

**КИНЕТИКА ХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА.
ТРИГГЕР-ЭФФЕКТ И АВТОСТАБИЛИЗАЦИЯ
N-АЦЕТИЛАСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

**Член-корреспондент РАН С. Д. Варфоломеев¹,
Н. А. Семенова², В. И. Быков^{2,*}, С. Б. Цыбенова²**

Поступило 01.08.2018 г.

Предложена кинетическая модель процесса ответа нервной ткани на внешнее сигнальное воздействие. Модель основана на представлении о многостадийности и нелинейности динамического процесса изменений концентрации N-ацетиласпарагиновой кислоты и N-ацетиласпартата в нервной ткани человека. Эффект ингибирования субстратом для этой системы является необходимым фактором автостабилизации N-ацетиласпартата как ключевого метаболита мозга. Существование трёх стационарных состояний объясняет триггерное поведение системы.

Ключевые слова: мозг человека, химические процессы, кинетика, триггер-эффект, N-ацетиласпарагиновая кислота.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524844441-446>

Современные физические методы позволяют наблюдать протекание химических реакций *in vivo* в таких сложных объектах, как мозг человека. Эти возможности определяются в первую очередь развитой техникой магнитно-резонансной томографии (МРТ) и ЯМР-спектроскопии. Эти методы позволяют выделять и анализировать структурные образования в мозге *in vivo*, параллельно и независимо идентифицировать отдельные химические соединения и их концентрации [1, 2].

Одним из наиболее загадочных соединений мозга является N-ацетиласпарагиновая кислота (N-ацетиласпартат). N-ацетиласпартат является биомаркером нейронов мозга. Это соединение отсутствует в других органах и тканях человека и животных. Уровень концентрации N-ацетиласпартата в разных отделах и органах мозга различен, однако это соединение везде представлено в наибольших концентрациях по сравнению с другими метаболитами. В силу этого N-ацетиласпартат хорошо детектируется ЯМР-спектроскопией *in vivo* [3].

Роль N-ацетиласпартата в метаболизме мозга не выяснена. Одним из относительно новых методов является метод функциональной

магнитно-резонансной томографии (фМРТ), который основан на детектировании локального изменения контраста в томограммах, вызванного нейрональной активностью.

Выполнение какой-либо задачи вызывает в активированных нагрузкой локусах головного мозга активацию кровотока, лишь частично соответствующую увеличению потребления кислорода [4]. Это приводит к увеличению концентрации оксигемоглобина Hb относительно концентрации дезоксигемоглобина dHb. Последний является МРТ-контрастом, снижающим время спин-спиновой релаксации протонов тканевой воды. Таким образом, изменение соотношения [Hb]/[dHb] создаёт контраст, который зависит от степени насыщения крови кислородом (blood oxygenation level, BOLD-контраст) и опосредованно характеризует активность нейронов.

В МРТ-изображениях BOLD визуализируется как локальные изменения контрастности в течение 1–16 с после воздействия стимула. Это позволяет определить локусы, активирующиеся в ответ на стимул, и установить связи между активацией локусов мозга и последующими биохимическими процессами.

Основанная на регистрации BOLD функциональная МРТ широко используется для выявления зон активности в мозге в норме и при различных заболеваниях центральной нервной системы [5, 6].

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук, Москва

* E-mail: vbykov@mail.ru

Мы использовали BOLD как динамическую характеристику локального изменения соотношения $[Hb]/[dHb]$, вызванного активацией нейронов, и попытались связать этот параметр с динамикой нейронального маркера N-ацетиласпартата в активированной зоне мозга с последующим кинетическим моделированием процесса. Такая задача ставится впервые.

Магнитно-резонансные исследования проводили на томографе Achieva Philips 3.0 T (резонансная частота для ядер 1H 127 МГц), оснащённом градиентной системой “Dual Quasar”. Использовали восьмиканальную приёмную радиочастотную катушку для головы. Структурные изображения головного мозга получали, используя импульсную последовательность турбополевого эха с релаксационной задержкой $TR = 8,2$ мс, временем эхо $TE = 3,7$ мс, углом поворота вектора намагниченности $FA = 8^\circ$, временем инверсии $TI = 1021$ мс, числом эхо 240, фактором ускорения сбора данных SENSE factor = 1,5, полем обзора $FOV = 240$ мм, числом накопления NSA = 1.

