГАТ (в 2,7). Отмечено достоверное уменьшение в группах гепатоз + Гептрал и гепатоз + метионин (относительно группы гепатоза) активности печеночных ферментов для АЛТ (в 5 раз и 5,2 раз), для АСТ (в 6,2 и 7,0 раз), соответственно, а для ГГАТ (в 1,8 и 2,4 раз).

Таблица 1. Биохимические показатели сыворотки крови крыс

| Показатель | Контроль (n=6) | Гепатоз (n=6) | Гепатоз + гептрал (n=6) | Гепатоз + метионин (n=6) |
|------------|----------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| АЛТ, мЕ/л | 42,17±7,96 | 431,00±82,98* | 85,83±17,85 [#] | 83,17±12,69 [#] |
| АСТ, мЕ/л | 143,67±54,18 | 1085,80±254,92* | 176,17±18,73 [#] | 156,83±31,12 [#] |
| ЩФ, мЕ/л | 413,67±82,02 | 543,33±197,87 | 446,60±78,40 | 509,67±135,13 |
| ГГАТ, мЕ/л | 3,67±1,03 | 10,00±2,90* | 5,67±2,50 [#] | 4,17±1,47 [#] |

Примечание (для таблиц №1,2,3,4):

*-P<0,05 по сравнению с контролем,

-P<0,05- по сравнению с гепатозом,

& -P<0,05- по сравнению с группы с гепатозом и метионином.

Результаты измерения содержания моноаминов в головном мозге крыс приведены в таблице 2. В группе гепатоз + Гептрал наблюдается достоверное увеличение содержания дофамина и серотонина в мозге. Оба препарата не оказали

влияния на содержание в мозге норадреналина и ГВК. Однако в группе метионина отмечено достоверное увеличение содержания ДОФУК и 3-МТ (относительно контроля).

Таблица 2. Влияние хронического введения «Гептрала» и метионина на содержание моноаминов в мозге крыс

| Показатель | Контроль (n=6) | Гепатоз (n=6) | Гепатоз + гептрал (n=6) | Гепатоз + метионин (n=6) |
|-------------------|----------------|---------------|------------------------------|---------------------------|
| НА, мкг/гр | 0,325±0,016 | 0,331±0,036 | 0,342±0,040 | 0,342±0,057 |
| ДА, мкг/гр | 0,813±0,098 | 0,840±0,043 | 0,958±0,103* | 0,923±0,202 |
| Серотонин, мкг/гр | 0,468±0,085 | 0,479±0,075 | 0,565±0,048* | 0,516±0,105 |
| 5-ГИУК, мкг/гр | 0,223±0,074 | 0,264±0,031 | 0,305±0,069 | 0,269±0,059 |
| ДОФУК, мкг/гр | 0,071±0,011 | 0,073±0,009 | 0,076±0,007 | 0,093±0,025* |
| ГВК, мкг/гр | 0,058±0,012 | 0,056±0,008 | 0,066±0,016 | 0,080±0,032 |
| 3-МТ, мкг/гр | 0,060±0,010 | 0,058±0,012 | 0,066±0,013 ^{&} | 0,091±0,027 ^{*#} |

Коэффициенты метаболизма моноаминов в мозге крыс приведены в таблице 3. Отмечено достоверное увеличение коэффициентов метаболизма дофамина в группе метионина только для

отношения 3-МТ/ДА относительно контрольной группы и группы с гепатозом. В коэффициенте метаболизма серотонина не обнаружено достоверных различий между группами.

