

*И.В. Романовский, О.Н. Ринейская, С.В. Глинник, Т.П. Красненкова*

## **СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МОЗГЕ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ СТРЕССА**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

*Исследовано влияние различных видов стресса (гипокинетического, холодового и теплового) на гормональный статус и содержание свободных аминокислот в мозге крыс с экспериментальным гипотиреозом. Тепловое воздействие приводило к увеличению концентраций большинства исследованных аминокислот в мозге экспериментальных эутиреоидных животных, а холодовое воздействие и гипокинетический стресс преимущественно — к снижению, более выраженному в ответ на холод. При холодовом стрессе и тепловом воздействии на гипотиреоидных животных выявлены разнонаправленные изменения содержания свободных аминокислот в мозге. При экспериментальном гипотиреозе обнаружено увеличение содержания большинства исследованных аминокислот в ответ на гипокинезию. При всех видах стрессовых воздействий на фоне гипотиреоза в мозге крыс обнаружено выраженное увеличение уровней глутаминовой кислоты и таурина.*

**Ключевые слова:** *тепловой стресс, холодовой стресс, гипокинетический стресс, экспериментальный гипотиреоз, свободные аминокислоты.*

### ***I. V. Romanovsky, O. N. Ryneiskaya, S. V. Hlinnik, T. P. Krasnenkova*** **FREE AMINO ACIDS CONCENTRATION IN BRAIN OF RATS WITH EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM AT DIFFERENT TYPES OF STRESS**

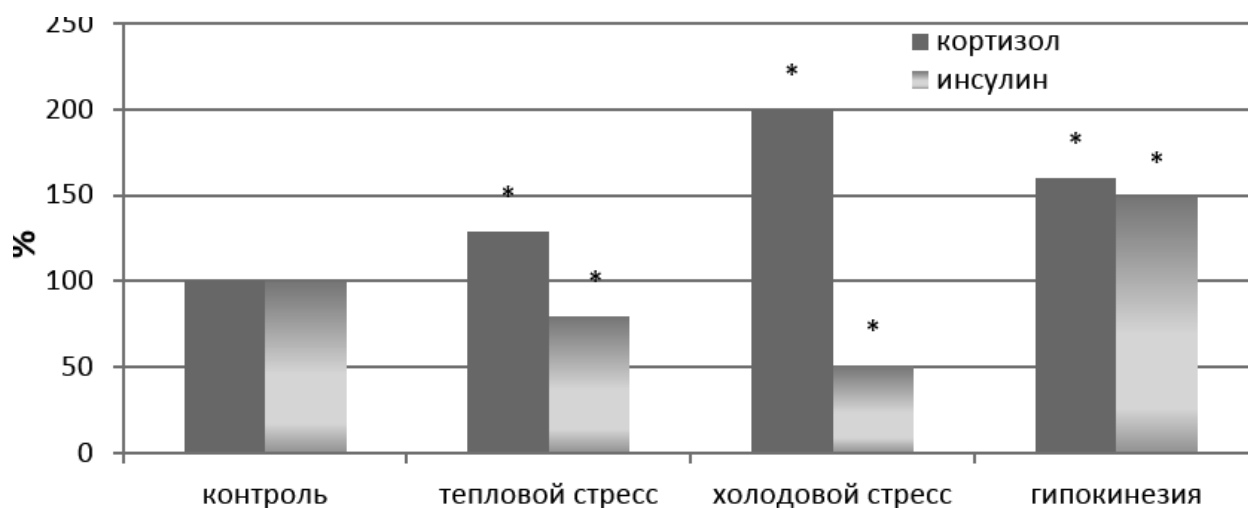
*It was studied influence of different types of stress (thermal, cold and hypokynetic) on hormonal state and concentration of free amino acids in brain of rats with experimental hypothyroidism. Thermal stress result in increase of the most investigated free amino acids in brain of rats without hypothyroidism, but the cold and hypokynetic types of stresses mainly result in decrease. The cold and thermal stress reveal different changes of concentration of the free amino acids in brain of rats with experimental hypothyroidism. Hypokynetic stress results in increase of the most investigated free amino acids in brain of rats. All types of stress is accompanied increase of glutamic acid and taurine concentration.*