Для проведения фМРТ-исследования использовали последовательность T2 EPI; $TR = 3000$ мс, $TE = 30$ мс, EPI-фактор = 240, количество срезов 30, толщина среза 4 мм, NSA = 1, число динамик 210, длительность одной динамики 3 с. Стимуляцию предъявляли испытуемым с использованием приставки Eloquence (“In Vivo-Philips”), применяя звуковой сигнал (тон, частота 1 кГц, громкость звука составляла 70–80 дБ) с последующим нажатием специальной кнопки указательным пальцем правой руки [7].

BOLD-сигнал получали, подавая стимулы с интервалом 18 с. Парадигма исследования состояла из 210 динамик, количество стимулов 30. Для группы испытуемых, состоящей из 9 здоровых мужчин-правшей (средний возраст $22,1 \pm 1,9$ г.) суммировали значения BOLD во временных точках $t = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18$ с после выполнения действия; $BOLD_{(t)}$ нормировали на $BOLD_{(0)}$.

Спектроскопический воксель размером $20 \times 10 \times 15$ мм располагали в зоне премоторной коры левого полушария, активированной движением пальца. 1H МР-спектры регистрировали с помощью импульсной последовательности PRESS, $TE = 30$ мс, $TR = 3000$ мс. Для получения спектров, синхронизированных с динамикой BOLD, нами разработана специальная методика динамической спектроскопии, подробно описанная в [7]. Каждому испытуемому стимулы повторяли 98 раз и записывали 98×7 сигналов спинного эха. Затем сигналы группировали в соответствии с точками BOLD. Таким образом, каждый спектр получен с NSA = 98. Аналогичным

способом получали спектры для состояния покоя, используя те же временные точки, но без подачи стимула.

Для обработки сигналов написали специальную программу, которая включает умножение на экспоненту и функцию Гаусса, преобразование Фурье, коррекцию фазы вручную и измерение амплитуд сигналов. Амплитуды сигналов, измеренные в спектрах для времени t , нормировали на значения, измеренные в спектрах для времени $t = 0$, и на объём клеток в вокселе, который получали вычитанием объёма цереброспинальной жидкости (определяли вручную на аксиальных T2-взвешенных изображениях, используя программный пакет Extended MR Workspace).

Наблюдаемые кинетические ответы на внешний звуковой сигнал — принятие решения — функциональный ответ (нажатие кнопки) относительно изменения концентрации в зонах возбуждения представлены на рис. 1. Ответ BOLD соответствует изменению в исследуемом объёме нейронной ткани концентрации оксигенированного гемоглобина. С некоторой задержкой (периодом индукции) концентрация детектируемого реагента возрастает, через 6 с проходит максимум и возвращается на исходный базовый уровень. Ответ в концентрации N-ацетиласпартата наступает после 5–6 с задержки, при этом наблюдается “антипик” — временное уменьшение концентрации N-ацетиласпартата. Минимальное значение наблюдается на 12-й секунде после звукового сигнала и нажатия кнопки.

С учётом многостадийного биохимического процесса индуцированного расширения сосудов

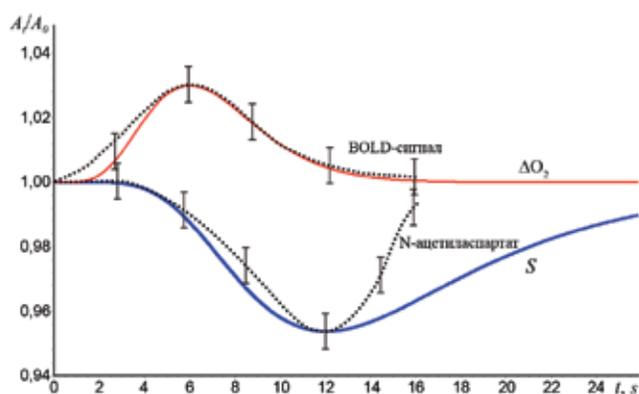


Рис. 1. Экспериментальные и расчётные кривые динамики изменения концентрации N-ацетиласпартата на внешний сигнал: пунктирные линии — экспериментальные данные: BOLD-сигнал и N-ацетиласпартат; сплошные линии — расчётные линии ΔO_2 , S. Результаты эксперимента и моделирования нормированы на амплитуду сигнала N-ацетиласпартата (A_t) для времени $t = 0$ (A_0).

