

Особенности аминокислотного состава цереброспинальной жидкости и сыворотки крови у больных с острым ишемическим инсультом

Ё.Н. Маджидова, Х.А. Расулова, Ж.Ф. Зиявитдинов

Актуальность проблемы инсульта обусловлена его большой распространенностью, высокой летальностью, инвалидизацией, длительными сроками нетрудоспособности лиц, перенесших инсульт. Заболевание широко распространено повсеместно, причем ишемический инсульт существенно преобладает над геморрагическим (4–5 : 1). Ежегодно от инсульта погибают около 5 млн. человек, из них в остром периоде – 35%, в первый год – до 50% [1, 3, 4]. В Узбекистане заболеваемость церебральными инсультами колеблется от 0,9 до 1,4 на 1000 населения, в г. Ташкенте она составляет 1,5 на 1000 населения. Остаточная инвалидность вследствие церебрального инсульта в Узбекистане составляет 3,2 на 10000 населения. Неблагоприятная экологическая обстановка в регионе Приаралья (в связи с высыханием Аральского моря повышается степень минерализации питьевой воды и происходят солевые бuri) способствовала увеличению в 2–3 раза заболеваемости общей и цереброваскулярной патологией.

В последние годы широко обсуждается участие нейромедиаментных аминокислот в развитии ишемических повреждений мозга [2, 4–9]. Аминокислотный состав цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) отражает эффективность процессов обмена между ЦСЖ – средой обитания мозга, тканью мозга и кровью [5, 6]. При анализе патофизиологических механизмов острого ишемического инсульта (ОИИ) исследование аминокислотного состава ЦСЖ представляет большой интерес в связи с особым физиологическим значением аминокислот мозга для центральной нервной системы [4, 6]. Можно предположить, что понимание роли нейромедиаментных аминокислот в развитии ишемических повреж-

дений мозга позволит разработать новые подходы к их патогенетическому лечению.

До последнего времени изучению свободных аминокислот жидких сред организма уделялось мало внимания, в основном из-за отсутствия доступных методов их определения. Это стало возможным благодаря внедрению в исследовательскую практику метода хроматографии на бумаге. Тем не менее для определения концентрации свободных аминокислот многие исследователи подвергали анализу только сыворотку крови или определяли суммарное количество аминного азота, что не отражает тех многообразных процессов, которые протекают в организме при различной патологии. Описаны разнообразные методы аминокислотного анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и предколонной модификации. В последнее время наиболее часто применяются модифицирующие агенты DABS-Cl (диметиламиноазобензол сульфонил хлорид), OPA (ортофталевый диальдегид), FMOC (флуоренил-метилхлорформат) и комбинированная модификация с помощью FMOC и OPA [10]. Среди различных способов предколонной модификации использование PITC (фенилизотиоцианат), описанного впервые S.A. Cohen и D.J. Strydom [10], дает возможность идентифицировать 1 нмоль каждой аминокислоты при длине волны детекции 269 нм.

Целью настоящего исследования было определение концентрации свободных аминокислот в ЦСЖ и сыворотке крови у больных с ОИИ методом ВЭЖХ.

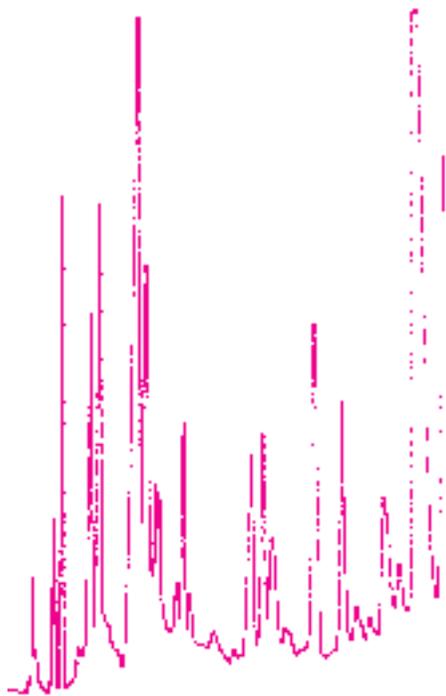
Материал и методы исследования

Было обследовано 62 больных, из них 48 пациентов с ОИИ (25 мужчин и 23 женщины – основная группа, или 1-я) и 14 больных дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) в качестве группы сравнения (2-я). Средний возраст всех обследованных составил $61,36 \pm 0,19$ года. Все пациенты с ОИИ поступили в неврологический стационар в течение первых суток, основная часть из них (57%) была доставлена в первые 6 ч от начала заболевания, а в период с 7 до 12 ч – 29% больных.

