

УДК 612.822 – 092.9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОГЕННЫХ АМИНОВ, ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МЕТАБОЛИТОВ В ЛИКВОРЕ И ВЕНТРИКУЛО–ЦИСТЕРНАЛЬНОМ ПЕРФУЗАТЕ МОЗГА КРЫС

А.В. Денисенко, аспирант; Е.М. Дорошенко; С.М. Зиматкин

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Разработан метод прижизненного исследования биогенных аминов, их предшественников и метаболитов в ликворе и вентрикуло-цистернальном перфузате мозга крыс. Животных под наркозом помещают в стереотаксический аппарат, через отверстие в черепе в боковой желудочек мозга вводят изотонический раствор. Определение проводят методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Метод чувствителен, надежен и хорошо воспроизводим.

Ключевые слова: биогенные амины, ликвор, вентрикуло-цистернальный перфузат.

The method of investigation of biogenic amines, their precursors and metabolites in CSF and ventriculo-cisternal perfusate of rat brain was developed. Anesthetized rats were placed in a stereotaxic apparatus and perfused with saline through the ventriculo-cisternal system of the brain. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. The method is sensitive, reliable and reproducible.

Key words: CSF, biogenic amines, ventriculo-cisternal perfusate.

Введение

В большинстве исследований синтеза и метаболизма биогенных аминов определение проводили после декапитации животных с последующим извлечением мозга. Затем мозг целиком или отделы мозга гомогенизировали, депротеинизировали, центрифугировали, и безбелковый супернатант подвергали дальнейшим исследованиям. Данный метод позволяет получить общую картину о нахождении в мозге тех или иных соединений и определять их концентрации в разных отделах мозга, однако не всегда отражает истинное содержание метаболитов в живом мозге. Прижизненный микродиализ существенно расширил возможности исследования лабильных соединений в тканевой жидкости мозга. Он позволяет, исключая декапитацию животного, многократно осуществлять забор биологического материала. Однако данный метод ограничивает область исследования маленьким участком мозга, в котором проводится микродиализ, спектр исследуемых соединений ограничен свойствами полупроницаемых мембран, кроме того, многократный забор проб может привести к значительному повреждению мозга, что в свою очередь приведет к искажению истинных значений. Затем появился метод, с помощью которого можно было многократно осуществлять забор ликвора, который в силу особенностей своего образования, представляет собой межклеточную жидкость, а она в свою очередь отражает прижизненное состояние обменных процессов в целом мозге [3,4,5].

Недавно в ЦНИЛ ГрГМУ разработан метод вентрикуло-цистернальной перфузии мозга крыс, позволяющий исследовать динамику обменных процессов в живом мозге животных [1]. На его основе нами разработана методика, позволяющая определять содержание биогенных аминов, их предшественников и метаболитов в вентрикуло-цистернальном перфузате мозга наркотизированных крыс.

Материалы и методы

Животных (крыс гетерогенной популяции) под общей анестезией (калипсол, 100 мг/кг, в/б) помещали в стереотаксический аппарат, делали надрез

мягких тканей головы и просверливали отверстие в своде черепа в области тела бокового желудочка мозга (P= -0,9мм; L= 1,5мм; D= 3,5) в соответствии с координатами стереотаксического атласа мозга крысы [1,2]. В отверстие вводили иглу (глубина введения – 3,5мм), соединенную с фторопластовой трубкой, через которую с помощью шприца и микроасоса с постоянной скоростью (12 мкл/мин) нагнетали перфузионную жидкость (0,9% раствор NaCl). Вторую иглу вводили в большую цистерну мозга, а соединенную с ней фторопластовую трубку опускали в микропробирку для сбора проб. Выход перфузата из большой цистерны осуществлялся самотеком под давлением нагнетаемой жидкости [1]. Каждую пробу собирали в течение 5-10 минут. Для очистки перфузата от следов белка пробы в эквивалентных количествах смешивали со средой для гомогенизации мозга, содержащей хлорную кислоту (0,2 М) и внутренний стандарт (4,6 мкМ ванилиновая кислота); затем центрифугировали при 22000 g 15 мин, надосадочную жидкость подвергали дальнейшим исследованиям. Длительность эксперимента 60-90 минут или более, при необходимости.