**Key words:** *thermal stress, cold stress, hypokynetic stress, experimental hypothyroidism, free amino acids.*

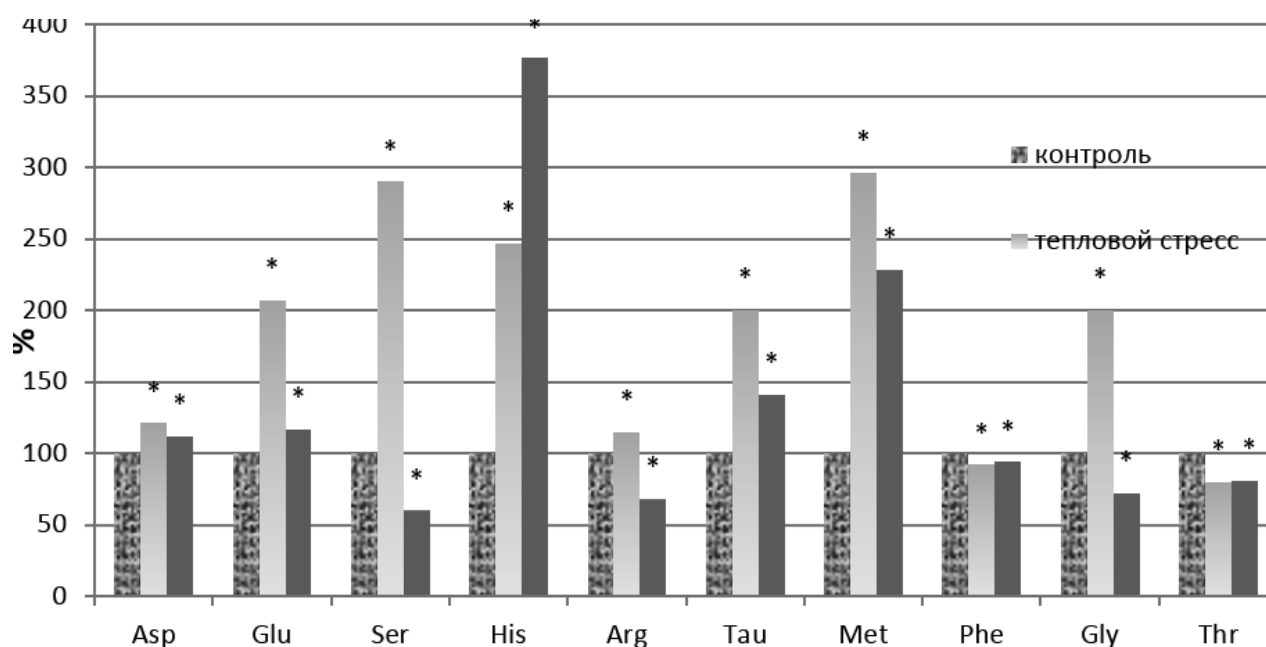
Гипотиреоз в настоящее время является одним из самых частых заболеваний эндокринной системы. Актуальность исследования тонких молекулярных механизмов патогенеза данного заболевания объясняется тем, что недостаточность тиреоидных гормонов сказывается на функционировании всех органов и тканей и сопровождается значительными нарушениями различных видов обмена, в том числе обмена аминокислот [8].

Значение биогенных аминокислот определяется их уникальной ролью в построении и промежуточном синтезе основных структурных компонентов клетки (белки, нуклеиновые кислоты, низкомолекулярные азот- и серосодержащие соединения) и реализации через эти компоненты большинства функций клетки. Некоторые из аминокислот,

такие как глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глицин, гистидин, триптофан, фенилаланин, тирозин, таурин участвуют в синтезе эндогенных биологически активных соединений, некоторых гормонов, нейромедиаторов, или сами таковыми являются. 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 мозга может служить интегральным показателем функционального состояния регуляторных систем организма [1]. Учитывая предполагаемое участие тиреоидных гормонов



**Рис.1.** Уровни кортизола и инсулина в сыворотке крови крыс при тепловом, холодном стрессах и гипокинетическом воздействии в процентах от контрольного уровня. \* - различия достоверны по сравнению с группой «контроль» ( $p < 0,05$ )



**Рис.2.** Содержание аминокислот в мозге крыс (в % от показателя в группе «контроль») при тепловом воздействии, а также при тепловом воздействии на фоне гипотиреоза; \* - различия достоверны по сравнению с группой «контроль» ( $p < 0,05$ )

в процессах адаптации [7, 9], по-видимому, представляет научный интерес исследование изменений содержания аминокислот в различных тканях экспериментальных животных с гипотиреозом при воздействии на организм стрессового фактора.