Ёкутхон Набиевна Маджидова – профессор, зав. кафедрой нервных болезней Ташкентской медицинской академии.

Хуршидахон Абдубориевна Расулова – канд. мед. наук, Институт биоорганической химии им. А.С. Садыкова АН РУз.

Жамолитдин Фазлитдинович Зиявитдинов – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории химии белков и пептидов Института биоорганической химии им. А.С. Садыкова АН РУз.



Пример хроматограммы стандартной смеси ФТК-аминокислот.

В условиях стационара больные проходили общеклиническое, неврологическое, инструментальное, клинико-лабораторное, биохимическое обследование. Для объективизации степени тяжести состояния больных и выраженности неврологического дефекта у пациентов с ОИИ оценивались клинические проявления, динамика восстановления неврологических функций, при этом основой для оценки служила Скандинавская шкала инсульта. Диагноз у всех больных основывался на комплексной оценке жалоб пациентов, анамнестических сведений, клинических критериев, а также данных дополнительных методов исследования (люмбальная пункция, компьютерная томография головного мозга, нейрофизиологические исследования).

Люмбальную пункцию и забор венозной крови для биохимического анализа проводили по стандартной методике.

Выделение свободных аминокислот. Концентрацию свободных аминокислот определяли по методу [10]. Осаждение белков и пептидов проводили в центрифужных стаканах. Для этого к 1 мл исследуемого образца добавляли по 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Через 10 мин осадок отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 мин. Отделив 0,5 мл надосадочной жидкости, лиофильно высушивали образец. Дальнейшие эксперименты проводили с лиофильно высушенным образцом.

Анализ ВЭЖХ ФТК-производных аминокислот. Синтез фенилтиокарбамид (ФТК)-производных свободных аминокислот проводили по методу [10]. Он состоит из следующих этапов.

1. Приготовление раствора ТЭА + этанол + вода в соотношении 1 : 7 : 1. К каждому образцу добавляется по 250 мл

раствора, затем раствор выдерживается в течение 10 мин и досуха упаривается под вакуумом. Этот этап повторяется дважды для нейтрализации трихлоруксусной кислоты и для достижения щелочной реакционной среды.

2. Приготовление раствора ТЭА + этанол + вода + фенилтиотиоционат в соотношении 1 : 7 : 1 : 1. К каждому образцу добавляется по 250 мл раствора, затем раствор выдерживается в течение 30 мин и образцы досуха упариваются под вакуумом.

3. К каждому образцу добавляется по 250 мл этанола, затем раствор выдерживается в течение 10 мин и образцы досуха упариваются под вакуумом. Идентификацию ФТК-аминокислот проводили на хроматографе Du Pont 8800 на колонке 250/8/4 Nucliosil 100-5 C₁₈. Раствор А: 0,14М CH₃COONa + 0,05% ТЭА pH 6,4, раствор В: CH₃CN. Скорость потока 1,2 мл/мин, поглощение 269 нм. Градиент (%/мин): 1–6%/0–5 мин; 6–30%/5,1–40 мин; 30–60%/40,1–45 мин; 60–100%/45,1–50 мин.

4. Качественный анализ и количественный расчет концентрации исследуемых свободных аминокислот проводили в сравнении с площадями пиков стандартных и исследуемых ФТК-аминокислот.

Для статистической обработки полученных данных использовался пакет программ Microsoft Excel для персонального компьютера с применением коэффициента Стьюдента.

Результаты и обсуждение

На основании оценки клинических проявлений, динамики восстановления неврологических функций и данных Скандинавской шкалы инсульта все пациенты с ОИИ были разделены на четыре подгруппы. В 1-ю подгруппу было включено 4 больных (8,3%) с легкой степенью ОИИ (суммарный клинический балл по шкале был 44,4 ± 1,3). Во 2-ю подгруппу вошел 21 больной (43,7%) со средней степенью тяжести ОИИ (суммарный клинический балл 24,2 ± 0,9). В 3-ю подгруппу вошло 18 больных (37,5%) с тяжелой степенью тяжести ОИИ (суммарный клинический балл 10,3 ± 0,93). В 4-ю подгруппу включили 5 больных (10,5%) с крайне тяжелым течением ОИИ (суммарный клинический балл 6,2 ± 0,8).