Количество перфузата в каждой пробе вычисляли по разнице массы пробирки до и после взятия пробы. Для анализа брали 10 мкл пробы. Анализ образцов осуществлялся с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа, состоящего из системы подачи растворителя LKB 2150 HPLC PUMP, инжектора Rheodyne 7725, термостата колонок JETSTREAM PLUS и электрохимического детектора ESA Coulochem 5100A. Использовалась колонка Diasorb 130 C₁₆ T 3мм × 25см, размер частиц 6 мкм (Элсико, Россия). Подвижная фаза: 0,1 М КН₂РO₄, 17 мМ СН₃СООН, 80 мг/л октилсульфоната натрия, 320 мг/л гептилсульфоната натрия, 20 мг/л ЭДТА. Скорость потока – 0,45 мл/мин, температура колонки 20°C.

Результаты и обсуждение

При применении описанного метода оказалось возможным определять во внутрижелудочковом перфузате мозга крыс следующие биогенные амины, их предшественники и метаболиты: Грр – трип-

тофан, 5-НТР – 5-гидрокситриптофан, 5-НТ – 5-гидрокситриптан (серотонин), 5-Н1АА – 5-гидроксииндолуксусную кислоту, Тир – тирозин, ДОРА – 3,4-дигидроксифенилаланин, ДОРАС – 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту, НЕ – норадреналин, НВА – гомованилиновую кислоту, 3-МТ – 3-метокситирамин, МНРГ – 3-метокси-4-гидроксифенилгликоль. Содержание этих соединений в перфузате значительно отличается от их уровня в ликворе и меняется в процессе вентрикуло-цистеральной перфузии мозга крысы.

Для иллюстрации полученных результатов в таблице 1 приводятся данные по содержанию биогенных аминов, их предшественников и метаболитов в ликворе и перфузате одной и той же крысы в динамике в течение 60 мин, при скорости перфузии 12 мкл/мин.

Таблица 1. Содержание биогенных аминов в перфузате при прижизненной вентрикуло-цистеральной перфузии мозга крысы изотоническим раствором (нМ)

Время (мин)	ликвор	10	20	30	40	50	60
ДОРА	313,50	537,05	189,61	368,50	391,52	501,09	441,82
Тир	8569,33	17901,98	12889,50	12748,34	16612,85	15884,08	10262,66
НЕ	323,14	2103,81	851,08	658,49	742,43	802,96	837,09
МНРГ	5058,54	3590,29	4879,60	3289,22	3897,82	5485,93	5387,34
НТР	183,58	74,39	37,31	64,11	41,18	47,05	65,29
ДОРАС	651,70	57,40	233,75	379,24	124,86	93,18	61,83
Н1АА	306,29	244,92	149,85	121,55	164,02	84,03	149,17
Трп	2965,38	4272,83	3070,87	1729,20	2479,62	3170,30	2557,67
НВА	184,38	24,09	38,64	80,97	48,03	24,18	20,28
МТ	260,74	105,79	67,78	37,33	50,81	59,23	118,72
НТ	116,44	59,11	35,16	203,50	87,78	74,01	77,36

Перфузат забирали из большой цистерны мозга каждые 10 минут.

Из таблицы 1 видно, что ликвор и оттекающий из мозга перфузат содержат в своем составе биогенные амины, их предшественники и метаболиты. Это свидетельствует об их постоянном выделении клетками мозга в межклеточную жидкость, с которой они попадают в ликвор. Проходя через желудочковую систему мозга крысы, перфузионная жидкость равномерно перемешивается с ликвором, поэтому анализ перфузата дает возможность получить четкую картину о содержании в мозге различных соединений.

Для всех соединений, кроме дигидроксифенилаланина, тирозина, норадреналина и триптофана, наблюдается снижение концентрации в перфузате, по сравнению с ликвором, что может быть связано с разбавлением последнего перфузионной жидкостью (рис. 1). В случае дигидроксифенилаланина, тирозина, норадреналина и триптофана наблюдается резкое увеличение концентраций, а затем постепенное их снижение к исходному уровню (рис. 2). Это говорит о том, что идет постоянное динамическое уравнивание концентраций биологически активных веществ между нервной тканью, межклеточной жидкостью мозга и ликвором, а не только разбавление последнего перфузионной жидкостью. Можно полагать, что выявляемые изменения в вентрикуло-цистеральном перфузате в целом отражают прижизненные изменения метаболизма биогенных аминов в мозге, а следовательно, и функциональное состояние последнего.

