

*С.В. Глинник¹,
О.Н. Ринейская¹,
И.В. Романовский¹,
Т.П. Красненкова²*

Содержание свободных аминокислот в мозге и плазме крови крыс с экспериментальным гипотиреозом при тепловом стрессе

*Белорусский государственный медицинский университет¹,
Лаборатория экспериментальной медицины, фармакологии и токсикологии
ЦНИЛ²*

Исследовано влияние теплового стресса на гормональный статус и содержание свободных аминокислот в мозге и плазме крови крыс с экспериментальным гипотиреозом. Обнаружено, что при тепловом воздействии на гипотиреоидных животных наблюдаются разнонаправленные изменения (преимущественно уменьшение) содержания свободных аминокислот в мозге и плазме крови крыс. Ключевые слова: тепловой стресс, экспериментальный гипотиреоз, свободные аминокислоты.

Гипотиреоз в настоящее время является одним из самых частых заболеваний эндокринной системы. Актуальность исследования тонких молекулярных механизмов патогенеза данного заболевания объясняется тем, что недостаточность тиреоидных гормонов сказывается на функционировании всех органов и тканей и сопровождается значительными нарушениями различных видов обмена, в том числе обмена аминокислот [7].

Биогенные аминокислоты – это гетерофункциональные соединения, являющиеся структурными компонентами пептидов и белков. Некоторые из них – глутаминовая кислота, гистидин, триптофан, фенилаланин, тирозин, таурин – участвуют в синтезе многих эндогенных биологически активных соединений, некоторых гормонов, нейромедиаторов. Обмен этих соединений контролируется различными биохимическими и физиологическими механизмами, определяющими относительно постоянные концентрации аминокислот в крови и тканях. Поскольку аминокислотам также принадлежит роль интермедиатов, связывающих между собой основные метаболические пути, исследование аминокислотного состава плазмы крови и мозга может служить интегральным показателем функционального состояния регуляторных систем организма [1]. Учитывая предполагаемое участие тиреоидных гормонов в процессах адаптации [6, 8], по-видимому, представляет научный интерес исследование изменений пула аминокислот в различных тканях экспериментальных животных с гипотиреозом при воздействии на организм стрессового фактора.

Целью настоящего исследования явилось изучение гормонального статуса и содержания аминокислот в мозге и плазме крови крыс с экспериментальным гипотиреозом при тепловом воздействии.

Материал и методы

Работа выполнена на 32 белых крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся на обычном рационе вивария БГМУ. Тепловой стресс вызывался путем помещения животных на 2 часа в суховоздушный термостат при t 40-42°C. Вентиляция осуществлялась через приоткрытые дверки термостата и паз для термометра. Оценку степени выраженности теплового стресса осуществляли измерением ректальной температуры при помощи электротермометра до и после стрессового воздействия. Животные были разделены на 4 группы (по 8 особей в каждой): 1-я группа (контроль) – интактные крысы, получавшие на протяжении эксперимента (14 суток) обычную воду; 2-я группа (стресс) – крысы, получавшие на протяжении двух недель обычную воду и на 14-е сутки подвергнутые тепловому стрессу; 3-я группа (гипотиреоз) – крысы с экспериментальным гипотиреозом, который создавался при употреблении в качестве питья 0,02 % раствора пропилтиоурацила (ПТУ) в течение 14 суток из поилок при постоянном доступе (0,78 мг ПТУ на 100 г массы тела в сутки); 4-я группа (гипотиреоз + стресс) – крысы с экспериментальным гипотиреозом, подвергнутые на 14-е сутки тепловому стрессу.

