

## ИЗМЕНЕНИЕ ПУЛА АМИНОТИОЛОВ В НЕЙРОНАХ ВИСОЧНОЙ КОРЫ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИЙ АМИКАЦИНА

Гладкий М. Л.

*Гродненский государственный медицинский университет  
Гродно, Беларусь*

**Введение.** Окислительный стресс (ОС) – это патологический процесс, возникающий в результате дисбаланса между синтезом активных форм кислорода (АФК) и способностью антиоксидантной системы клетки к их нейтрализации. ОС в нейронах рассматривается как регуляторный компонент в процессе развития неблагоприятных исходов для организма таких как: старение, развитие нейродегенеративных заболеваний и потеря специфических функций зон коры головного мозга.

Известно, что мозг потребляет большое количество кислорода – около 20-25% от всего кислорода, поступающего в организм. Высокое потребление кислорода является высоким риском к нарушению прооксидантно-оксидантного равновесия в головном мозге, что делает его высоко восприимчивым к развитию ОС [1].

Среди причин гибели нейронов выделяют действие фармакологических препаратов, в частности, антибиотиков – аминогликозидов.

Аминогликозиды (АГ) – это класс антибиотиков широкого спектра действия (гентамицин, амикацин, тобрамицин, неомицин и др.). Наравне с высокой эффективностью и низкой стоимостью производства, данные препараты обладают негативными эффектами – нефротоксичностью, которая выражается в повреждении канальцев нефрона почки и ототоксичностью, что приводит к поражению рецепторных клеток слухового анализатора.

Одними из основных веществ, которые принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях являются низкомолекулярные серосодержащие соединения: цистеин (Cys), цистеинилглицин (CysGly), гомоцистеин (Hcy), глутатион (GSH) и  $\gamma$ -глутамилцистеин ( $\gamma$ -GluCys), а также соответствующие им белковые смешанные дисульфиды [2, с. 2570].

Несмотря на то, что механизм ототоксичности достаточно хорошо изучен, данных о повреждении непосредственно коркового отдела слухового анализатора – нейронов височной доли, крайне мало. Исходя из всего вышперечисленного, представляется интересным исследовать изменение концентраций аминотиолов в нейронах височной доли.

**Цель.** Исследовать концентрации цистеина (Cys), цистеинилглицина (CysGly), гомоцистеина (Hcy), глутатиона (GSH), цистеамина, и  $\gamma$ -глутамилцистеина ( $\gamma$ -GluCys) у крыс контрольной и опытной групп после введения лекарственного препарата амикацин.

**Методы исследования.** Исследования выполнены на 16 белых беспородных крысах-самцах массой 200-220 г (8 крыс группы контроля и 8 крыс опытной группы). Животных содержали в стандартных условиях вивария УО «Гродненский государственный медицинский университет» на полноценном рационе. Соблюдали все требования Директивы Европейского Парламента и Совета №2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей. На данное исследование получено разрешение Комитета по биомедицинской этике УО «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол №5 от 27.02.2020).

Введение лекарственного средства Амикацин проводилось крысам опытной (n=8) группы однократно внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг в течение 14 дней. Крысам из контрольной группы (n=8) также ежедневно внутрибрюшинно вводился физиологический раствор 0,9% NaCl в количестве 500 мкл в течение 14 дней. По истечении 14 дней проводили декапитацию.

После декапитации на холоде извлекали головной мозг, повторно промывали его 0,9% NaCl и выделяли отдел височной доли. Печень также извлекали на холоде, повторно промывали 0,9% NaCl. Кровь забиралась в пробирки с гепарином. Плазма крови отделялась центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин.

Определение Hcy, Cys, CysGly,  $\gamma$ -GluCys, GSH проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции (379/510 нм). Метод основан на предколоночной дериватизации SH-содержащих соединений с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом (SBD-F).

Образцы ткани головного мозга и печени гомогенизировали в 5-кратном объеме 0,15 М KCl, содержащего (на 200 мл) 1,63 мл 4% раствора N-ацетилцистеина (внутренний стандарт – 1мМ) и 2,4 г ТСЕР, оставляли на 30 мин., осаждали центрифугированием при 4°C 15 мин. при 16000g. Для дериватизации к смеси 4 мкл 1,55 М NaOH, 25 мкл 0,125 М Na-боратного буфера pH 9,5, и 10 мкл раствора SBD-F (1 мг/мл) в таком же буфере добавляли 20 мкл супернатанта и инкубировали 1 час при 60°C. В систему вводили 20 мкл реакционной смеси. Использовали колонку Zorbax SB C<sub>18</sub>, с размером частиц 3,5 мкм (размеры колонки 2,1×150 мм) в тандемном включении. Подвижная фаза: 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20 мг/л ЭДТА (А), ацетонитрил вода 7/3 (об./об.) (В); скорость потока 0,2 мл/мин, 29°C. Градиентное элюирование: 0 мин – 0% В; 26 мин. – 0% В; 47 мин. – 15% В; 53 мин. – 25% В; 55 мин. – 0% В; 67 мин. – ввод пробы. Детектирование по флуоресценции, 379/510 нм.

Пробы плазмы смешивали с 0,5 мМ раствором N-ацетилцистеина (внутренний стандарт) и раствором трис-(карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) (100 мг/мл). Пробы инкубировали 30 мин. при комнатной температуре, белки осаждали 10% ТХУ и центрифугировали при 4°C 15 мин. при 16000 g. К безбелковому супернатанту добавляли смесь для дериватизации, состоящую из 1,55 М NaOH, 0,125 М Na-боратного буфера, pH 9,5 и раствора SBD-F (1 мг/мл). Инкубировали 1 ч. при 60°C. В систему вводили 5 мкл реакционной смеси. Растворы стандартов, используемые для калибровки

хроматографической системы, обрабатывали аналогичным способом. Колонка Zorbax Eclipse Plus SB C18, 2,1×150 мм. Подвижная фаза: 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20 мг/л ЭДТА (А), ацетонитрил/вода 7/3 (об./об.) (В). Разделение – с градиентным элюированием.