для описания динамики процесса можно использовать функцию вида

$$\Delta O_2 (A/A_0) = At^n \exp(-\xi t). \quad (1)$$

Для многостадийных ферментативных реакций с соизмеримыми кинетическими параметрами начальный этап развития процесса может быть описан функцией t^n , где n — число промежуточных стадий. Релаксация к исходному уровню, связанная с замещением гемоглобина новыми порциями крови, может быть представлена экспоненциальной функцией с параметром ξ .

Динамическое уравнение для N-ацетиласпартата можно записать в виде

$$\frac{dS}{dt} = \alpha(S_0 - S) - \beta w(S) \gamma A_m \Delta O_2, \quad (2)$$

где член $\alpha(S_0 - S)$ характеризует открытую по потоку S природу процесса, $\beta w(S)$ — скорость гидролиза S под действием аспартоацилазы, $\gamma A_m \Delta O_2$ — окислительный процесс с участием одного из метаболитов конверсии S.

В простейшем случае возможность участия промежуточных стадий передачи кислорода до взаимодействия с S может быть описана следующей совокупностью превращений:



где A_1, A_2, A_3 — промежуточные вещества. Соответствующая схеме (3) кинетическая модель может быть записана в виде

$$\begin{aligned} \frac{dA_1}{dt} &= -k_1 \Delta O_2 A_1, \\ \frac{dA_2}{dt} &= k_1 \Delta O_2 \cdot A_1 - k_2 A_2, \\ \frac{dA_3}{dt} &= k_2 A_2 - k_3 A_3 S, \\ \frac{dS}{dt} &= \alpha(S_0 - S) - \beta w(S) - k_3 A_3 S, \end{aligned} \quad (4)$$

где $k_i, i = 1, 2, 3$, — константы скоростей стадий схемы (3). Минимальная кинетическая схема (3) позволяет описать ряд промежуточных превращений кислорода до стадии его взаимодействия с субстратом S.

Продукты конверсии N-ацетиласпартата — активные метаболиты, принимающие участие в нейробиологических процессах и энергетическом метаболизме. Аспарагиновая кислота P₁

является нейромедиатором, а также главным источником глутаминовой кислоты — основного возбуждающего нейромедиатора. За счёт быстрого процесса переаминирования с использованием α -кетоглутаровой кислоты образуется глутаминовая кислота P₂, последующая конверсия которой ведёт к образованию γ -аминомасляной кислоты — важнейшего тормозящего нейромедиатора.

В биохимическом плане гидролиз N-ацетиласпартата с образованием аспарагиновой кислоты индуцирует цепь последующих превращений, ведущих к ключевым метаболитам головного мозга.

Следует ещё раз подчеркнуть, что N-ацетиласпартат — один из важнейших участников нейробиологических процессов, его концентрация существенно превышает концентрацию всех аминокислотных метаболитов мозга.

Реакция гидролиза N-ацетиласпартата достаточно хорошо изучена [8]. Характерной особенностью регуляции активности фермента, которая безусловно играет важную роль, является сложная зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

$$w(S) = \frac{a_0 S^3}{b_0 + b_1 S + b_2 S^2 + b_3 S^3 + b_4 S^4}. \quad (5)$$

Молекулярно-кинетическое исследование этих эффектов на основе QM/ММ приближений дано нами в работах [9–12].

При высоких концентрациях субстрата скорость реакции существенно уменьшается (ингибирование избытком субстрата), при этом важно подчеркнуть, что физиологически наблюдаемая концентрация N-ацетиласпартата в нейронах находится в области существенного подавления активного фермента (b_0, b_1, b_2, b_3, b_4). Интегрирование системы уравнений (1)–(5) проведено с использованием специально разработанной программы в среде Delphi Enterprise. Решение кинетической модели позволяет визуализировать динамические ответы по всем переменным и исследовать поведение системы при варьировании параметров.

