

© Манжалій Е. Г., Вірченко О. В., Фалалєєва Т. М., Савчук О. М., Берегова Т. В.

УДК 616.36-004+615.917+612.821.5

¹Манжалій Е. Г., ¹Вірченко О. В., ²Фалалєєва Т. М., ²Савчук О. М., ²Берегова Т. В.

РОЛЬ СЕРОТОНІНУ В РОЗВИТКУ ПЕЧІНКОВОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ

¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця
МОЗ України (м. Київ)

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
МОН України (м. Київ)

elinam@ukr.net

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми № 11БФ036-01 «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015 рр., № державної реєстрації 0111U004648) ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Вступ. Печінкова енцефалопатія (ПЕ) – це комплексний психоневрологічний синдром, що розвивається в результаті ураження печінки. Він характеризується когнітивними, психічними та моторними розладами, починаючи від незначних порушень сну і змін в особистості та руховій активності, закінчуючи суттєвим погіршенням когнітивних функцій, координації рухів, помутнінням свідомості і комою [6]. На клінічному рівні ПЕ виявляється в слабо вираженому набряку з порушенням взаємодії нейронів та астроцитів та супроводжується посиленою гіперамоніємією та окисним стресом [6]. Ці зміни тісно пов'язані зі змінами в нервовій передачі, в яку залучена низка нейромедіаторів.

Одним з важливих нейромедіаторів є біогенний амін серотонін. Встановлена його участь в регуляції енергетичного обміну організму, а також зміни серотонінергічної системи за різних патологій, зокрема ожиріння, цукрового діабету [2]. Все більше фактів свідчить про участь серотоніну в патогенезі цирозу печінки (ЦП) і супутньої ПЕ [4], проте загальна картина змін всіх компонентів серотонінергічної системи в головному мозку і крові повністю не розкрита. Більш того відсутні чіткі дані щодо кореляції між вмістом серотоніну в крові та маркерами цитолізу печінки, зокрема активністю аланін-трансамінази (АЛТ) і аспартатамінотрансферази (АСТ). У попередньому дослідженні ми встановили діагностичне значення дослідження умовного рефлексу на щурах в Т-подібному лабіринті і показали збільшення часу знаходження їжі щурами з ПЕ, що свідчить про порушення у них пам'яті та мислення [3]. Проте все ще залишається відкритим питання про зв'язок між рівнем серотоніну в крові та неврологічними параметрами у щурів, а саме когнітивними функціями і запам'ятовуванням місцезнаходження їжі в Т-подібному лабіринті.

Тому **мета дослідження** полягала в оцінці змін серотонінергічної системи за умов ПЕ щурів та визначенні їх діагностичної цінності для встановлення

важкості порушень мозкової діяльності. Для досягнення мети вирішувалися наступні задачі: встановлення рівня серотоніну і триптофану в крові і тканині головного мозку за умов ПЕ, активності ферментів для синтезу і катаболізму серотоніну, виявлення кореляції між серотоніном у крові та параметрами харчового умовного рефлексу, а також рівнем АЛТ та АСТ.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проведено на 14 щурах-самцях згідно нормативів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі «Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)».

Тварини були розділені на 2 групи по 7 щурів в кожній: I – інтактні тварини, II – дослідні. Для моделювання експериментальної ПЕ, II групі тварин вводили в/о 1 мл/кг 15% розчину ССІ4 в оливковій олії чотири рази на тиждень впродовж 4 тижнів [3]. Всі тварини мали вільний доступ до води та їжі. Після закінчення введення ССІ4 діагностували розвиток печінкової енцефалопатії на моделі вироблення харчового умовного рефлексу, що було описано в попередній роботі [3].

Після дослідження неврологічних параметрів тварин декапітували. Отримували сироватку крові та видаляли мозок з основи черепа і поміщали в 0,9% розчин хлориду натрію, після чого заморожували при температурі мінус 80°C. В сироватці крові визначали концентрацію АЛТ, АСТ, серотоніну, триптофану та моноамінооксигеназну активність за стандартними біохімічними методиками. В гомогенаті мозку щурів визначали вміст серотоніну та триптофану, а також триптофан-гідроксилазу (ТГ), триптофан-декарбоксилазу (ТД), індоламін 2,3-діоксигеназу (ІДО), моноамінооксигеназу (МАО) активність за стандартними біохімічними методиками [1,5,7,8].