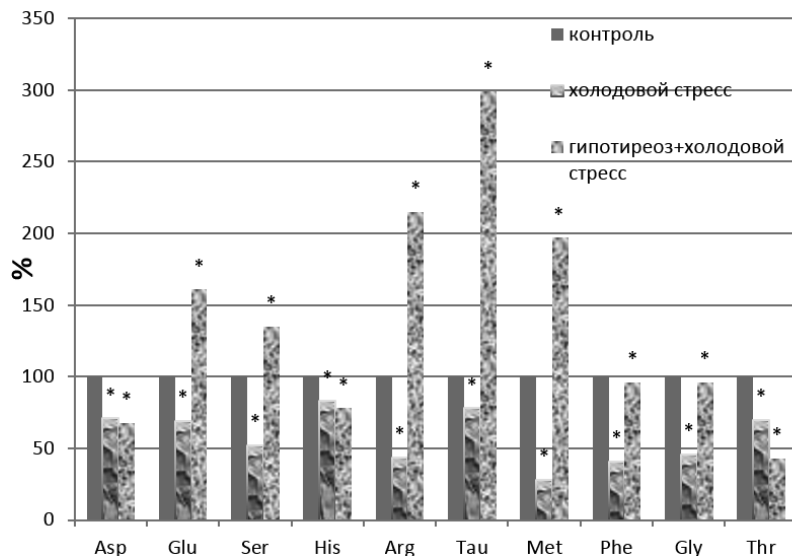
**Целью** настоящего исследования явилось изучение содержания аминокислот в мозге крыс с экспериментальным гипотиреозом при тепловом, холодном воздействии и гипокинетическом стрессе.

**Материалы и методы**

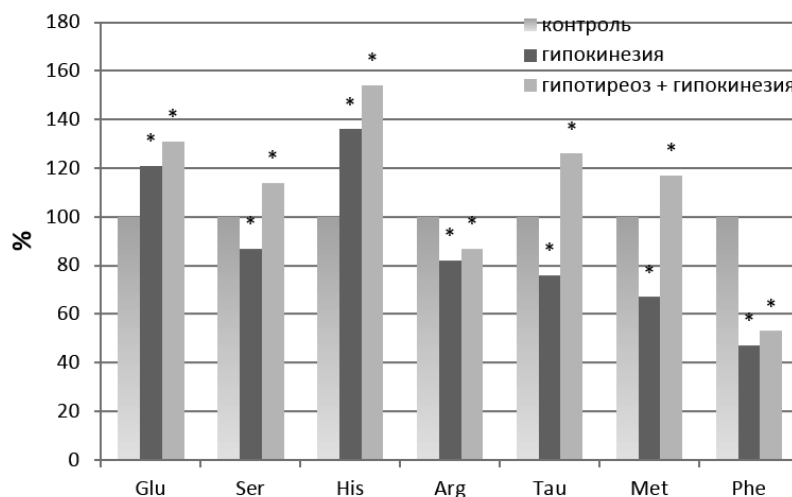
Работа выполнена на 96 белых крысах-самцах массой 180 - 200 г, содержащихся на обычном рационе вивария БГМУ. Было проведено III серии экспериментов. В каждой серии животные были разделены на 4 группы (по 8 особей в каждой): 1-я группа (контроль) – интактные кры-

сы, 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 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 стрессу.