Ведущими этиологическими факторами ОИИ явились атеросклероз (85,7%), его сочетание с гипертонической болезнью (64,3%) и сахарным диабетом (10,7%).

Среди больных с легкой степенью тяжести ишемического инсульта сознание оставалось ясным у всех пациентов, при ОИИ средней степени тяжести отмечалось оглушенное сознание (у 38,1% пациентов), при тяжелом ОИИ наблюдалось оглушение (у 72,2%) и сопор (у 27,8%), все коматозные больные входили в группу с крайне тяжелым ОИИ.

Во всех подгруппах больных ОИИ наблюдались общемозговые симптомы: в 1-й подгруппе – головная боль (50%), головокружение (75%), во 2-й подгруппе – головная боль (23,8%), головокружение (47,6%), менингеальный синдром (14,3%), в 3-й подгруппе – головная боль (33,3%),

головкружение (38,9%), менингеальный синдром (11,1%), рвота (16,7%), в 4-й подгруппе – менингеальный синдром (40%) и рвота (20%).

Профиль элюции свободных аминокислот, получаемых из биологических жидкостей, и условия разделения стандартного цикла представлены на рисунке. Полученные результаты приведены в табл. 1 и 2.

Было выявлено снижение содержания в ликворе следующих аминокислот: метионина – в 2,86 раза, треонина – в 2,37 раза, изолейцина и лейцина – в 1,56 раза, гистидина – в 1,54 раза, аланина – в 1,5 раза, лизина – в 1,37 раза, фенилаланина – в 1,07 раза. При этом в ЦСЖ наблюдалось увеличение концентрации серина (в 1,12 раза), валина (в 1,73 раза), пролина (в 2,63 раза), тирозина (в 1,08 раза) и триптофана (в 1,09 раза). Уровень цистеина остался без изменений. При анализе свободных аминокислот в сыворотке крови выявлено увеличение содержания метионина в 1,38 раза, гистидина в 1,38 раза, лизина в 1,13 раза.

Из табл. 2, в которой отдельно представлен уровень нейроактивных аминокислот, видно, что при ОИИ по сравнению с группой ДЭ уровень аргинина в ЦСЖ снижался в 3,87 раза ($142,5 \pm 71,4$ нмоль/мл), тогда как в сыворотке он повышался в 2,01 раза ($1068,9 \pm 36,9$ нмоль/мл). В то же время уровни возбуждающих аминокислот в ЦСЖ нарастали уже в первые 6 ч: аспартата – в 3,29 раза ($422,9 \pm 186,4$ нмоль/мл), глутамата – в 12,41 раза ($6461,7 \pm 1678,3$ нмоль/мл) ($p < 0,05$). При этом в плазме крови концентрация аспартата имела тенденцию к возрастанию в 1,31 раза ($596,8 \pm 57,4$ нмоль/мл), а концентрация глутамата снижалась в 2,36 раза ($169,6 \pm 70,5$ нмоль/мл) ($p < 0,05$). Концентрация тормозной аминокислоты глицина в ЦСЖ возрастала в 1,11 раза ($944,2 \pm 432,2$ нмоль/мл).

При сопоставлении данных исследования выявлено, что содержание нейроактивных аминокислот существенно не коррелирует с локализацией очага поражения, установленной на основании клинико-инструментальных данных. Однако при сравнении уровней аминокислот в ЦСЖ в зависимости от исходной степени тяжести состояния больных выявлены значительное преобладание глутамата и глицина и снижение аргинина в группе тяжелых и крайне тяжелых больных по сравнению с больными со средней степенью тяжести заболевания. В сыворотке наблюдались противоположные изменения.