Статистичну обробку даних здійснювали в пакеті програм SPSS-20. Дані виражали як середнє ± стандартна похибка середнього (M ± m). Розподіл

даних було проаналізовано з використанням критерію нормальності Колмогорова-Смирнова. Отримані значення мали параметричний розподіл, тому відмінності між групами були проаналізовані за допомогою t-критерію Стьюдента. Кореляційні залежності між визначеними параметрами оцінювали за допомогою параметричного коефіцієнта кореляції Пірсона. Відмінності між групами вважали статистично значущими при значенні p менше, ніж 0,05.

Результати дослідження та їх обговорення. У щурів після введення тетрахлористого вуглецю впродовж місяця були виявлені суттєві зміни показників серотонінової системи. Рівень серотоніну в гомогенаті головного мозку щурів з ПЕ знизився на 60% ($p < 0,05$), в той час як в крові він збільшився на 233% ($p < 0,05$) в порівнянні з інтактними щурами (рис. 1). Ці дані свідчать про різнонаправлені зміни вмісту серотоніну в досліджуваних тканинах.

Попередником синтезу серотоніну є амінокислота триптофан. Її вміст в сироватці крові відображав зміни вмісту серотоніну: було зареєстроване підвищення даного показника на 49,8% ($p < 0,05$) щодо інтактних щурів (рис. 2). При цьому змін вмісту амінокислота в тканині мозку не було виявлено.

Зменшення запасів серотоніну в мозку за умов патології може бути викликане низкою факторів: послаблення його синтезу, за умов порушення метаболічних процесів; нейротоксична дія та руйнування клітин в мозку, що синтезують серотонін; посилення катаболізму даного біогенного аміну. Щоб перевірити останнє припущення було визначено MAO активність, фермента, який забезпечує процес руйнування нейромедіатора. Встановлено, що MAO активність в тканині мозку зменшувалася на 32,4% ($p < 0,05$) (рис. 3). Це свідчить, що зменшення серотоніну в мозку при ПЕ не пов'язане зі збільшенням інтенсивності його катаболізму, та наводить на думку про порушення функціонування та можливе руйнування серотонін-утворюючих структур головного мозку, насамперед нейронів гіпоталамуса та стовбура головного мозку. В крові спостерігали протилежну картину: MAO активність зросла в 4,4 рази ($p < 0,05$), що свідчить про збільшення інтенсивності руйнування серотоніну в крові, хоча вміст останнього значно перевищував нормальні показники (рис. 1, 3).

Однією з причин зменшення вмісту серотоніну в головному мозку є порушення процесів його утворення. Було виявлено зменшення на 9,0% ($p < 0,05$) активності ТГ, одного з ключових ферментів синтезу серотоніну (рис. 4). При цьому активність іншого фермента ТД змінювалася не значущо (рис. 4). ІДО – фермент, що впливає на біосинтез серотоніну

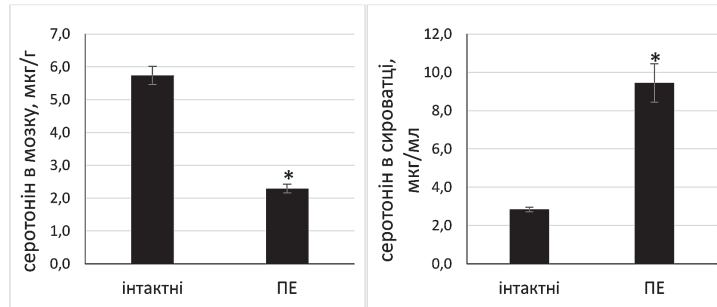


Рис. 1. Вміст серотоніну в гомогенаті головного мозку та в сироватці крові щурів з печінковою енцефалопатією (ПЕ) на тлі цирозу печінки, викликаного введенням тетрахлористого вуглецю ($n=10$, $M \pm m$). * $p < 0,05$.