Тепловым стрессом (ТС) 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. Холодовым стрессом (ХС) создавался путем погружения крыс в воду



**Рис.3.** Содержание аминокислот в мозге крыс (в % от показателя в группе «контроль») при холодовом воздействии, а также при холодовом воздействии на фоне гипотиреоза; \* - различия достоверны по сравнению с группой «контроль» ( $p < 0,05$ )



**Рис.4.** Содержание аминокислот в мозге крыс (в % от показателя в группе «контроль») при гипокинетическом стрессе, а также при гипокинезии на фоне гипотиреоза; \* - различия достоверны по сравнению с группой «контроль» ( $p < 0,05$ )

с температурой 10°C на 10 минут. Условия проведения опыта исключали плавание животных. Гипокинетический стресс создавался путем помещения экспериментальных животных на 3 часа в индивидуальные клетки-пеналы длиной 15 см и шириной 6 см при комнатной температуре (18-20°C). Оценку степени выраженности стресса проводили по изменению индивидуального поведения животного в тесте «открытое поле», ректальной температуры после стрессового воздействия, степени увеличения весового коэффициента надпочечников; исследовались также уровни кортизола и инсулина в сыворотке крови крыс.

Животные умерщвлялись под тиопенталовым наркозом (60 - 80 мг/кг) забором крови из сонной артерии. 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 (Asp) и глутаминовой (Glu) кислот, глицина (Gly), гистидина (His), таурина (Tau), серина (Ser), треонина (Thr), фенилаланина (Phe), метионина (Met), аргинина (Arg)) в мозге экспериментальных животных использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с диодно-матричным детектированием [10]. Подготовка образцов тканей мозга к ВЭЖХ и дериватизация аминокислот производилась по методу, описанному нами ранее [5]. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программного пакета Statistica 6.0. Для оценки достоверности различий между группами использовался тест Манна-Уитни (достоверными считались различия при  $p < 0,05$ ).

#### Результаты и обсуждение

Тепловой и холододвой стрессы, вызванные в указанных условиях, отличались значительной выраженностью. Ректальная температура экспериментальных животных, измеренная непосредственно после теплового воздействия, повысилась с 36,63°C (36,6-36,8) до 39,6°C (39,0-40,5). Этот же показатель, измеренный после воздействия холода снизился с 36,6°C (36,2-36,9) до 34,0°C (33,9-34,1). Весовой коэффициент надпочечников увеличился на 9,6% и 18,6% соответственно при тепловом и холододвой воздействиях.

По результатам теста «открытое поле» при тепловом воздействии у крыс значительно (на 41-80%) уменьшались горизонтальная подвижность, ориентировочно-исследовательская активность и эмоциональность.

О значительной выраженности стресса свидетельствует также увеличение уровня кортизола на 23,5% при тепловом воздействии и 2-кратное возрастание его при воздействии холода (рис. 1). Уровень инсулина в ответ на стрессовое воздействие снижается на 20% и 49% соответственно. При исследовании влияния гипокинезии на поведение крыс в «открытом поле» выявлено незначительное снижение таких показателей как двигательная подвижность и ориентировочно-исследовательская активность, и существенное снижение на 46% эмоциональности. Гипокинезия сопровождалась также увеличением уровня кортизола на 61,5% и увеличением на 49% уровня инсулина (рис. 1). Изменения весового коэффициента надпочечников обнаружено не было.

По-видимому, в отличие от теплового и холододвой

стрессов, гипокинетическое воздействие в наибольшей степени является для экспериментальных животных эмоциональным стрессом, и возможно, обнаруженное нами повышение уровня инсулина именно при гипокинезии является реакцией на повышение уровня глюкозы в крови.

Исследование фонда свободных аминокислот тканей мозга при различных видах стресса выявило следующие особенности. При тепловом воздействии обнаружено увеличение концентраций большинства исследуемых аминокислот (рис. 2). При этом указанные изменения более выражены в отношении таких аминокислот как Ser, Met, His, и нейтроактивных Tau, Glu, Gly, концентрации которых возросли в 2 - 3 раза. Учитывая, что тепловой стресс сопровождался повышением в сыворотке крови уровня кортизола, гормона катаболического характера, то можно считать закономерными выявленные изменения концентраций аминокислот.

При холододовом воздействии (Рис. 3) на экспериментальных животных обнаружено снижение содержания в мозге всех исследованных аминокислот. Особенно выраженным было снижение уровней метионина – на 72%, фенилаланина, глицина, треонина, аргинина (на 54-59%).