Предложенная кинетическая модель достаточно адекватно описывает экспериментальные данные (рис. 1), включая “затяжки” на кинетических стадиях накопления продуктов и “антипике” N-ацетиласпартата. Точность эксперимента не позволяет определить значения параметров процесса, можно лишь сделать оценки диапазонов, при которых “затяжки” достаточно качественно описываются моделью. Оценки параметра n (число стадий, предшествующие “выбросу” кислорода) лежат в диапазоне 4–8, параметра m (число стадий, предшествующих окислению S) — в диапазоне 4–12.

Кривые, приведённые на рис. 1, являются решением системы уравнений (1)–(5) при следующих значениях параметров: $\alpha = 6$; $\beta = 1$; $A = 0,135 \cdot 10^{-5}$; $\xi = 1$; $n = 6$; $S_0 = 0,008$; $k_1 = 11,5$; $k_2 = 0,14$; $k_3 = 102$; $a_0 = 0,248$; $b_0 = 1,8 \cdot 10^{-13}$; $b_1 = 9 \cdot 10^{-9}$; $b_2 = 4,5 \cdot 10^{-4}$; $b_3 = 2$; $b_4 = 2,44 \cdot 10^3$. Значения a_0 , b_0 , b_1 , b_2 , b_3 и b_4 определены из экспериментальных данных в соответствии с [8–12]. Важно отметить, что максимальное значение концентрации кислорода достигает на 6-й секунде после внешнего раздражителя, минимальное значение N-ацетиласпартата — на 12-й секунде. Через 30–35 с концентрация N-ацетиласпартата практически достигает исходного стационарного уровня.

Обладая достаточно адекватной кинетической моделью, основанной на биохимических данных, можно ответить на ключевые вопросы, дающие представление о поведении “загадочной” N-ацетиласпартат-системы:

1) каков механизм автостабилизации концентрации N-ацетиласпартата как ключевого метаболита мозга и какова роль в этом процессе эффекта ингибирования активности аспартоацилазы избытком субстрата?

2) каковы динамические ответы в поведении последующих в цепи превращения метаболитов (аспарагиновой кислоты, уксусной кислоты, глутаминовой кислоты) после “волны” гидролиза N-ацетиласпартата и соответствующего образования продуктов?

Известно, что эффект ингибирования избытком субстрата в открытой системе с вводом вещества S в концентрации S_0 и выводом его из

системы с концентрацией S ведёт к образованию по крайней мере трёх стационарных состояний [13, 14].

В отсутствие эффекта ингибирования субстратом система неспособна выйти на исходный устойчивый стационарный уровень концентрации N-ацетиласпартата. На рис. 2 представлены ответы системы в присутствии (кривая 1) и отсутствии (кривая 2) эффекта ингибирования субстратом (в уравнении (5) $b_4 = 0$, кривая 2), а также при различных значениях каталитической активности фермента a_0 . Теоретически в отсутствие ингибирования субстратом ($b_4 = 0$) концентрация N-ацетиласпартата резко падает и его стационарная концентрация очень мала (кривая 2).

Вывод исследования: эффект ингибирования субстратом для данной системы является необходимым фактором автостабилизации N-ацетиласпартата как ключевого метаболита мозга.

Аспарагиновая кислота является нейромедиатором, однако наиболее яркая её роль — трансформация в глутаминовую кислоту — основного нейромедиатора значительной доли нервных клеток. Образование аспарагиновой кислоты Asp и ацетата строго стехиометрично расходу N-ацетиласпартата. В динамической модели в уравнении (2) скорость расхода ($-\beta w(S)$) изменяет знак на положительный:

$$\frac{dAsp}{dt} = \alpha(S_0 - S) + \beta w(S) - \delta Asp, \quad (6)$$

где δAsp — трансформация аспарагиновой кислоты в глутаминовую,

$$\frac{dGlu}{dt} = \delta Asp - \varepsilon Glu, \quad (7)$$

где $\varepsilon \cdot Glu$ — скорость трансформации Glu в дальнейшем метаболизме.