При определениях использовали прибор ВЭЖХ Agilent 1200 с 4-канальной системой подачи растворителя с вакуумным дегазатором, термостатируемый автосамплер, термостат колонок, детектор флуоресценции. Обработка хроматограмм производилась программой Agilent ChemStation V.04.02. Использовались реактивы для приготовления подвижных фаз квалификации ОСЧ, трижды дистиллированная вода, центрифуга Biofuge Primo R+, лабораторная баня Daihan WiseBath WB-11.

**Результаты и их обсуждение.** После введения лекарственного препарата амикацин у крыс опытной группы наблюдается изменение баланса в концентрации основных аминокислот. Так, содержание Cys в опытной группе, по сравнению с контролем, ниже в 1,5 раза. Аналогично с Cys, было обнаружено резкое снижение концентрации основного антиоксиданта – GSH, которое составило 15%.

В отличие от Cys и GSH, введение аминокислоты привело к повышению концентрации цистеина на 50% в сравнении с контролем. Любопытная тенденция обнаружена с промежуточным продуктом метаболизма метионина – Hcy. Его содержание также растет в опытной группе животных и превышает концентрацию в 1,5 раза, чем в контроле.

Количество цистеина в опытной группе выросло на 50% по сравнению с контрольной группой. А также было обнаружено, что синтез токсического продукта метаболизма метионина – гомоцистена, увеличился в 1,5 раза в опытной группе животных, которым вводился препарат амикацин.

Промежуточный метаболит GSH – CysGly и предшественник GSH –  $\gamma$ -GluCys статистически значимых изменений в концентрации не показали, однако, в случае с CysGly отмечается тенденция к накоплению данного соединения в нейронах височной доли головного мозга опытных животных, а пул  $\gamma$ -GluCys наоборот истощается.

Одним из путей синтеза Cys является реакция транссульфурации. Исследования метаболизма астроцитов показали, что данный путь имеет значительное влияние в контексте резервного пути синтеза Cys и нарушение в его синтезе может приводить к истощению содержания Cys [3, с. 203]. Исходя из этого, истощение Cys может быть связано с нарушением пути транссульфурации, на что также указывает более высокий уровень Hcy в опытной группе животных.

Снижение концентрации GSH в нейронах височной доли головного мозга можно объяснить недостатком одного из незаменимых аминокислотных компонентов – Cys [4].

Цистеин – метаболит цистамина. Увеличение его пула можно объяснить высокоинтенсивной деградацией кофермента-А. Кроме того, цистеин может замещать L-гомоцистеин в качестве тиолового ко-субстрата в

каталитической реакции цистатионин-β-синтазы (CBS) (Shen et al 2005), что приводит к образованию тиализина (S-(2-аминоэтил)-L-цистеина). Данная реакция при участии CBS с использованием цистеамина может происходить, в частности, в мозге, где присутствует очень мало цистеаминдиоксигеназы и большее количество фермента CBS [5, с. 556].

**Выводы.** Введение лекарственного препарата амикацин однократно внутривенно в дозе 200 мг/кг в течение 14 дней приводит к изменению пула основных веществ, которые принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях организма: цистеина (Cys), цистеинилглицина (CysGly), глутатиона (GSH), цистеамина, и γ-глутамилцистеина (γ-GluCys), а также к изменению концентрации гомоцистеина (Hcy).

Истощение пула GSH является важнейшим маркером развития окислительного стресса в нейронах головного мозга, что, в свою очередь, также может приводить к гибели нейронов и потере основной функции височной доли – восприятия звуков раздражителей.

Повышение содержания Hcy также может индуцировать развитие окислительного стресса, так как данный аминотиол известен своими токсическими свойствами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Copper supplementation alleviates hypoxia-induced ferroptosis and oxidative stress in neuronal cells / J. Wang, Y. Zou, R. Guan [et al.] // *Int J Mol Med*. 2024. – Vol. 54, № 6. – Art. 117. – doi: 10.3892/ijmm.2024.5441.
2. Involvement of oxidative stress and toll-like receptor-4 signaling pathways in gentamicin-induced nephrotoxicity in male Sprague Dawley rats / Z. Pakfetrat, S. Janfeshan, F. Masjedi [et al.] // *Drug Chem Toxicol*. – 2022. – Vol. 45, № 6. – P. 2568-2575. – doi: 10.1080/01480545.2021.1977024.
3. McBean, G. J. The transsulfuration pathway: a source of cysteine for glutathione in astrocytes. / G. J. McBean. // *Amino Acids*. – 2012. – Vol. 42, № 1. – P. 199-205. – doi: 10.1007/s00726-011-0864-8.
4. Pérez-Sala, D. Appraising the Role of Astrocytes as Suppliers of Neuronal Glutathione Precursors / D. Pérez-Sala, M. A. Pajares // *Int. J. Mol. Sci*. – 2023. – Vol. 24, № 9. – Art. 8059. – doi: 10.3390/ijms24098059.
5. Cysteamine revisited: repair of arginine to cysteine mutations / L. Gallego-Villar, L. Hannibal, J. Häberle [et al.] // *J Inher Metab Dis*. – 2017. – Vol. 40, № 4. – P. 555-567. – doi: 10.1007/s10545-017-0060-4.