

УДК 57.07

ДИНАМИКА ПРИЖИЗНЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТАБОЛИТОВ АМИНОКИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

Н. А. Семенова^{1,2,3}, П. Е. Меньшиков^{1,2,3}, А. В. Манжурцев^{1,3,*},
М. В. Ублинский^{1,3}, Т. А. Ахадов³, член-корреспондент РАН С. Д. Варфоломеев^{1,4}

Поступило 10.07.2018 г.

Впервые одновременно определены внутриклеточные концентрации N-ацетиласпартата (NAA), аспартата (Asp) и глутамата (Glu) в головном мозге человека *in vivo* и исследовано влияние тяжёлой черепно-мозговой травмы на процессы синтеза NAA в остром и отдалённом посттравматическом периоде. В неповреждённых по данным диагностической магнитно-резонансной томографии лобных долях через сутки после травмы выявлено падение содержания Asp и Glu соответственно на 45 и 35% при снижении NAA лишь на 16%. Обнаружена отрицательная корреляция между концентрацией NAA и отношением концентраций Asp/Glu. В отдалённом периоде уровень Glu нормализовался, уровень Asp оставался ниже нормы на 60%, содержание NAA было снижено на 65% относительно нормы, показатель Asp/Glu достоверно снизился. Полученные результаты выявили ведущую роль нейронального аспартат-малатного челнока в нарушении синтеза NAA.

Ключевые слова: магнитно-резонансная спектроскопия, черепно-мозговая травма, N-ацетиласпартат, аспартат, глутамат, головной мозг человека.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524842238-242>

Производное аспарагиновой кислоты N-ацетиласпартат (NAA) играет особую роль в прижизненных исследованиях метаболизма головного мозга. При высоких концентрациях (~10 мМ/кг) это соединение присутствует исключительно в нейронах [1]. В спектрах протонного магнитного резонанса (¹H МРС) головного мозга *in vivo* хорошо детектируется интенсивный синглетный сигнал N-ацетильной группы NAA. Показано [2], что интенсивность этого сигнала изменяется в соответствии с изменением содержания нормально функционирующих нейронов в зоне интереса. Поэтому для прижизненной неинвазивной оценки уровня таких нейронов в разных отделах мозга в норме и патологии используется сигнал NAA как нейрональный маркер: чем выше интенсивность сигнала, соответствующая концентрации NAA,

тем выше содержание нормально функционирующих нейронов в данном отделе головного мозга. И наоборот, чем меньше, согласно спектральным данным, концентрация NAA, тем ниже уровень функционально полноценных нейронов.

Большинство известных в настоящее время заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), таких как черепно-мозговая травма (ЧМТ), разные виды ишемии и гипоксии и нейродегенеративные заболевания сопровождаются уменьшением локальных концентраций NAA, измеренных ¹H МРС [2].

Многочисленные исследования нарушений метаболизма головного мозга вследствие такого социально значимого заболевания как ЧМТ, в том числе и данные ¹H МРС, свидетельствуют о понижении уровня NAA в разных отделах мозга [3, 4].

Причиной уменьшения стационарного уровня NAA может быть инактивация его синтеза и активация гидролиза NAA. Гидролизуется NAA под действием аспартатацилазы с образованием ацетата и аспартата (Asp). Этот фермент обнаружен в олигодендроцитах [2] и аксонах некоторых проводящих путей [5]. Фермент ингибируется физиологическими концентрациями субстрата ([NAA]~10⁻³ мМ/мл) [6]. Основное количество NAA синтезируется в митохондриях нейронов из Asp и ацетил-КоА под действием L-аспартат-N-ацетилтрансферазы [2].

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской Академии наук, Москва

²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова
Российской Академии наук, Москва

³Научно-исследовательский институт
неотложной детской хирургии и травматологии
Департамента здравоохранения города Москвы

⁴Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

*E-mail: andrey.man.93@gmail.com

Немногочисленные данные о влиянии ЧМТ на содержание участников синтеза NAA получены при исследовании головного мозга экспериментальных животных. Например, показано [7], что под действием повторной лёгкой ЧМТ в экстрактах мозга крыс снижается уровень ацетил-КоА. Тяжёлая ЧМТ (тЧМТ) вызывает снижение Asp в мозге крыс, обнаруженное методом ^1H МРС высокого разрешения [8].