Некоторые авторы [4] установили, что при ОИИ в ЦСЖ не наблюдается повышения концентрации ни возбуждающих, ни тормозных нейроактивных аминокислот и на со-

Таблица 1. Аминокислотный состав ЦСЖ и сыворотки крови при остром ишемическом инсульте ($M \pm m$)

Аминокислота	ЦСЖ		Сыворотка крови	
	в нмоль/мл	в % от общего состава	в нмоль/мл	в % от общего состава
Аланин	$99,9 \pm 33,8$	$0,8 \pm 0,1$	$2207,3 \pm 186,2$	$14,1 \pm 1,1$
Аргинин	$142,5 \pm 71,4^*$	$1,1 \pm 0,4^*$	$1068,9 \pm 36,9^*$	$6,8 \pm 0,1^*$
Аспартат	$422,9 \pm 186,4$	$3,3 \pm 1,8$	$596,8 \pm 57,4$	$3,8 \pm 0,3$
Цистеин	$29,4 \pm 9,8$	$0,2 \pm 0,1$	$310,4 \pm 17,2^*$	$1,9 \pm 0,1^*$
Глутамат	$6461,7 \pm 1678,3^*$	$47,1 \pm 6,9^*$	$169,6 \pm 70,5^*$	$1,1 \pm 0,5^*$
Глицин	$944,2 \pm 432,2$	$7,2 \pm 3,4$	$467,4 \pm 147,6$	$2,9 \pm 0,8$
Гистидин	$150,4 \pm 53,4$	$1,1 \pm 0,2$	$2573,1 \pm 54,1$	$16,4 \pm 0,2$
Изолейцин	$18,6 \pm 12,8^*$	$0,1 \pm 0,1^*$	$449,9 \pm 30,1^*$	$2,9 \pm 0,2^*$
Лейцин	$18,6 \pm 12,8^*$	$0,1 \pm 0,1^*$	$450,7 \pm 30,2^*$	$2,9 \pm 0,2^*$
Лизин	$218,6 \pm 58,1$	$1,6 \pm 0,2$	$834,8 \pm 5,5$	$5,3 \pm 0,2$
Метионин	$909,1 \pm 158,1^*$	$6,7 \pm 0,4^*$	$1014,1 \pm 38,7^*$	$6,5 \pm 0,2^*$
Фенилаланин	$767,9 \pm 136,1$	$5,7 \pm 1,2$	$72,1 \pm 11,9$	$0,4 \pm 0,1$
Пролин	$816,4 \pm 392,9^*$	$5,8 \pm 2,1^*$	$2823,1 \pm 178,4$	$18,1 \pm 0,9$
Серин	$364,4 \pm 79,1$	$2,7 \pm 0,6$	$250,4 \pm 30,6$	$1,6 \pm 0,2$
Треонин	$107,7 \pm 17,7^*$	$0,8 \pm 0,1^*$	$143,1 \pm 29,9$	$0,9 \pm 0,2$
Триптофан	$769,2 \pm 137,2$	$5,7 \pm 1,2$	$1098,3 \pm 125,3$	$6,9 \pm 0,7$
Тирозин	$911,5 \pm 158,4$	$6,7 \pm 0,4$	$715,8 \pm 45,7$	$4,6 \pm 0,2$
Валин	$435,8 \pm 137,7^*$	$3,3 \pm 1,1^*$	$437,8 \pm 42,5$	$2,8 \pm 0,3$

* Достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 2. Содержание нейроактивных аминокислот в ЦСЖ и сыворотке крови в обследованных группах, в нмоль/мл ($M \pm m$)

Аминокислота	ОИИ		ДЭ	
	ЦСЖ	сыворотка крови	ЦСЖ	сыворотка крови
Аргинин	$142,5 \pm 71,4^*$	$1068,9 \pm 36,9^*$	$412,8 \pm 69,2$	$567,2 \pm 44,5$
Аспартат	$422,9 \pm 186,4$	$596,8 \pm 57,4$	$392,9 \pm 172,1$	$429,2 \pm 48,9$
Глутамат	$6461,7 \pm 1678,3^*$	$169,6 \pm 70,5^*$	$387,3 \pm 441,8$	$425,0 \pm 63,7$
Глицин	$944,2 \pm 432,2$	$467,4 \pm 147,6$	$673,9 \pm 402,1$	$339,7 \pm 16,9$

* Достоверность различий по сравнению с группой ДЭ ($p < 0,05$).

