

Л.Д. Попова

## Вплив кінуренової кислоти на вміст катехоламінів у головному мозку щурів з різним рівнем судомної готовності

*Изучено влияние кинуреновой кислоты на содержание катехоламинов в головном мозгу крыс с разным уровнем судорожной готовности. У животных с высокой судорожной готовностью в большинстве исследованных структур обнаружено снижение содержания норадреналина и повышение коэффициента соотношения между содержанием дофамина и норадреналина. Кинуреновая кислота вызывала значительные изменения в содержании катехоламинов и их предшественника в головном мозгу животных обеих групп. Сравнение абсолютного количества медиаторов, коэффициентов соотношения между содержанием предшественника и медиатора, между количеством медиатора в местах локализации нейронов и соответствующих нервных окончаний дает основание предположить, что кинуреновая кислота ускоряет превращение тирозина в дофамин, повышает его транспорт к нервным окончаниям, снижает норадренергическую трансмиссию.*

### ВСТУП

Кінуренова кислота (КК) є інтермедіатом кінуренинового шляху обміну триптофану, який утворюється не тільки в печінці, але й в головному мозку людини та тварин [20, 21]. У 1981-1982 рр. відкрито нейротропні ефекти хінолінової кислоти (ХК) і КК [19]. Однак залишилася недослідженою роль ендогенно утвореної КК.

Так, раніше КК відносили до конвульсантів [12]. Пізніше було виявлено неонатальний нейропротекторний і протисудомний її ефекти [20]. Останні пов'язують з дією КК на рецептори збуджувальних амінокислот [7]. Слід зазначити, що  $K_i$  для КК становить 20 – 40 мкмоль/л [2, 11], а вміст КК у мозку інтактних щурів – близько 20 пмоль/г [6].

Розглядається можливість втручання у кінурениновий шлях обміну триптофану через блокування синтезу ХК і сприяння синтезу КК [18]. Але результати оцінки нейропротекторної сили КК та ексайтотоксичності хі-

нолінату *in vivo* дають підставу піддати сумніву думку про те, що позаклітинне накопичення ХК сприятиме надлишковій активації NMDA-рецепторів, а накопичення КК може бути ефективним у протидії ексайтотоксину [15]. Про це свідчить дуже велика розбіжність між ефективними дозами ХК і КК та можливими змінами у концентрації цих метаболітів завдяки гальмуванню або активації синтезу.

Раніше нами було показано, що дієта, збагачена КК, призводить до підвищення активності індоламін-2,3-діоксигенази (ключового ферменту кінуренинового шляху обміну триптофану) у головному мозку щурів і підвищення збудливості тварин з вихідним низьким рівнем судомної готовності [3].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу КК на вміст норадреналіну (НА), дофаміну (ДА) та їх попередника тирозину у головному мозку щурів з різним рівнем судомної готовності.

© Л.Д. Попова

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на 30 щурах лінії Вістар, тестованих за чутливістю до аудіогенного подразника [1]. Використовували звуковий подразник (дзвінок) силою 96 дБ. Тривалість дії звуку – 120 с. Характер аудіогенних судомних реакцій визначали за бальною шкалою, розробленою Крушинським: 0 балів – відсутність рухового збудження під час дії звукового подразника; 1 бал – рухове збудження під час дії подразника; 2 бали – рухове збудження, яке закінчується падінням тварин на живіт; 3 бали – рухове збудження, яке закінчується падінням тварин на бік з клонічними судомами; 4 бали – рухове збудження, яке закінчується падінням тварин на бік з тонічною напругою всієї мускулатури. За загальної популяції було відібрано дві групи: з низькою (відсутність патологічної реакції протягом 120 с дії звуку, 0 балів, група Н) та високою (3–4 бали, група В) судомною готовністю. Тварин використовували в експерименті через 2 тиж після тестування. Частину тварин з різним рівнем судомної готовності протягом 2 тиж утримували на раціоні, що містив КК 75 мг/кг на добу [3, 12, 26]. КК перетинає гемато-енцефалічний бар'єр (ГЕБ) за допомогою пасивної дифузії [9]. Швидкість її надходження до головного мозку у 100 разів менша порівняно з L-кінуренином, який долає ГЕБ через транспортну систему для нейтральних амінокислот. Автори вважають, що внесок КК крові до пулу КК мозку незначний, проте є роботи, в яких було отримано терапевтичний ефект при внутрішньовенному її введенні [24, 26], а також дані про вплив перорально введеної кислоти на активність індоламін-2,3-діоксигенази та вміст серотоніну у мозку щурів [3]. Це можна пояснити опосередненими ефектами КК і зміненою проникливістю ГЕБ після судом [23] та внаслідок підвищеної концентрації ХК у головному мозку [17].