Выявленные изменения содержания аминокислот в тканях мозга при холододовом стрессе, вероятно, связаны с протеканием защитных реакций образования связанных (N-ацетилпроизводных) форм аминокислот, отражающих неспецифические процессы изменений макромолекул и мембранных структур, которые направлены на поддержание функций мозга в условиях гипотермии [2].

При гипокинетическом стрессе содержание большинства аминокислот в мозге крыс снижалось (на 13-53%). Однако следует отметить увеличение концентраций Glu и His на 21% и 36% соответственно (Рис. 4).

При всех видах стрессовых воздействий на фоне гипотиреоза в мозге крыс (Рис. 2-4) обнаружено увеличение уровня глутаминовой кислоты и таурина, наиболее выраженное при холододовом стрессе (на 61% Glu и в 6 раз Tau). Выявлено также увеличение содержания метионина в мозге гипотиреодных животных - приблизительно в 2 раза при всех видах воздействий. Интересно также увеличение уровня His при тепловом и гипокинетическом стрессах, причем при тепловом воздействии - почти в 4 раза.

Интерес представляют также изменения концентрации Ser, который, хотя и является для организма в целом заменимой аминокислотой, для мозга рассматривается как незаменимая аминокислота [6], из которой образуется холин и соответствующие фосфолипиды. Вместе с глицином и глутаминовой кислотой Ser может использоваться для синтеза пуриновых оснований. Обнаружено, что содержание серина в мозге эутиреоидных крыс при холододовом и гипокинетическом стрессах снижается, а в мозге гипотиреодных животных – растет, что заставляет думать о снижении активности реакций его использования в условиях гипотиреоза.

В целом, следует отметить увеличение содержания большинства аминокислот в мозге крыс с экспериментальным гипотиреозом в ответ на гипокинетическое воздействие и холододовый стресс. При тепловом воздействии обнаружено снижение содержания большинства аминокислот в мозге гипотиреодных животных.

Таким образом, использованные модели стресса ха-

рактеризовались значительными изменениями аминокислотного состава тканей мозга эу- и гипотиреодных экспериментальных животных. Тепловое воздействие приводило к увеличению концентраций большинства исследованных аминокислот в мозге экспериментальных эутиреоидных животных, а холододовое воздействие и гипокинетический стресс преимущественно – к снижению, более выраженному в ответ на холододовый стресс. При холододовом стрессе и тепловом воздействии на гипотиреодных животных выявлены разнонаправленные изменения содержания свободных аминокислот в мозге. При экспериментальном гипотиреозе обнаружено увеличение содержания большинства исследованных аминокислот в ответ на гипокинезию. Полученные экспериментальные данные позволяют наметить перспективу дальнейших исследований в отношении изучения преимущественных путей метаболизма аминокислот в мозге при гипотиреозе и на его фоне при различных стрессовых воздействиях.

### 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. Бекшоков, К.С. Содержание свободных и связанных аминокислот в различные периоды зимней спячки // Материалы 5-1 Пушкинской конференции молодых ученых. – Пушкино, 2001. – С. 6-7.
3. 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.
4. Закуцкий, А.Н., Субботина Т.Ф. Аргинин в эндокринной системе // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2005. - № 4. - С. 6 -12.
5. Красенкова, 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.
6. 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.
7. Хоч, Н.С., Лопухова В.В., Грацианова А.Д. Изменение морфофункционального состояния щитовидной железы при сочетанном действии гипокинезии и холода // Бюл. экспир. биол. и мед. - 1994. - Т. - 118. - № 11. - С. 523 - 528.
8. Щитовидная железа / Под ред. А.И. Кубарко. - Минск – Нагасаки. - 1998. - С. 157 - 163.
9. Langer, P., Foldes O., Kvetnansky R. et al. Pituitary-thyroid function during acute immobilization stress in rats // Exp. Clin. Endocrinol. - 1983. - Vol. - 82. - N 3. - P. 51 - 60.
10. Schwarz, A., Roberts W.L., Pasquali M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection // Clinica Chimica Acta. - 2004. - V. 312. - P. 253 -262.

Поступила 18.10.2013