В головном мозге человека прижизненные измерения Asp не проводились из-за отсутствия методики. Высокочастотные МР-томографы для исследований человека не применяются, а в полях, разрешённых в медицине (максимум 3Т), сигналы Asp в спектрах перекрываются интенсивными сигналами других метаболитов. Стандартные методики МРТ позволяют детектировать не более пяти соединений. Обычно с хорошим разрешением регистрируют сигналы N-ацетильной группы N-ацетиласпартата (NAA, $\delta = 2,0$ ppm), протонов группы $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, N-метильных протонов холинсодержащих соединений (tCho, $\delta = 3,18$ ppm), фосфокреатинина и креатинина (tCr, $\delta = 3,01$ ppm), CH_2 -групп Glu и Gln (Glx, $\delta = 2,2$ и $3,74$ ppm), сигнал протонов кольца инозитола (mI, $\delta = 3,56$ ppm) [3]. Сигналы СН-групп Asp ($\delta = 3,89$ ppm, $2,65$ ppm и $2,80$ ppm) перекрыты сигналами tCr, NAA ($\delta = 2,67$ ppm) и N-ацетил-аспартилглутамата ($\delta = 2,72$ ppm) [9].

Разделение перекрывающихся сигналов может быть достигнуто методами спектрального редактирования. Один из них реализуется с помощью импульсной последовательности MEGA-PRESS [10]. Для определения интенсивностей сигналов Asp

и Glu мы первыми создали специальную методику $^{\text{Asp}}$ MEGA-PRESS, подробно описанную в [11]. Будучи основным возбуждающим нейромедиатором Glu участвует в различных метаболических процессах, в том числе и в образовании Asp, являясь в головном мозге его главным источником.

Снижение уровня NAA в разных зонах головного мозга, вызванное ЧМТ и зафиксированное в клинике и эксперименте, может быть следствием недостатка его предшественников Glu и Asp.

Цель настоящего исследования — проверка этого предположения путём измерения концентрации NAA, Asp и Glu в неповреждённой по данным МРТ лобной доле головного мозга человека после тЧМТ в остром периоде и хронической стадии посттравматической болезни.

В исследовании принимали участие три группы пациентов в возрасте от 14 до 17 лет. Группа 1 состояла из 8 больных с острой тЧМТ (оценка их состояния по шкале комы Глазго составила $4,3 \pm 2,5$ баллов, время после травмы 23 ± 4 ч). Группа 2 включала 7 пациентов в хронической стадии травматической болезни после тЧМТ (время после травмы 82 ± 25 дня). Группа 3 (контроль) — 12 здоровых лиц.

Исследование проводили в соответствии с методикой, описанной в [11]. Объем интереса (VOI) располагали в неповреждённой по данным диагностической МРТ лобной доле мозга (рис. 1). Значения [tNAA], [tCr], [tCho], [mI] и [Glx], [Asp] и [Glu] получали, учитывая вклад серого вещества, белого вещества и цереброспинальной жидкости в VOI [11].