Після декапітації у тварин препарували головний мозок. Досліджували такі його регіони: кора великих півкуль, гіпоталамус, мо-

зочок і стовбур мозку. Вміст тирозину, НА та ДА визначали за методом Endo та Ogura [8]. Розділення проводили на КМЦ типу СМ – 52 (“Whatman Biochemical” Англія). КМЦ-колонку врівноважували 0,01 моль/л фосфатним буфером (рН 6,2) та наносили нейтралізований тканинний екстракт у 1–4 мл. Елюцію тирозину здійснювали при кімнатній температурі 15 мл 0,01 моль/л фосфатного буфера (рН 6,2), елюцію НА та ДА – 15 мл 0,03 моль/л фосфатного буфера (рН 6,2).

Спектрофлуориметричне визначення біогенних амінів та їх попередника здійснювали на спектрофлуориметрі МПФ – 4А (“Хітачі” Японія). Вміст тирозину визначали за власною люмінесценцією (довжина хвилі збудження – 285 нм, довжина хвилі люмінесценції – 315 нм). Вміст НА та ДА вивчали після окиснення катехоламінів [16]. Хвилі збудження та люмінесценції були для НА – 395/485, для ДА – 330/375 нм відповідно.

Статистичну обробку експериментальних результатів здійснювали за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