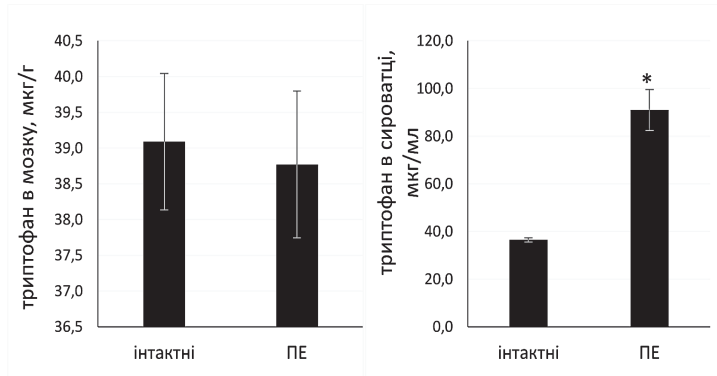


Рис. 2. Вміст триптофану в гомогенаті головного мозку та в сироватці крові щурів з печінковою енцефалопатією (ПЕ) на тлі цирозу печінки, викликаного введенням тетрахлористого вуглецю ($n=10$, $M \pm m$). * $p < 0,05$.

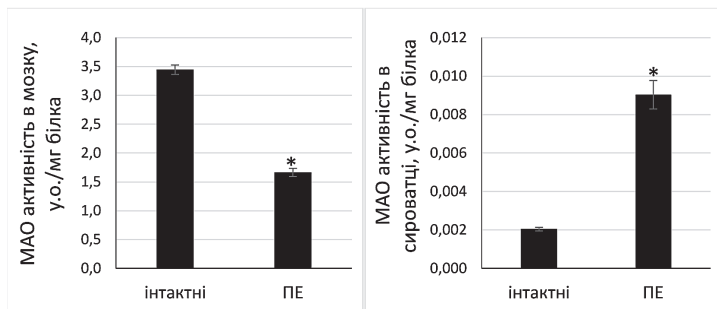


Рис. 3. Моноамінооксигеназна (MAO) активність в гомогенаті головного мозку та в сироватці крові щурів з печінковою енцефалопатією (ПЕ) на тлі цирозу печінки, викликаного введенням тетрахлористого вуглецю ($n=10$, $M \pm m$). * $p < 0,05$.

шляхом переключення останнього на шлях утворення ніацину з триптофану. За умов ПЕ встановлено зменшення ІДО активності в мозку на 6,2% ($p < 0,05$) порівняно з інтактними щурами (рис. 4).

Отримані дані свідчать, що зміни в серотонінергічній системі є важливим прогностичним маркером протікання ПЕ на тлі ураження печінки. Для більш комплексної оцінки діагностичної цінності змін вмісту серотоніну ми з'ясували наявність зв'язку між вмістом серотоніну в крові та неврологічним параметром, а саме характеристикою вироблення

умовного рефлексу в щурів в Т-подібному лабіринті, та маркерами цитолізу – активністю АЛТ і АСТ. Показана позитивна кореляція між часом знаходження їжі тваринами (безумовного підкріплення на 14 добу вироблення умовного рефлексу) та вмістом серотоніну в крові ($r=0,793$ ($p<0,05$)) (рис. 5). Це свідчить, що щури з більш значним порушенням когнітивної функції, які повільніше знаходили їжу в лабіринті, мали більш високий вміст серотоніну в крові.

Було виявлено позитивну кореляцію між рівнями АЛТ і АСТ та серотоніном в крові, коефіцієнти кореляції відповідно становили $r=0,654$ ($p<0,05$) та $r=0,729$

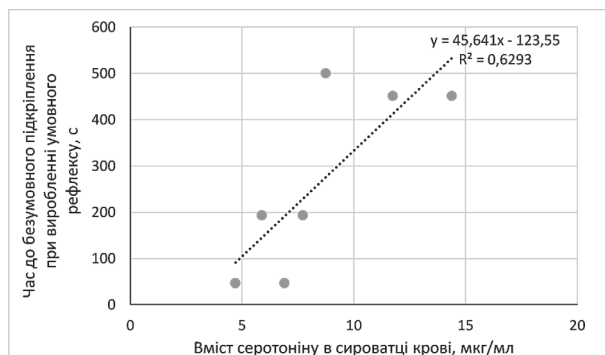


Рис. 5. Кореляція між неврологічним параметром (часом до безумовного підкріплення при виробленні умовного рефлексу – знаходження їжі в Т-подібному лабіринті) та вмістом серотоніну в сироватці крові щурів з печінковою енцефалопатією (ПЕ) на тлі цирозу печінки, викликаного введенням тетрахлористого вуглецю ($n=7$, $M\pm m$): коефіцієнт кореляції $r=0,793$ ($p<0,05$). R^2 – достовірність апроксимації.