Результаты численного интегрирования уравнений (1)–(8) представлены на рис. 3 (динамика изменения аспарагиновой кислоты и динамика изменения глутаминовой кислоты) при значениях параметров $\delta = 10$; $\varepsilon = 0,3$.

Важно подчеркнуть, что автостабилизация концентрации Asp, как и Glu, определяется процессом ингибирования субстратом аспартоацилазы.

Кинетическая модель, развитая в данной работе, количественно описывает наблюдаемые динамические ответы. Принципиально важным является объяснение эффекта автостабилизации концентрации N-ацетиласпартата и последующих метаболитов. Этот эффект связан с особенностью кинетического действия фермента, а именно с ингибированием каталитической активности фермента при высоких концентрациях

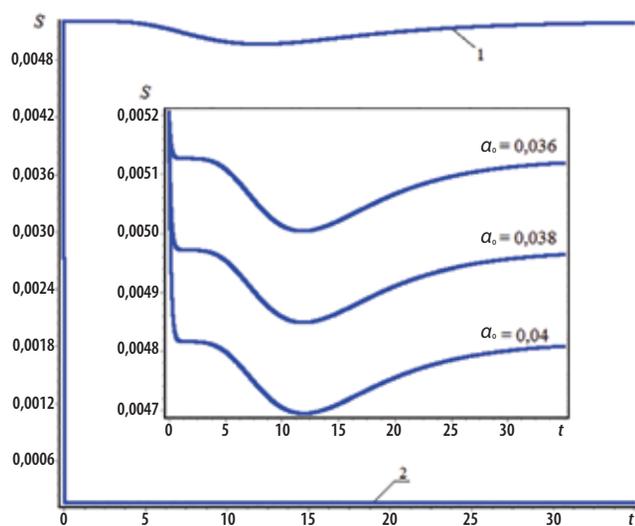


Рис. 2. Динамические ответы системы в присутствии (1) и отсутствии (2) эффекта ингибирования субстратом ($b_4 = 0$) и при варьировании значений a_0 каталитической активности фермента (уравнение (4)).

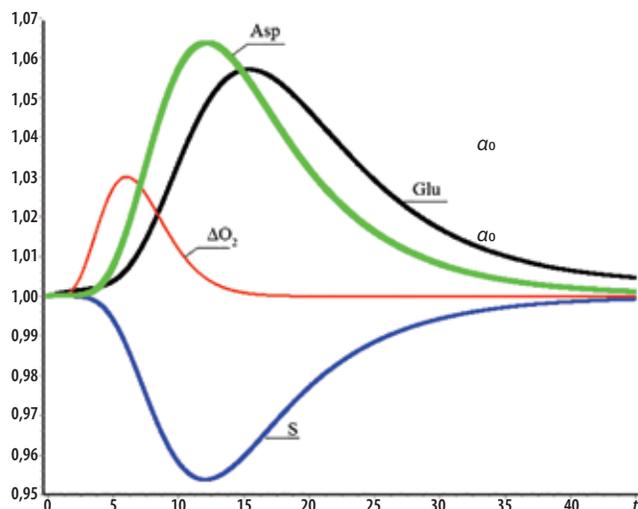


Рис. 3. Теоретические кривые изменения концентрации аспарагиновой Asp и глутаминовой Glu кислот, кислорода ΔO_2 и N-ацетиласпартаты S в соответствии с решениями уравнений (1)–(5), (7), (8).

N-ацетиласпартата. Для данной системы характерно наличие двух устойчивых стационарных состояний, при этом наибольшим запасом прочности обладает стационарное состояние с высоким уровнем N-ацетиласпартата. Нормой являются стационарные состояния с высоким уровнем N-ацетиласпартата (аспартоацилаза ингибирована большой концентрацией N-ацетиласпартата). Переход системы во второе устойчивое стационарное состояние (низкий уровень N-ацетиласпартата и высокая активность аспартоацилазы) может быть связан с потерей нейронами функциональной активности, например при черепно-мозговой травме.