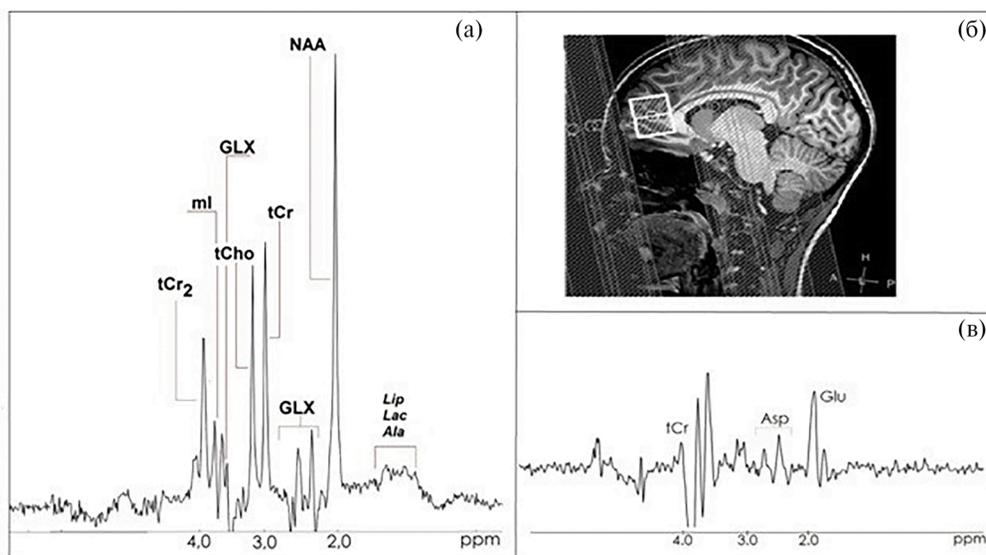


Рис. 1. Типичный спектр ^1H МР, полученный в неповреждённой по данным диагностической МРТ лобной доле мозга — (а). Расположение VOI в области лобной доли мозга — (б). Типичный спектр $^{\text{Asp}}$ MEGA-PRESS, полученный в области лобной доли мозга — (в).

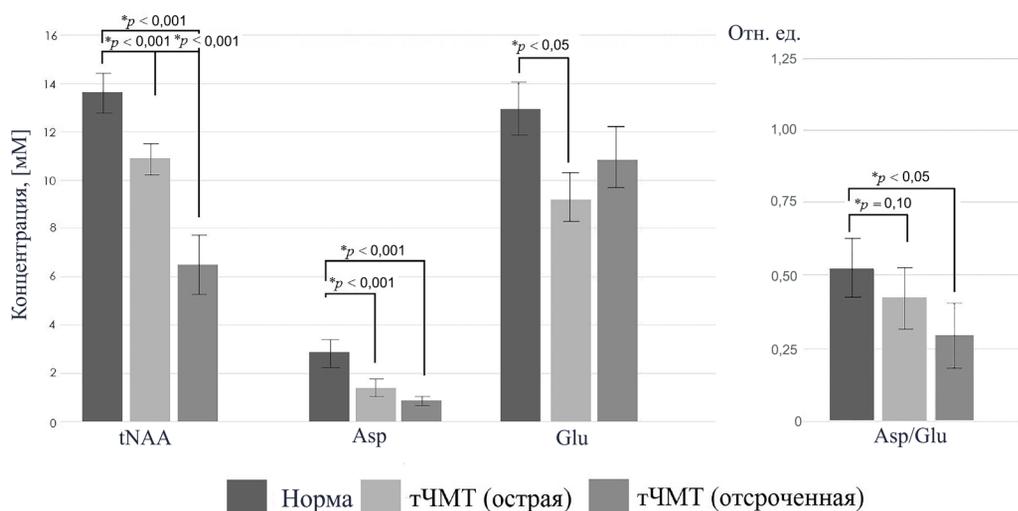


Рис. 2. Концентрация NAA, Asp, Glu ($M \pm SD$) и величина отношения Asp/Glu ($M \pm SD$) в неповреждённых по данным диагностической МРТ лобных долях головного мозга человека в норме ($n = 12$), при тЧМТ в остром периоде ($n = 8$) и в отдалённом периодах ($n = 7$).

Данные межгруппового сравнительного анализа [Asp], [Glu] и [NAA] представлены на рис. 2. Можно видеть, что при переходе от нормы к острому и затем к отдалённому периодам ЧМТ монотонно снижается [NAA], [Asp] падает в остром периоде и остаётся ниже нормы в дальнейшем, [Glu] снижена лишь в острой фазе после ЧМТ. Уменьшается и значение Asp/Glu: в остром периоде наблюдается тенденция к снижению этого параметра ($p = 0,1$), в отдалённом периоде величина Asp/Glu достоверно ниже нормы ($p \leq 0,05$).

По данным корреляционного анализа в острой фазе посттравматического периода выявлена прямая корреляция между [Glu] и [Asp] со значением коэффициента линейной корреляции $R = 0,95$ и обратная корреляция между Asp/Glu и NAA ($R = -0,73$).

До настоящего времени не существовало данных о влиянии травмы на концентрации NAA, Asp и Glu в головном мозге человека *in vivo*. Однако полученные нами результаты хорошо согласуются с результатами модельного эксперимента на крысах [8]. В обоих случаях через 1 сут после травмы в неповреждённом по данным МРТ веществе мозга максимальный эффект наблюдается для [Asp], а минимальный — для [NAA]. По нашим данным, острый период ЧМТ характеризовался падением [Asp] на 45%, [NAA] — на 16%. У крыс [Asp] снижался на 30%, [NAA] — на 12% [9].