($p<0,05$) (рис. 6). Таким чином зростання вмісту серотоніну було пов'язане з більш суттєвим ураженням печінки та відповідно вищими рівнями АЛТ і АСТ.

Результати роботи свідчать про важливість визначення параметрів серотонінергічної системи для комплексної діагностики ПЕ.

Висновки

1. За умов експериментальної печінкової енцефалопатії у щурів спостерігаються суттєві зміни серотонінергічної системи, які супроводжуються зростанням вмісту серотоніну в крові та зменшенням його в мозковій тканині, а також зміною активності

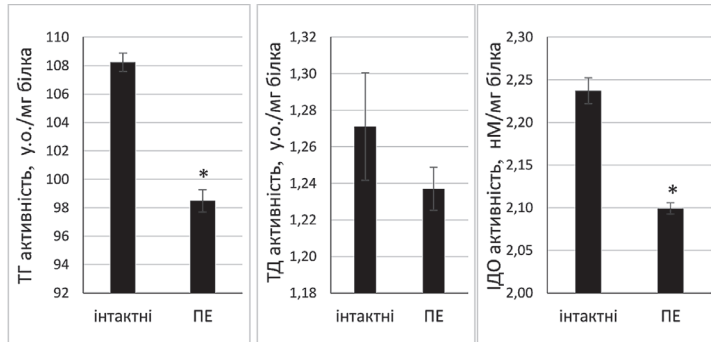


Рис. 4. Триптофан-гідроксилазна (ТГ), триптофан-декарбоксилазна (ТД), індоламін 2, 3-дигідрогеназна (ІДО) активність в гомогенаті головного мозку щурів з печінковою енцефалопатією (ПЕ) на тлі цирозу печінки, викликаного введенням тетрахлористого вуглецю ($n=10$, $M\pm m$). * $p<0,05$.

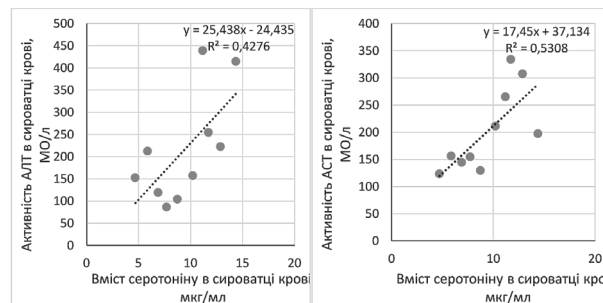


Рис. 6. Кореляція між активністю АЛТ та АСТ та вмістом серотоніну в сироватці крові щурів з печінковою енцефалопатією (ПЕ) на тлі цирозу печінки, викликаного введенням тетрахлористого вуглецю ($n=10$, $M\pm m$). Коефіцієнт кореляції між АЛТ і серотоніном $r=0,654$ ($p<0,05$), між АСТ і серотоніном $r=0,729$ ($p<0,05$). R^2 – достовірність апроксимації.

ключових ферментів синтезу та катаболізму серотоніну.

2. Зростання серотоніну в крові корелює з неврологічними порушеннями вироблення умовного рефлексу, а саме зі збільшенням часу знаходження їжі щурами в Т-подібному лабіринті, та супроводжується зростанням маркерів цитолізу печінки АЛТ та АСТ.

Перспективи подальших досліджень. Точна діагностика печінкової енцефалопатії на основі вивчення кореляції біохімічних та неврологічних параметрів є підґрунтям для подальшого пошуку та вивчення терапевтичної активності нових препаратів для корекції порушень, що розвиваються на тлі патології печінки із супутнім порушенням мозкової функції.