Кинетическое моделирование позволяет предсказать поведение метаболитов, определение концентраций которых *in vivo* затруднено. В результате “антипика” N-ацетиласпартата возникает волна продуктов его гидролиза — аспарагиновой и уксусной кислот. N-ацетиласпартат — уникальный метаболит, продукт гидролиза, который участвует в двух системах — в энергетической и нейромедиаторной. На наш взгляд, основным результатом кинетической активации аспартоацилазы является возникновение динамической волны синтеза глутаминовой кислоты — одной из основных нейромедиаторов центральной нервной системы (ЦНС).

В работе удаётся проследить путь внешнего сигнала к химическим процессам в нервной ткани.

Это достаточно медленные процессы, цикл которых имеет диапазон десятков секунд. Однако эти процессы играют принципиальную роль в функционировании центральной нервной системы. По своей функциональной значимости исследуемый процесс направлен на автостабилизацию системы на ресурсное энергетическое и нейромедиаторное обеспечение ЦНС.

Источник финансирования. Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 18–13–00030).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stagg C., Rothman D.* Magnetic Resonance Spectroscopy: Tools for Neuroscience Research and Emerging Clinical Applications. N.Y.: Acad. Press, 2013. 358 p.
2. *Bottomley P.A., Griffiths J.R.* Handbook of Magnetic Resonance Spectroscopy In vivo: MRS Theory, Practice and Applications. Chichester: Wiley, 2016. 1232 p.
3. *Семенова Н.А., Ахадов Т.А., Петряйкин А.В., Сударин С.С., Луковенков А.В., Варфоломеев С.Д.* // Биохимия. 2012. Т. 77. № 4. С. 493–500.
4. *Fox P.T., Raichle M.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1140–1144.
5. *Matthews P., Hampshire A.* // Neuron. 2016. V. 91. № 3. P. 511–528.
6. *DeYoe E.A., Raut R.V.* // Neuroimaging Clin. N. Amer. 2014. V. 24. № 4. P. 573–584.
7. *Ублинский М.В., Семенова Н.А., Ахадов Т.А., Мельников И.А., Варфоломеев С.Д.* // Изв. АН. Сер. хим. 2015. № 2. С. 451–458.
8. *Coq J.Le, An H.J., Lebrilla C., Viola R.E.* // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 5878–5884.
9. *Kots E.D., Khrenova M.G., Lushchekina S.V., Varfolomeev S.D., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V.* // J. Phys. Chem. B. 2016. V. 120. P. 4221–4231.
10. *Варфоломеев С.Д., Коц Е.Д., Хренова М.Г., Лушечкина С.В., Немухин А.В.* // ДАН. 2017. Т. 474. № 4. С. 444–447.
11. *Kots E.D., Lushchekina S.V., Varfolomeev S.D., Nemukhin A.V.* // J. Chem. Inf. Model. 2017. V. 57. P. 1999–2008.
12. *Khrenova M.G., Kots E.D., Varfolomeev S.D., Lushchekina S.V., Nemukhin A.V.* // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. P. 9389–9397.
13. *Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.* Биокинетика. М.: Фаир-Пресс, 1999. 720 с.
14. *Жаботинский А.М.* Концентрационные волны. М.: Наука, 1974. 179 с.

**KINETICS OF CHEMICAL PROCESSES IN THE HUMAN BRAIN.
TRIGGER EFFECT AND SELF-STABILIZATION
OF N-ACETYLASPARTIC ACID**

**Corresponding Member of the RAS S. D. Varfolomeev,
N. A. Semenova, V. I. Bykov, S. B. Tsybenova**

Received August 1, 2018

A kinetic model was proposed for the response of nerve tissue to an external signal stimulus. The model is based on the views of a multistep and non-linear nature of the dynamic variation of the concentrations of *N*-acetylaspartic acid and *N*-acetylaspartate in the human nerve tissue. The substrate inhibition effect in this system is a necessary factor for the self-stabilization of *N*-acetylaspartate as a key brain metabolite. The existence of three stationary states accounts for the trigger behavior of the system.

Keywords: human brain, chemical processes, kinetics, trigger effect, N acetylaspartic acid.