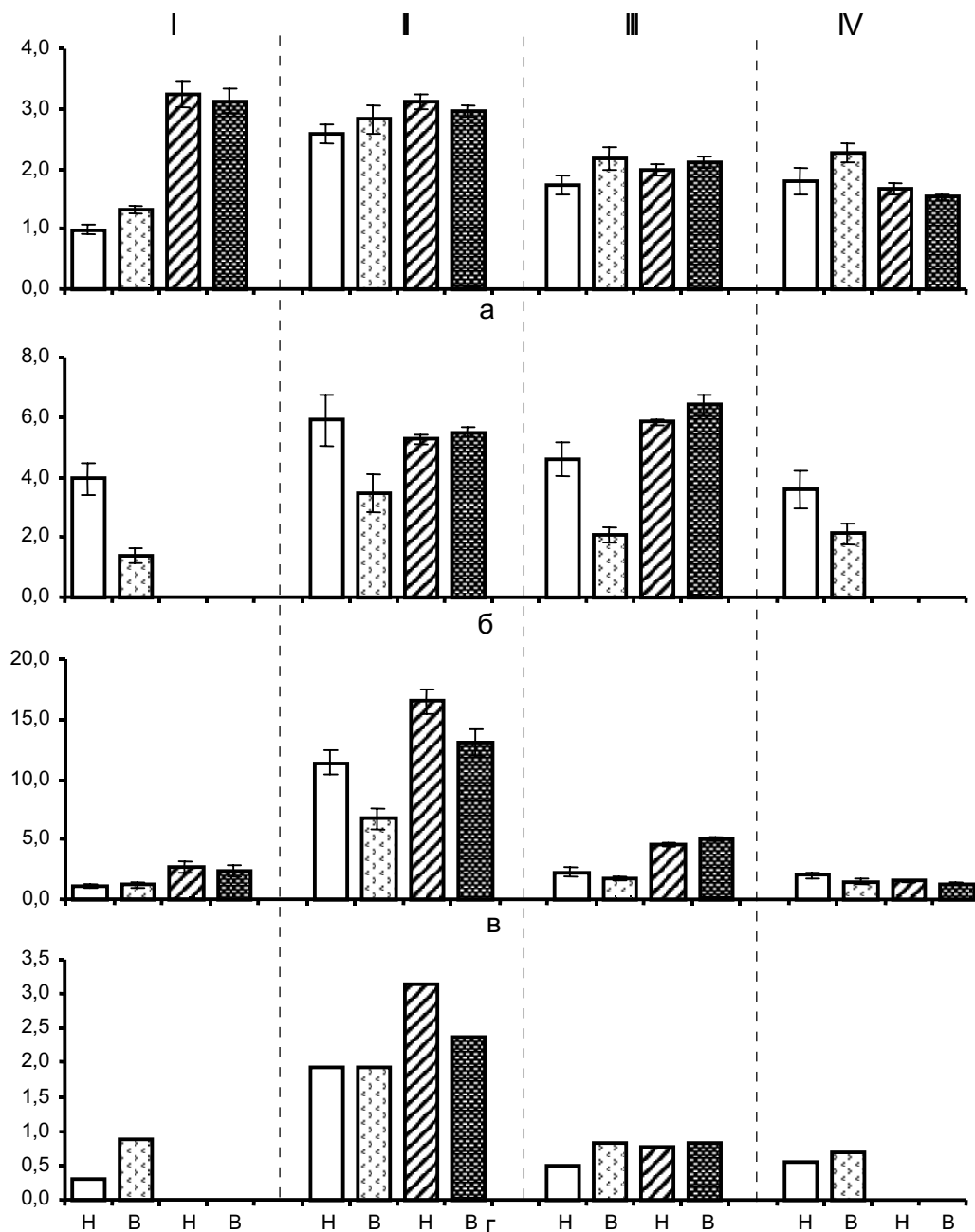
За результатами дослідження, щури з різним рівнем судомної готовності практично не відрізнялися за вмістом тирозину в усіх досліджених регіонах, за виключенням кори великих півкуль, де вміст цієї амінокислоти у щурів групи В вищий порівняно з групою Н (рис. 1а). При цьому у щурів з високою судомною готовністю спостерігалось істотне зниження вмісту НА в усіх досліджених регіонах, за виключенням стовбура (рис. 1б), що добре узгоджується з даними літератури про дефіцит норадренергічної трансмісії у центральній нервовій системі щурів, генетично схильних до епілепсії [22, 25].

Різницю у вмісті ДА у щурів груп Н і В виявлено тільки у гіпоталамусі (рис. 1в). Розрахунок коефіцієнта співвідношення між вмістом ДА та НА (рис. 1г) свідчить про відносне переважання ДА над НА у щурів групи В у

всіх досліджених структурах, за винятком гіпоталамуса. Ці результати добре узгоджуються зі здатністю ДА знижувати поріг виникнення розрядів післядії у відповідь на електричну стимуляцію мигдалеподібного

комплексу [4]. Проте є багато літературних даних, що свідчать про протилежні ефекти різних типів дофамінових рецепторів у регуляції судомної готовності [5, 10].

КК викликала значні зміни у вмісті кате-



Вплив кінуренової кислоти на вміст (нмоль/г тканини) тирозину - (а), норадреналіну - (б), дофаміну - (в) та на співвідношення дофамін/норадреналін - (г) у корі великих півкуль (I), гіпоталамусі (II) та мозочку (III) та стовбурі мозку (IV) у щурів з низьким (Н) та високим (В) рівнем судомної готовності. Світлі стовпчики відповідають контролю.

холамінів та їх попередника у щурів як з низькою, так і з високою судомною готовністю. Вміст тирозину підвищувався у корі великих півкуль обох груп тварин, у гіпоталамусі – тільки у тварин групи Н. У стовбурі щурів групи В спостерігалось зниження значення цього показника (див. рис. 1а). Вміст ДА у щурів групи Н підвищувався в усіх досліджених структурах, за виключенням стовбура, де спостерігалось зниження концентрації нейротрансмітера. У щурів групи В збільшення вмісту ДА виявлено тільки у гіпоталамусі та мозочку.