Література

1. Балаклеевский А.И. Колориметрический способ определения активности моноаминоксидазы в сыворотки крови / А.И. Балаклеевский // Лабораторное дело. – 1976. – №. 3. – С. 151-152.
2. Войтенко В.В. Механізми виникнення переддіабетичного стану за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації / В.В. Войтенко, В.В. Конопельнюк, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко // Фізіол. журн. – 2013. – Т. 59, №. 4. – С. 33-39.
3. Манжалій Е.Г. Покращення моделювання та діагностики печінкової енцефалопатії у щурів / Е.Г. Манжалій, Т.М. Кондратюк, В.Є. Фалалеева, О.В. Вірченко, Д.В. Голишкін // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Т. 126, №. 1. – С. 239-243.
4. Dhanda S. Role of dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in behavioral alterations observed in rodent model of hepatic encephalopathy / S. Dhanda, R. Sandhir // Behavioural brain research. – 2015. – Vol. 286. – P. 222-235.

5. Kuhn D.M. Activation of brain tryptophan hydroxylase by atp-mg²⁺: dependence on calmodulin / D.M. Kuhn, J.P. O'Callaghan, J. Juskevich, W. Lovenberg // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1980. – Vol. 77, №. 8. – P. 4688-4691.
6. Palomero-Gallagher N. Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy: a review / N. Palomero-Gallagher, K. Zilles // Archives of biochemistry and biophysics. – 2013. – Vol. 536, №. 2. – P. 109-121.
7. Sangwan R.S. Direct fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay of l-tryptophan decarboxylase from catharanthus roseus leaf / R.S. Sangwan, S. Mishra, S. Kumar // Analytical biochemistry. – 1998. – Vol. 255, №. 1. – P. 39-46.
8. Weissbach H. A simplified method for measuring serotonin in tissues; simultaneous assay of both serotonin and histamine / H. Weissbach, T.P. Waalkes, S. Udenfriend // The Journal of biological chemistry. – 1958. – Vol. 230, №. 2. – P. 865-871.

УДК 616.36-004+615.917+612.821.5

РОЛЬ СЕРОТОНІНУ В РОЗВИТКУ ПЕЧІНКОВОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ

Манжалій Е. Г., Вірченко О. В., Фалалєєва Т. М., Савчук О. М., Берегова Т. В.

Резюме. Метою даної роботи було оцінити зміни серотонінергічної системи за умов печінкової енцефалопатії (ПЕ) щурів та визначити їх діагностичну цінність для встановлення важкості порушень мозкової діяльності. Для моделювання ПЕ тваринам вводили внутрішньочеревинно 1 мл/кг 15% розчину CCl₄ в оливковій олії чотири рази на тиждень впродовж 4 тижнів. Визначали вміст серотоніну та триптофану, а також моноаміноксигеназу (MAO) активність в гомогенаті головного мозку та сироватці крові щурів, триптофан-гідроксилазу (ТГ), триптофан-декарбоксілазу (ТД), індоламін 2,3-диоксигеназу (ІДО) активність в мозку за стандартними біохімічними методиками. Встановлено порушення серотонінергічної системи у щурів з ПЕ. Виявлені різноспрямовані зміни вмісту серотоніну: зменшення в мозку на 60% (p<0,05), та збільшення в крові на 233% (p <0,05) в порівнянні з інтактними щурами. Вміст серотоніну в крові позитивно корелював з показниками когнітивних порушень при моделюванні харчового умовного рефлексу на щурах в Т-подібному лабіринті, а також з маркерами цитолізу печінки – активністю аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази. Результати роботи свідчать про важливість визначення параметрів серотонінергічної системи для комплексної діагностики ПЕ.

Ключові слова: CCl₄, цирроз печінки, печінкова енцефалопатія, серотонін.

УДК 616.36-004 + 615.917 + 612.821.5

РОЛЬ СЕРОТОНИНА В РАЗВИТИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Манжалій Е. Г., Вірченко О. В., Фалалєєва Т. М., Савчук А. Н., Береговая Т. В.

Резюме. Целью данной работы было оценить изменения серотонинергической системы в условиях печеночной энцефалопатии (ПЭ) крыс и определить их диагностическую ценность для установления тяжести нарушений мозговой деятельности. Для моделирования ПЭ животным вводили внутривенно 1 мл/кг 15% раствора CCl₄ в оливковом масле четыре раза в неделю в течение 4 недель. Определяли содержание серотонина и триптофана, а также моноаминоксидазную (MAO) активность в гомогенате головного мозга и сыворотке крови крыс, триптофан-гидроксилазную (ТГ), триптофан-декарбокксилазную (ТД), индоламин 2,3-диоксигеназную (ИДО) активность в мозге по стандартным биохимическим методикам. Установлено нарушение серотонинергической системы у крыс с ПЭ. Обнаружены разнонаправленные изменения содержания серотонина: уменьшение в мозгу на 60% (p <0,05) и увеличение в крови на 233% (p <0,05) по сравнению с интактными крысами. Содержание серотонина в крови положительно коррелировало с показателями когнитивных нарушений при моделировании пищевого условного рефлекса на крысах в Т-образном лабиринте, а также с маркерами цитолиза печени – активностью аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы. Результаты работы свидетельствуют о важности определения параметров серотонинергической системы для комплексной диагностики ПЭ.