Причиной снижения [NAA] не может быть активация его гидролиза, которая должна была привести к накоплению Asp. Мы наблюдали его падение. Поэтому можно полагать, что

уменьшение [NAA] обусловлено нарушением его синтеза, которое в острой фазе тЧМТ вызвано, по-видимому, недостатком [Glu], основного источника Asp.

Одной из важнейших характеристик острой фазы посттравматического периода при тЧМТ является эксайтотоксичность — процесс неконтролируемого высвобождения возбуждающих нейромедиаторов из везикул, приводящий к гибели нейронов. Потеря везикулярного Glu означает снижение его внутриклеточной концентрации. Недостаток Glu создаёт, в свою очередь, недостаток предшественника NAA, Asp, что угнетает синтез NAA.

Обращают на себя внимание следующие факты, характеризующие острую посттравматическую фазу: [Asp] снижается значительно сильнее, чем [Glu]; между концентрациями Asp и Glu существует высокая прямая корреляция; [NAA] уменьшается всего на 16% на фоне 45%-го падения Asp и Glu на 45 и 35%, соответственно. Из этих фактов следует, что в острой фазе образующийся из Glu Asp расходуется на поддержание уровня NAA. Действительно, мы обнаружили достоверную обратную корреляцию между Asp/Glu и NAA в остром периоде после тЧМТ.

В отдалённом периоде после тЧМТ [NAA] падает уже на 65%, а [Asp] — на 61% относительно нормы, достоверно снижен параметр Asp/Glu при нормальных значениях [Glu].

Одинаковое падение [NAA] и его предшественника Asp позволяет предполагать, что в отдалённом посттравматическом периоде нарушение

синтеза NAA вызвано недостатком его непосредственного исходного — Asp.

Параметр Asp/Glu, сниженный в обоих периодах, характеризует эффективность митохондриального транспортёра *Agalar1*, через который Glu поступает из цитозоля в митохондрию. Переносчик *Agalar1* является частью малат-аспартатной челночной системы (МАЧС) [12]. Эта система переносит восстановительные эквиваленты от НАДН цитозоля к НАД⁺ в митохондрии. Самой медленной и необратимой стадией работы МАЧС является транспорт Glu в митохондрию [13]. Транспортёр *Agalar1* присутствует в основном в митохондриях нейронов [14]. Этот транспортёр [14] играет важнейшую роль в синтезе NAA. В головном мозге и нейронах мышей с гомозиготной делецией гена *Aralar1* (*Aralar1*^{-/-}) падал уровень NAA и Asp. В митохондриях этих мышей было резко снижено потребление Glu и малата и прекращался синтез Asp [14].

Уменьшение значения отношения [Asp]/[Glu] позволяет предположить, что тЧМТ приводит к нарушению транспорта Glu. Из работы [14] следует, что обмен Glu на Asp является обязательной стадией в синтезе NAA, поэтому обнаруженное нами уменьшение значения [Asp]/[Glu] вызывает снижение уровня NAA при тЧМТ. Полученные в настоящей работе результаты указывают на участие *Agalar1* в регуляции синтеза NAA.

Следует ожидать, что при сниженных значениях [Asp]/[Glu] снижается концентрация цитозольного оксалоацетата и возникает избыток НАДН в цитозоле. Это приводит к недостатку восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи и нарушению синтеза АТФ. При анализе экстрактов головного мозга крыс обнаружено [15] совпадение динамики [АТФ] и [NAA] после фокальной и диффузной ЧМТ, которое может быть обусловлено тем, что синтез обоих соединений регулируется активностью МАЧС: образование NAA тормозится недостатком Asp, синтез АТФ — нарушением транспорта восстановительных эквивалентов в электрон-транспортной цепи. Это объясняет, почему интенсивность сигнала NAA в спектрах *in vivo* служит индикатором уровня нормально функционирующих нейронов: уровень NAA зависит от активности *Agalar1* и связан с энергетикой нейрональных митохондрий через МАЧС.