Таблица 3. Коэффициент метаболизма моноаминов в мозге крыс

| Показатель | Контроль (n=6) | Гепатоз (n=6) | Гепатоз + гептрал (n=6) | Гепатоз + метионин (n=6) |
|----------------------|----------------|---------------|------------------------------|---------------------------|
| ДОФУК/ДА | 0,086±0,008 | 0,086±0,010 | 0,079±0,005 | 0,104±0,034 |
| ГВК/ДА | 0,072±0,015 | 0,068±0,012 | 0,069±0,013 | 0,089±0,036 |
| 3-МТ/ДА | 0,074±0,017 | 0,069±0,012 | 0,069±0,016 ^{&} | 0,098±0,019 ^{*#} |
| (ДОФУК+ ГВК+3-МТ)/ДА | 0,231±0,032 | 0,223±0,015 | 0,218±0,022 ^{&} | 0,291±0,085 |
| 5-ГИУК/Серотонин | 0,473±0,133 | 0,559±0,067 | 0,548±0,145 | 0,528±0,110 |

Результаты измерения содержания SAM, в головном мозге крыс приведены в таблице 4.

Таблица 4. Влияние хронического введения SAM и метионина на содержание SAM в мозге крыс

| Показатель | Контроль (n=6) | Гепатоз (n=6) | Гепатоз + гептрал (n=6) | Гепатоз + метионин (n=6) |
|-------------|----------------|---------------|-------------------------|--------------------------|
| SAM, мкг/гр | 11,26±1,27 | 10,17±1,74 | 11,78±0,74 | 11,46±1,87 |

Обсуждение

Полученные нами результаты соответствуют представлениям об гепатопротекторной активности данных препаратов, а также данным о влиянии Гептрала на содержание моноаминов в мозге. В отличие от ранее опубликованных работ, в которых исследовали острое введение SAM и было показано увеличение содержания: норадреналина (в гиппокампе и лобной коре) [12], серотонина (в стриатуме, гиппокампе и лобной коре) [14], а также уменьшение синтеза норадреналина (в целом мозге) [9] и содержания серотонина (в обонятельных луковицах) [14]. В нашей работе выявлено, что SAM увеличивает концентрацию дофамина и серотонина, но не оказывает влияния на содержание норадреналина в целом мозге. Относительно воздействия метионина на обмен моноаминов в мозге можно отметить, что он способствует повышению метаболизма дофамина.

Исследование влияние периферического введения SAM на содержания SAM в мозге продолжаются уже более 30 лет. В первых работах выполненных в 70-е годы с использованием меченого радиоактивной меткой SAM (метил ¹⁴C) было зарегистрировано, что при внутрибрюшинном введении в мозге наблюдается увеличение содержания SAM в различных структурах (в гипоталамусе, гипофизе, префронтальной коре) [17]. В последующих исследованиях с использованием ВЭЖХ при исследовании парентерального и перорального введения SAM были получены результаты, показывающие увеличение содержания SAM в головном мозге [16] и цереброспинальной жидкости [5]. В связи с тем, что транспортер для SAM до настоящего времени не определен, имеются две гипотезы: одна из которых предполагает транспорт SAM через ГЭБ посредством транспортеров для нуклеозидов [6], а вторая указывает на возможность периферического превращения SAM в метионин и последующего

транспорта метионина в мозг посредством транспортеров для нейтральных аминокислот, где и происходит синтез SAM [13,15]. Полученные в нашей работе данные свидетельствуют о разнонаправленном влиянии SAM и метионина на обмен моноаминов (SAM увеличивает концентрацию дофамина, серотонина и 3-МТ, а метионин – повышает содержание лишь метаболитов дофамина (3-МТ и ДОФУК)). Итак, полученные данные позволяют предположить, что возможный механизм транспорта SAM в ЦНС опосредован не одной системой.

Работа выполнена при поддержке Научной школы Е.И.Чазова

Выводы

1. В группе гепатоз + гептрал достоверно увеличено содержание дофамина и серотонина в мозге.

2. В группе гепатоз + метионин достоверно увеличено содержание 3-МТ и ДОФУК (промежуточных метаболитов дофамина), что свидетельствует об увеличении метаболизма дофамина.