держание нейроактивных аминокислот существенно не влияют тяжесть инсульта, глубина нарушения сознания, степень пареза или локализация очага. Исключение составил глутамат в ЦСЖ: при тяжелом состоянии он был достоверно ниже, чем при среднетяжелом течении инсульта. Видимо, это связано с образованием зоны некроза и “ишемической полутени”, притом что в дальнейшем сдвиги медиаторного пула нейроактивных аминокислот в ЦСЖ сглаживаются и приходят в относительное равновесие. В плазме крови сдвиги несколько иные: выявлено достоверное увеличение концентрации глутамата на 102%. Авторы считают, что повышение уровня глутамата в плазме происходит за счет выхода его из некротизированных участков, нарушения функции транспортных систем и эти изменения (как и изменения концентрации другой возбуждающей аминокислоты – аспартата) могут

служить определенным неблагоприятным маркером инсульта [4].

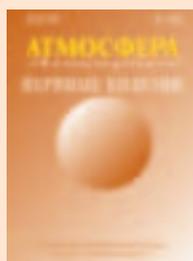
Ряд исследователей установили разобщение в динамике изменений уровня возбуждающих и тормозных аминокислотных нейротрансмиттеров, указывая на развитие дисбаланса между возбуждающими и тормозными механизмами с признаками недостаточности защитного торможения в первые часы инсульта: повышение уровня глутамата, аспартата и снижение или нормальное значение концентрации глицина. Затем (через 18–24 ч) глицин повышался в 3,5 раза, что свидетельствовало об отсроченном включении компенсаторных механизмов защитного торможения. Глицин, возможно, играет двойственную роль при ишемии, выступая как коагонист глутаматных NMDA-рецепторов [2, 7].

Полученные в настоящей работе данные позволили: 1) проследить тенденции изменения содержания свободных аминокислот в ликворе и сыворотке крови у больных с ОИИ; 2) провести сравнение показателей в обеих биологических жидкостях, различия между которыми обусловли-

ваются специфичностью их состава и функций. Результаты исследования представляют определенный интерес и могут иметь значение в уточнении патохимии и патогенеза острых нарушений мозгового кровообращения. По нашему мнению, анализ концентрации свободных аминокислот в ЦСЖ и сыворотке крови может помочь в оценке эффективности проводимой терапии и адекватности выбранной тактики лечения.

Список литературы

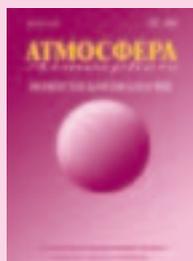
1. Ахмедов О.Т. и др. // Неврология. 2002. № 16. С. 33.
2. Гусев Е.И. и др. // Журн. неврол. и психиатр. 1999. № 5. С. 55.
3. Гусев Е.И. и др. // Consilium Medicum. 2003. Спец. вып. "Проблемы цереброваскулярной патологии и инсульта". С. 5.
4. Кулеш С.Д., Дорошенко Е.М. // Журн. неврол. и психиатр. 2000. № 5. С. 64.
5. Bosche B. // Stroke. 2004. V. 35. P. 74.
6. Huang Y., McNamara J.O. // Cell. 2004. V. 118. P. 687.
7. Gusev E.I., Skvortsova V.I. // Usp. Fiziol. Nauk. 2002. V. 33. P. 80.
8. Jansen M., Dannhard G. // Eur. J. Med. Chem. 2003. V. 38. P. 661.
9. Zhao X. et al. // Brain Res. 2003. V. 966. P. 308.
10. Cohen S.A., Strydom D.J. // Anal. Biochem. 1988. V. 17. P. 1. ●



Продолжается подписка на научно-практический журнал "Атмосфера. Нервные болезни"

Подписку можно оформить в любом отделении связи России и СНГ.
Журнал выходит 4 раза в год. Стоимость подписки на полгода по каталогу агентства "Роспечать" – 80 руб., на один номер – 40 руб.

Подписной индекс 81610



Продолжается подписка на научно-практический журнал "Атмосфера. Новости кардиологии"

Подписку можно оформить в любом отделении связи России и СНГ.
Журнал выходит 4 раза в год. Стоимость подписки на полгода по каталогу агентства "Роспечать" – 80 руб., на один номер – 40 руб.

Подписной индекс 37211



Продолжается подписка на научно-практический журнал "Атмосфера. Пульмонология и аллергология"

Подписку можно оформить в любом отделении связи России и СНГ.
Журнал выходит 4 раза в год. Стоимость подписки на полгода по каталогу агентства "Роспечать" – 100 руб., на один номер – 50 руб.

Подписной индекс 81166