Животные умерщвлялись под тиопенталовым наркозом (60-80 мг/кг) забором крови из сонной артерии. Плазму получали центрифугированием гепаринизированной крови при 1500 об/мин и 4°C в течение 15 минут. Кровь для исследования гормонального статуса забиралась в пробирку без консерванта и через 2 часа центрифугировалась в течение 10 минут при 1500 об/мин для получения сыворотки. Содержание в сыворотке крови тироксина, трийодтиронина, кортизола и инсулина определялось методом радиоиммунного анализа с использованием наборов производства ИБОХ НАН Беларуси. Для анализа аминокислот (аспарагиновой (асп) и глутаминовой (глу) кислот, глицина (гли), гистидина (гис), таурина (тау), серина (сер), треонина (тре), фенилаланина (фен), метионина (мет), аргинина (арг)) в плазме крови и мозге экспериментальных животных использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с диодно-матричным детектированием [9]. Подготовка образцов плазмы и мозга к ВЭЖХ и дериватизация аминокислот производилась по методу, описанному нами ранее [4]. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программного пакета Statistica 6.0. Полученные данные в таблицах представлены как медиана и 50% интерквартильный размах. Для оценки достоверности различий между группами использовался тест Манна-Уитни (достоверными считались различия при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Тепловой стресс, вызванный в указанных условиях, отличался значительной выраженностью. Ректальная температура экспериментальных животных, измеренная непосредственно после теплового воздействия,

повысилась на 2,8-3,1°C. При изучении гормонального статуса при тепловом стрессе у крыс (рис. 1) было обнаружено повышение уровня кортизола в сыворотке крови крыс на 23,5%. Уровень инсулина в сыворотке крови крыс при тепловом стрессе снижался по сравнению с контрольной группой на 20,3%. Отмечалась тенденция к снижению уровней гормонов щитовидной железы – трийодтиронина на 11,1% и тироксина – на 8,7%.



Рис.1 Содержание гормонов (трийодтиронина, тироксина, кортизола, инсулина) в сыворотке крови крыс при гипотиреозе, тепловом стрессе и тепловом стрессе на фоне гипотиреоза (в % от контроля)

*-различия достоверны по сравнению с группой «гипотиреоз + стресс» ($p < 0,05$)

** -различия достоверны по сравнению с группой «контроль» ($p < 0,05$)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительной выраженности стресс-реакции организма на тепловое воздействие.

При тепловом воздействии на животных с экспериментальным гипотиреозом было обнаружено 2-кратное увеличение содержания трийодтиронина с 0,23 (0,18-0,28) до 0,47 (0,40-0,69) нмоль/л. Уровень кортизола достоверно не отличался от аналогичного показателя в группе животных с гипофункцией щитовидной железы и составлял 58,8% относительно контрольной группы. Содержание инсулина в сыворотке крови гипотиреоидных крыс, подвергавшихся тепловому воздействию, превышало на 81,4% уровень данного показателя у животных с экспериментальным гипотиреозом.

Исследование аминокислотного состава плазмы крови и мозга выявило следующие особенности. При тепловом воздействии на экспериментальных животных обнаружено увеличение концентраций большинства исследуемых аминокислот (табл. 1, 2). При этом указанные изменения более выражены в мозге, где содержание таких аминокислот как глу, сер, гис, тау, мет, гли возросло в 2-3 раза. В плазме крови крыс концентрации асп, глу, сер, гис, мет, и тре увеличились лишь на 11-39%. Значительно, на 71%, возросло только содержание фен. Учитывая, что тепловой стресс сопровождался повышением в сыворотке крови уровня кортизола, гормона катаболического характера, то можно считать закономерными выявленные изменения концентраций аминокислот. Однако обращает на себя внимание уменьшение

на 21% концентрации в плазме крови крыс арг, который является источником оксида азота, чья нейромедиаторная функция и участие в окислительном стрессе активно обсуждается последнее десятилетие [3]. В то же время содержание арг в мозге увеличивалось на 17%. Необходимо также отметить, что содержание аминокислот в мозге в 7-8 раз выше, чем в плазме крови, которая, в основном, выполняет транспортную функцию по обеспечению аминокислотами органов и тканей.