Ключевые слова: CCl₄, цирроз печени, печеночная энцефалопатия, серотонин.

UDC 616.36-004 + 615,917 + 612.821.5

THE ROLE OF SEROTONIN IN THE DEVELOPMENT OF HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Manzhaliy E. G., Virchenko O. V., Falalayeva T. M., Savchuk O. M., Beregova T. V.

Abstract. Growing evidence indicates the implication of serotonin (5HT) system in the conditions of liver cirrhosis (LC) and concomitant hepatic encephalopathy (HE) but the overall picture of the changes of all components of serotonergic system in brain and blood has not been elucidated yet. Moreover, there is still a lack of clear data about the correlation of blood 5HT with markers of cytolysis such as the activity of alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). In the previous study we have established the diagnostic value of the investigation of conditioned reflex on rats in the T-shaped maze and have shown the increase of the time of finding food by rats with HE. However, there is still an open question about the connection between blood level of 5HT and neurological parameters of rats namely cognitive functions and the remembering the location of food in T-shaped maze. That is why the aim of the study was to establish the level of 5HT and tryptophan in blood and brain tissue, the activity of the enzymes for 5-HT synthesis and catabolism, and to correlate the blood 5HT with parameters of conditioned reflex and ALT, AST in rats.

Two groups of rats were included for the study: intact rats and CCl₄+rats. Intraperitoneally administration of 1 ml/kg 15% solution of CCl₄ in olive oil four times a week for 4 weeks has been done for the modeling of LC and HE in rats. Then the formation of a food conditioned reflex in the T-shaped maze were studied for 14 days. In rat

brain tissue, 5HT and tryptophan level, the activity of monoamine oxidases (MAO), tryptophan hydroxylase (TPH), tryptophan decarboxylase (TPDC) and indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase (IDO) were measured by standard biochemical methods. In rat blood, we estimated the level of 5HT, tryptophan, and the activity of MAO, ALT and AST.

The level of 5HT in the brain of rats with LC decreased by 60% ($p < 0.05$), and in the blood it raised by 233% ($p < 0.05$) compared to intact rats. Tryptophan level in the brain did not differ, contrary, in the blood it increased by 150% ($p < 0.05$). These have shown the dysregulation in the serotonergic system in the conditions of HE. The MAO activity, which indicates the catabolism level of 5HT, raised in the blood, contrary in brain it was fallen. This shows that the decreased level of brain 5HT is not associated with its catabolism but primarily with impaired function and destruction of serotonin synthesizing structures. We have also found the change of the activity of the key enzymes of the serotonergic system in the CCl_4 +rats: the reduction of the TPH and IDO activity in the brain; however, the activity of TPDC did not changed.

We have found the positive correlation of 5HT with the neurological parameters namely the increase in time of the reaching food in the maze at rate 0.793 ($p < 0.05$). Blood 5HT positively correlated with ALT (0.654 ($p < 0.05$)) and AST (0.729 ($p < 0.05$)). These indicate the association of the state of serotonergic system with the liver injury and the impairment of the cognitive functions.

These findings have shown the imbalance in the parameters of serotonergic system in blood and brain tissue in the condition of LC. The data are agreed with the earlier findings of other studies and can be partially explained by the toxic effect of ammonia on the serotonin producing cells. The greater alteration in blood 5HT is associated with the more severe neurological impairment and liver injury. Results indicate the importance of determining the parameters of serotonergic system for a comprehensive diagnosis of HE.

Keywords: CCl_4 , liver cirrhosis, hepatic encephalopathy, serotonin.

Рецензент – проф. Литвиненко Н. В.

Стаття надійшла 10.05.2016 року