Найбільш істотні зміни стосувалися НА. У стовбурі та корі великих півкуль концентрація НА під впливом КК зменшувалася настільки, що була за межами чутливості методу. У гіпоталамусі та мозочку вміст НА, навпаки, збільшувався. Характер змін у вмісті НА був однаковим для щурів обох груп.

Беручи до уваги, що і вентральний, і дорсальний шляхи норадренергічної церебральної системи беруть початок з нейронів, локалізованих у стовбурі головного мозку, було розраховано співвідношення тирозин/НА у цьому регіоні мозку. У щурів групи В воно було вдвічі вищим, ніж у тварин з низьким рівнем збудливості, що свідчить про правомірність припущення щодо зниження біосинтезу нейротрансмітера у цієї групи тварин.

Порівняння абсолютної кількості медіаторів, коефіцієнтів співвідношення між вмістом попередника та медіатора, між кількістю медіатора в місцях локалізації нейронів і відповідних нервових терміналей дає підставу припустити, що КК посилює перетворення тирозину до ДА, суттєво підвищує його транспорт до нервових терміналей, знижує норадренергічну трансмісію. Припускають, що норадренергічна система locus coeruleus контролює компенсаторні та відновні механізми у центральній нервовій системі і що дисфункція цієї системи є критичним фактором у розвитку центральних нейродегенеративних захворювань [14]. Істотним є також підвищення під впливом КК коефіцієнта співвідношення ДА/НА, що було більш виразним у щурів групи Н.

**L.D.Popova**

#### **THE INFLUENCE OF KYNURENIC ACID ON THE CATECHOLAMINE CONTENTS IN BRAIN OF RATS WITH DIFFERENT SEIZURE SUSCEPTIBILITY**

The influence of kynurenic acid on the catecholamine contents in brain of rats with different seizure susceptibility was studied. In animals with high seizure susceptibility the decrease in norepinephrine content and the increase in the coefficient ratio between dopamine and norepinephrine have been found in the most of the regions investigated. Kynurenic acid caused considerable changes in the contents of catecholamines and their precursor in the brain of both groups of animals. The influence of kynurenate on the norepinephrine content was especially significant. The results of a comparison of the absolute contents of catecholamines, as well as the ratio between the contents of a precursor and the transmitter and the levels of the transmitter in the appropriate nervous terminals are the base to suggest that kynurenic acid enhances the conversion of tyrosine into dopamine, increases its transport to nervous terminals, and decreases the noradrenergic transmission.

*Kharkov State Medical University*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Захария Б.А. Предрасположенность организма к эпилептическим припадкам. – К.: Здоров'я, 1974. – 200 с.
2. Комиссаров И.Б., Абрамец И.И. Модуляция эффективности межнейронных связей биорегуляторами и фармакологическими средствами. – Донецк, 1994. – 160 с.
3. Попова Л.Д. Особенности обмена триптофана у животных с высокой и низкой аудиогенной судорожной готовностью: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1986. – 25 с.
4. Сергиенко Н.Г., Грищенко В.И., Логинова Г.А. Биогенные моноамины и возбудимость головного мозга. – К.: Наук. думка, 1992. – 148 с.
5. Barone D., Palma V., de Bartolomeis A. et al. Dopaminergic regulation of epileptic activity// *Neurochem. Int.* – 1992. – № 20. – P. 245 – 249.
6. Carla V., Lombardi G., Beni M. et al. Identification and measurement of kynurenic acid in the rat brain and other organs// *Anal. Biochem.* – 1988. – **169**. – P. 89 – 94.
7. Dale W.E., Dung Y., Amiridze M., Brown O.P. Evidence that kynurenine pathway metabolites mediate hyperbaric – reduced convulsions// *Toxicol. Lett.* – 2000. – **117**, № 1 – 2. – P. 37 – 43.
8. Endo J., Ogura J. Separation of biogenic amines in rat brain on a phosphorylated cellulose column// *Eur. J. Pharmacol.* – 1973. – **21**. – P. 293 – 298.
9. Fukui S., Schwarcz R., Rapoport S.I. et al. Blood-brain barrier transport of kynurenines: implication for brain synthesis and metabolism// *J. Neurochem.* – 1991. – **56**, № 6. – P. 2007 – 2017.