Таблица 1

Содержание аминокислот (мкмоль/л) в плазме крови крыс при тепловом стрессе, экспериментальном гипотиреозе и при тепловом стрессе на фоне гипотиреоза

Аминокислота	Контроль	Тепловой стресс	Гипотиреоз	Гипотиреоз + тепловой стресс
Аспарагиновая кислота	17.5(11.2-18.9)	24.4(21.9-27.8) ^{1а}	82.0(76.8-91.1) ^{1а}	49.8(45.7-57.1) ¹
Глутаминовая кислота	52.1(40.6-58.7)	64.9(62.6-67.4) ^{1а}	130.8(127.2-134.4) ^{1а}	50.3(46.9-61.6)
Серин	221.5(213.5-227.2)	244.2(237.1-269.8) ^{1а}	208.8(195.9-218.1) ¹	156.5(140.1-161.5) ¹
Гистидин	430.0(424.1-453.5)	477.2(460.7-510.6) ¹	448.5(420.3-474.9) ¹	523.3(501.5-577.9) ¹
Аргинин	178.9(173.9-186.8)	141.1(133.6-154.6) ^{1а}	179.8(173.4-192.2)	194.4(181.7-235.1)
Таурин	111.5(99.6-122.1)	97.5(84.6-101.7) ¹	157.8(151.0-184.5) ^{1а}	219.9(189.9-240.0) ¹
Метионин	89.2(85.3-92.4)	121.0(112.2-128.5) ^{1а}	252.6(247.8-280.2) ^{1а}	154.5(146.2-183.3) ¹
Фенилаланин	57.9(57.3-59.2)	99.2(94.7-104.7) ^{1а}	152.5(141.4-167.9) ¹	140.8(128.1-155.4) ¹
Глицин	196.8(189.2-202.9)	199.1(194.4-215.9) ¹	241.9(226.9-257.2) ¹	297.5(248.5-306.9) ¹
Треонин	101.2(87.0-103.6)	124.6(113.0-130.5) ¹	186.6(151.5-194.6) ^{1а}	116.1(92.8-143.3)

^{1а} – различия достоверны по сравнению с группой «контроль» (p < 0,05)

¹ – различия достоверны по сравнению с группой «гипотиреоз + стресс» (p < 0,05)

Таблица 2

Содержание аминокислот (мкмоль/г) в мозге крыс при тепловом стрессе, экспериментальном гипотиреозе и при тепловом стрессе на фоне гипотиреоза

Аминокислота	Контроль	Тепловой стресс	Гипотиреоз	Гипотиреоз + тепловой стресс
Аспарагиновая кислота	2.98(2.61-4.01)	3.61(2.87-3.81)	3.11(2.72-4.32)	3.52(3.13-4.07)
Глутаминовая кислота	4.17(3.79-5.39)	8.52(7.57-11.23) ^{1а}	7.13(6.42-7.14) ^{1а}	8.34(7.33-8.99)
Серин	0.43(0.36-0.51)	1.2(1.1-1.3) ^{1а}	1.4(1.1-1.4) ^{1а}	0.85(0.7-0.9) ¹
Гистидин	1.30(1.11-1.74)	3.22(3.15-3.34) ¹	0.48(0.47-1.59) ¹	2.96(2.58-3.73) ¹
Аргинин	0.40(0.39-0.42)	0.47(0.43-0.53) ^{1а}	0.57(0.46-0.63) ¹	0.39(0.37-0.46)
Таурин	1.76(1.66-2.13)	3.41(3.39-3.47) ^{1а}	3.82(3.54-4.86) ¹	5.38(4.19-6.09) ¹
Метионин	0.39(0.37-0.42)	1.18(1.10-1.28) ¹	0.45(0.41-0.70) ¹	1.04(0.93-1.19) ¹
Фенилаланин	0.42(0.21-0.62)	0.39(0.38-0.40)	0.36(0.33-0.71)	0.34(0.29-0.41)
Глицин	0.60(0.55-0.65)	1.20(1.15-1.22) ^{1а}	1.18(0.99-1.28) ^{1а}	0.85(0.66-0.95) ¹
Треонин	0.51(0.45-0.56)	0.41(0.40-0.49) ¹	0.82(0.72-0.93) ^{1а}	0.67(0.60-0.82)

^{1а} – различия достоверны по сравнению с группой «контроль» (p < 0,05)

¹ – различия достоверны по сравнению с группой «гипотиреоз + стресс» (p < 0,05)