Заключение

Предлагаемый метод позволяет изучать динамику прижизненного изменения содержания биогенных аминов, их предшественников и метаболитов в ликворе и вентрикуло-цистеральном перфузате мозга крысы. Метод достаточно чувствителен, надежен, хорошо воспроизводим, и может ис-

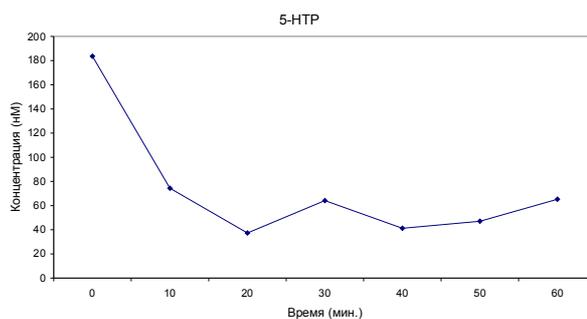


Рис. 1. Изменение концентрации 5-гидрокситриптофана в перфузате мозга крысы в динамике 60-минутной внутрижелудочковой перфузии мозга крысы изотоническим раствором (0,9 % NaCl)

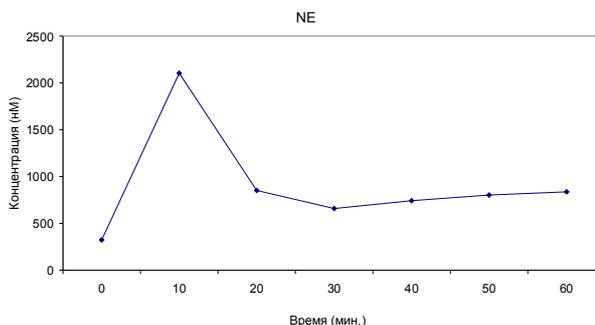


Рис. 2. Изменение концентрации норадреналина в перфузате мозга крысы в динамике 60-минутной внутрижелудочковой перфузии мозга крысы изотоническим раствором (0,9 % NaCl)

пользоваться для изучения различных экспериментальных воздействий на метаболизм биогенных аминов в головном мозге лабораторных животных.

Литература

- Зиматкин С.М., Бубен А.Л. Метод исследования окисления этанола в живом мозге // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, Москва, 2006, Том 142, № 9, 357-360.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. NY., 1986.
- Wagner J., et. al. Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5-hydroxytryptophan, dopamine, 4-hydroxy-3-methoxyphenylalanine, norepinephrine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, serotonin, and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // J. Neurochem. – 1982. – V. 38. – N 5. – P. 1241-1254.
- Yuji Wada, et. al. Variation of monoamines and their metabolite contents in the cerebrospinal fluid of conscious rats // Jpn. J. Pharmacol. – 1998. – V. 78. – P. 237-240.
- Yumi Takemoto. An improved method for using cisternal cerebrospinal fluid in conscious rats for application in the measurement of catecholamines // Jpn. J. Physiol. – 1991. – V. 41. – P. 665-669.

Resume

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES, THEIR PREDECESSORS AND METABOLITES IN LIQUOR AND VENTRICULO-CISTERAL PERFUSATE OF RAT BRAIN

A.V. Denisenko, E.M. Doroshenko, S.M. Zimatkin
Grodno State Medical University

The article describes the method of determination of biogenic amines, their predecessors and metabolites in liquor and ventriculo-cisternal perfusate of anesthetized rat brain in dynamics. It allows to determine such biogenic amines, their predecessors and metabolites as tryptophan, 5-hydroxytryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, tyrosine, 3,4-dihydroxyphenylalanine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, homovanillic acid, 3-methoxytyramine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol. The method can be used for studying different experimental influences on biogenic amines metabolism in rat brain.

Поступила 31.01.07