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что падение [NAA] в отдалённом периоде тЧМТ вызвано недостатком [Asp], предшественника синтеза [NAA]. Падение [Asp] при нормальном уровне Glu отражает, вероятно,

дисфункцию одной из важнейших систем регуляции метаболизма — МАЧС.

Сопоставление результатов, полученных при анализе [Asp], [Glu] и [NAA] в остром и отдалённом периодах после тЧМТ дают основания предполагать, что уже в течение первых суток после травмы возникают нарушения транспорта Glu в митохондрию через *Agalar1*, а в отдалённом периоде развивается дисфункция МАЧС.

Работа поддержана грантами РФФ 18–13–00030 и РФФИ 17–04–01149 А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tallan H.H. // J. Boil. Chem. 1957. V. 224. P. 41–45.
2. Moffett J., Ross B., Arun P., Madhavarao C., Namboodiri M. // Prog. Neurobiol. 2007. V. 81. № 2. P. 89–131.
3. Moffett J., Arun P., Ariyannur P., Namboodiri A. // Front Neuroenergetics. 2013. V. 5. P. 1–19.
4. Семенова Н.А., Луковенков А.В., Ахадов Т.А., Сидорин С.С., Варфоломеев С.Д. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 4. С. 495–502.
5. Moffet J., Arun P., Ariyannur P., Garbern J., Jacobowitz D., Namboodiri A. // Glia. 2011. V. 59. № 10. P. 1414–1419.
6. Kots E.D., Lushchekina S.V., Varfolomeev S.D., Nemukhin A.V. // J. Chem. Inf. Model. 2017. V. 57. № 8. P. 1999–2008.
7. Vagnozzi R., Tavazzi B., Signoretti S., Amorini A.M., Belli A., Cimatti M., Delfini R., Di Pietro V., Finocchiaro A., Lazzarino G. // Neurosurgery. 2007. V. 61. № 2. P. 379–388.
8. Harris J., Ye H., Choi I., Lee P., Berman N., Swerdlow R., Craciunas S., Brooks W. // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2012. V. 32. P. 2122–2134.
9. Kinoshita Y., A. Yokota A. // NMR Biomed. 1997. V. 10. № 1. P. 2–12.
10. Mescher M., Merkle H., Kirsch J., Garwood M., Gruetter R. // NMR Biomed. 1998. V. 11. P. 266–272.
11. Меньщиков П.Е., Семенова Н.А., Манжурицев А.В., Ахадов Т.А., Варфоломеев С.Д. // Изв. РАН. Сер. хим. 2018. № 4. С. 1–8.
12. McKenna M., Waagepetersen H., Schousboe A., Sonnewald U. // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 71. P. 399–407.
13. La Noue K., Tischler M. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 7522–7528.
14. Jalil M., Begum L., Contreras L. // J. Biol. Chem. 2007. V. 280. P. 31333–31339.
15. Di Pietro V., Amorini A., Tavazzi B., Vagnozzi R., Logan A., Lazzarino G., Signoretti S., Lazzarino G., Belli A. // Mol. Med. 2014. V. 20. P. 147–157.

DYNAMICS OF INTRAVITAL CONCENTRATION OF AMINO ACID METABOLITES IN HUMAN BRAIN IN POST-TRAUMATIC PERIOD

**N. A. Semenova, P. E. Menshchikov, A. V. Manzhurtsev, M. V. Ublinskiy,
T. A. Akhadov, Corresponding Member of the RAS S. D. Varfolomeev**

Received July 10, 2018

Intracellular concentrations of N acetylaspartate (NAA), aspartate (Asp) and glutamate (Glu) were determined for the first time in human brain in vivo, and the effect of severe traumatic brain injury on NAA synthesis in acute and late post-traumatic period was investigated. In MRI-negative frontal lobes one day after injury Asp and Glu levels were found to decrease by 45 and 35%, respectively, while NAA level decreased by only 16%. A negative correlation between NAA concentration and the ratio of Asp/Glu concentrations was found. In the long-term period, Glu level returned to normal, Asp level remained below normal by 60%, NAA level was reduced by 65% relative to normal, and Asp/Glu ratio significantly decreased. The obtained results revealed leading role of the neuronal aspartate-malate shuttle in violation of NAA synthesis.

Keywords: magnetic resonance spectroscopy (MRS), traumatic brain injury (TBI), N-acetylaspartate, aspartate, glutamate, human brain.