10. George B., Kulkarni S.K. Dopaminergic modulation of lithium/ pilocarpine – induced status epilepticus in rats// *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* – 1997. – **19**, № 7. P. 481 – 486.
11. Joel K., Lamdani-Itkin H., Sokolovsky M. The glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor channel: differences between the binding of HA-966 and of 7-chlorokynurenic acid// *J. Neurochem.* – 1990. – **54**, № 5. – P. 1576 – 1583.
12. Lapin I.P. Kynurenines and seizures// *Epilepsia.* – 1981. – 22. – P. 257 – 265.
13. Lee S., Schwarcz R. Excitotoxic injury stimulates pro-drug-induced chlorokynurenate formation in the rat striatum in vivo// *Neurosci. Lett.* – 2001. – **304**, № 3. – P. 185 – 188.
14. Martel J. C., Chopin P., Marien M. Drug treatments to reduce excitotoxicity in vivo: a potential for alpha-2-adrenoceptor antagonists// *Amino Acids.* – 2000. – **10**, № 1. – P. 239 – 252.
15. Obrenovitch T.P., Urenjak J. In vivo assesment of kynurenate neuroprotective potency and quinolinate excitotoxicity// *Ibid.* – P. 299 – 309.
16. Schlupt M., Liichtensteiger W., Langemann H. A fluorimetric micromethod for the simultaneous determination of serotonin, noradrenaline and dopamine in milligram amounts of brain tissue// *Biochem. Pharmacol.* – **23**. – P. 2437 – 2446.
17. St'astny F., Skultetyova, Pliss L., Jezova D. Quinolinic acid enhances permeability of rat brain microvessels to plasma albumin// *Brain Res. Bull.* – 2000. – **53**, №4. – P. 415 – 420.
18. Stone T.W. Inhibitors of the kynurenine pathway// *Eur. J. Med. Chem.* – 2000. – **35**, № 2. – P. 179 – 186.
19. Stone T.W. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance// *Prog. Neurobiol.* – 2001. – **64**, № 2. – P. 185 – 218.
20. Turski W., Nakamura M., Todd W.P. et al. Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue// *Brain Res.* – 1988. – **454**. – P. 164 – 169.
21. Turski W.A., Gramsbergen J.B.P., Traitler H., Schwarcz R. Rat brain slices reduce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine// *J. Biochem.* – 1989. – **52**. – P. 1629 – 1636.
22. Van Q.S., Dailly J.W., Steenbergen J.L., Jobe P.C. Anti-convulsant effect of enhancement of noradrenergic transmission in the superior colliculus in genetically epilepsy-prone rats (GEPRs); a microinjection study// *Brain Res.* – 1998. – **780**, № 2. – P. 199 – 209.
23. Vezzani A., Stasi M.A., Wu H.G. et al. Studies on the potential neurotoxic and convulsant effects of increased blood levels of quinolinic in rats with altered blood-brain barrier permeability// *Exp. Neurol.* – 1989. – **106**, №1. – P. 90 – 98.
24. Wu H.G., Guidetti P., Goodman J.H. et al. Kynurenergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus in vivo// *Neuroscience.* – 2000. – **97**, №2. – P. 243 – 251.
25. Yourick D.L., La Placa M.C., Meyerhoff J.L. Norepinephrine – stimulated phosphatidyl inositol metabolism in genetically epilepsy – prone and kindled rats // *Brain Res.* – 1991. – **651**, № 1-2. – P. 315 – 318.
26. Zhu S.G., Mc Geer E.G., Mc Geer F.L. Effect of MK-801, kynurenate, glycine, dextrophan and 4-acetylpyridine on striatal toxicity of quinolinate// *Ibid.* – 1989. – **481**, № 2. – P. 356 – 360.

*Харків. мед. ун-т М-ва охорони здоров'я України*

*Матеріал надійшов до редакції 25.02.2002*