3. Гептрал и метионин оказывают разнонаправленное влияние на метаболизм моноаминов в мозге у крыс с гепатозом. Первый увеличивает концентрацию дофамина, серотонина и 3-МТ (продукта начального этапа метаболизма дофамина), второй – повышает содержание лишь метаболитов дофамина (3-МТ и ДОФУК).

4. Не изменяется содержание S - аденозилметионина в мозге в группах гепатоз + гептрал и гепатоз + метионин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreoli, V.M.; Maffei, F.; Tonon, G.C.; Bukovska, G. (1978) *Monogr Gesamtgeb. Psychiatr. Psychiatry Ser.* 18: 147-150.

2. Benelli A.; Filafarro M.; Bentolini A.; Genedani S.; Bukovska G. (1999), *Br.J. Pharmacol* 127(3) 645-654.

3. Bottiglieri T, Laundry M, Martin R, et al. *Lancet* 1984;ii:224.

4. Bottiglieri T. (2002) *Am J Clin Nutr* 76(suppl):1151S-7S.

5. Bottiglieri T., Godfrey P., Flynn T., et al *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 159 (1994) 101-113.

6. Chishti M., Reichel A., Abbott N.J., Begley D.J. *Brain Research* 942 (2002) 46-50.

7. Curcio M., Catto E., Stramentinoli G., Algeri S. (1978) *Prog. Neuropsychopharmacol.* 2(1): 65-71.

8. Douglas McGregor, Matti Lang (1996) *Mutation Research* 366: 181-195

9. Fonlupt P, Barailler J, Roche M, Cronenberger L, Pacheco H. (1979) *C. R. Seances Acad. Sci. D. Jan* 15;288(2):283-6.

10. James V. Bruckner, Raghupathy Ramathan, K. Monica Lee, Srinivasa Muralidhara (2002) *JPET* 300: 273-281

11. Kennedy B.T., Bottiglieri T., Arning E. et al *J. Neural. Transm.* (2004) 111:547-567.

12. Losada ME, Rubio MC. (1989) *Eur. J. Pharmacol.* Apr 25;163(2-3):353-6.

13. Oldendorf WH, Szabo J. *Am J Physiol* 1976;230:94-8.

14. Otero-Losada ME, Rubio MC. (1989) *Gen. Pharmacol.* 20(4):403-6.

15. Pardridge WM. *Nutr Rev* 1986;44 Suppl:15-25.

16. Simon N. Young; Marjan Shalchi, *J Psychiatry Neurosci* 2005;30(1):44-8.

17. Stramentinoli G, Pezzoli C, Catto E. *Minerva Med.* 1975 May 2;66 (33):1541-62.

18. Чумаков В.Н., Ливанова Л.М., Крылин В.В., Дугин С.Ф., Айрапетянц М.Г., Чазов Е.И. *Ж. Вышш. Нервн. Деят. им Павлова* 2005, май-июнь; 55(3):410-7.

INFLUENCE OF CHRONIC TREATMENT WITH DRUG HEPTRAL AND AMINO ACID METHIONINE ON MONOAMINE AND S-ADENOSYLMETHIONINE CONTENT IN BRAIN OF RATS WITH HEPATOSIS

Rotenko A. A., Dugin S.F., Krylin V.V., Agadzhanyan Z.S.

*SRI of experimental cardiology of FSI Russian cardiology scientific-research complex
Federal agency in health and social development, Moscow*

S-adenosylmethionine (SAM) is present in all living cells. It is formed from methionine and ATP. Drug "Heptral" representing S-adenosylmethionine organic salt is used in medicine as hepatoprotector. In acute-treated intact animals SAM increases the content of noradrenalin and serotonin in a brain. The aim of this work was studying influence of chronic introduction SAM and methionine on a metabolism of monoamines in a brain of rats on model of a chronic hepatitis. The data obtained show the evidence about controversial influence of SAM and methionine on turnover of monoamines (SAM increases dopamine, serotonin and the 3-mt concentration, and methionine – content of the 3-MT and DOPAC).