При тепловом воздействии на фоне гипотиреоза обнаружены разнонаправленные изменения содержания исследуемых аминокислот в плазме крови и мозге экспериментальных животных, но концентрации большинства из них снижались по сравнению с аналогичными показателями в группе «гипотиреоз». Следует обратить внимание, однако, на увеличение содержания гис – на 16,6% в плазме и в 7 раз в мозге при тепловом воздействии на фоне гипотиреоза. Интерес представляют также изменения

концентрации сер, который, хотя и является для организма в целом заменимой аминокислотой, для мозга рассматривается как незаменимая аминокислота [5], из которой образуется холин и соответствующие фосфолипиды. Вместе с глицином и глутаминовой кислотой сер может использоваться для синтеза пуриновых оснований. Если содержание сер в плазме и мозге крыс при тепловом воздействии на эутиреоидных животных увеличивается, то тепловой стресс у крыс с гипотиреозом приводит к уменьшению ее концентрации в мозге на 40% и в плазме крови на 25% по сравнению с группой «гипотиреоз». Изменения содержания аминокислот (преимущественно, уменьшение) в плазме крови и мозге в ответ на тепловой стресс у гипотиреоидных крыс, возможно, объясняются снижением адаптационных возможностей организма экспериментальных животных, что проявлялось в гормональном дисбалансе – повышении уровня трийодтиронина, инсулина, отсутствии адекватного изменения в ответ на стресс уровня кортизола в сыворотке крови экспериментальных животных [2].

Выводы

1. Тепловое воздействие приводило к увеличению концентраций большинства исследованных аминокислот в плазме крови и мозге экспериментальных животных.

2. Для аминокислотного состава плазмы крови эутиреоидных животных характерны незначительные изменения в ответ на стрессовое воздействие, в отличие от пула аминокислот мозга крыс, где концентрации различных аминокислот увеличивались в 2-3 раза, что может свидетельствовать о том, что уровень аминокислот плазмы крови поддерживается более мощными биохимическими механизмами, обеспечивающими гомеостаз.

3. При тепловом стрессе на фоне гипотиреоза, сопровождающимся снижением адаптационных возможностей организма, выявляются разнонаправленные изменения (преимущественно уменьшение) содержания свободных аминокислот плазмы крови и мозга крыс.

Литература

1. Артемова, О.В., Лелевич, В.В. Характеристика пула свободных аминокислот плазмы крови крыс в условиях прерывистой алкогольной интоксикации // Актуальные вопросы молекулярной эволюции и биохимии: Материалы Республиканской конференции, посвященной 75-летию со дня основания кафедры общей химии БГМУ.-Минск, 2006.-С. 16-18.

2. Глинник, С.В., Романовский, И.В., Ринейская, О.Н. Влияние теплового стресса на гормональный статус и активность процессов перекисного окисления липидов мозга крыс при экспериментальном гипотиреозе // Научная индустрия Европейского континента – 2006: Материалы I международной научно-практической конференции, 2006.-Т. 4.-С. 73-75.

3. Закуцкий, А.Н., Субботина, Т.Ф. Аргинин в эндокринной системе // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.-2005.-№ 4.-С. 6-12.
4. Красненкова, Т.П., Ринейская, О.Н. Использование ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием для определения концентрации аминокислот в плазме крови крыс // Сб. работ «Труды молодых ученых БГМУ».-Минск: БГМУ, 2005.-С. 73-77.
5. Турова, Н.Ф., Барышников, В.А. Изменение концентрации свободных аминокислот развивающегося мозга под влиянием антенатальной гипоксии // Вопросы медицинской химии.-1979.-Т. 25.-С. 622-626.
6. Хоч, Н.С., Лопухова, В.В., Грацианова, А.Д. // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1994.-Т.-118.-№ 11.-С. 523-528.
7. Щитовидная железа / Под ред. А.И. Кубарко.-Минск – Нагасаки.-1998.-С. 157-163.
8. Langer, P., Foldes, O., Kvetnansky, R. // Exp. Clin. Endocrinol.-1983.-Vol.-82.-N 3.-P. 51-60.
9. Schwarz, A., Roberts, W.L., Pasguali, M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection // Clinica Chimica Acta.-2004.-V. 312.-P. 253-262.