

# Метаболиты мозга у крыс линий НИСАГ и Вистар

О.Б. Шевелев, А.А. Серяпина, А.Л. Маркель, М.П. Мошкин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Гипертоническая болезнь относится к одному из наиболее распространенных заболеваний человека. Эта болезнь приводит к таким серьезным нарушениям, как инфаркт миокарда, инсульт. Благодаря развитию спектроскопии ядерно-магнитного резонанса показано, что у людей с артериальной гипертензией наблюдается снижение жизнеспособности нейронов различных отделов головного мозга. Трансляция в клиническую практику методов спектроскопии ядерно-магнитного резонанса требует накопления эмпирических данных об изменениях нейрометаболизма в условиях строго контролируемого эксперимента. В частности, представляет интерес сравнение метаболомных параметров у лабораторных животных с нормальным и повышенным артериальным давлением, содержащихся в стандартных условиях, на одинаковой диете. В представленной работе исследованы метаболиты коры головного мозга и гипоталамуса самцов крыс гипертензивной линии НИСАГ (ISIAH) и нормотензивной линии Wistar в возрасте 8–9 нед. У животных, находящихся под газовым наркозом (изофлюран), проводили методом протонной спектроскопии ядерно-магнитного резонанса ( $^1\text{H}$  МРС) измерение метаболитов в коре головного мозга и гипоталамусе. Обработка первичных данных с помощью анализа Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) позволила выделить основную дискриминирующую ось ( $Y_1$ ), вариации которой отражали преобладание возбуждающих нейрометаболитов (глутамина и глутамата) над тормозными (ГАМК и глицином). Значения оси  $Y_1$  в коре головного мозга были выше у крыс линии Wistar по сравнению с линией НИСАГ, что указывает на снижение возбудимости коры головного мозга у гипертензивных животных. В гипоталамусе, наоборот, величина оси  $Y_1$  была выше у крыс линии НИСАГ, чем у крыс линии Wistar. При этом преобладание возбуждающих нейрометаболитов положительно коррелировало с уровнем среднего артериального давления, что хорошо согласуется с представлением об активации каудальных отделов гипоталамуса у гипертензивных животных.

Ключевые слова: метаболиты головного мозга;  $^1\text{H}$  МРС; гипертензия; Рейши.

## Brain metabolites in ISIAH and Wistar rats

O.B. Shevelev, A.A. Seryapina, A.L. Markel, M.P. Moshkin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Hypertension is one of the most common human diseases. This disease leads to serious disturbances such as myocardial infarction and stroke. Due to the development of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMRS), a decrease in neuron viability in different parts of the brain in humans with hypertension has been shown. Translation of NMRS tools to the clinic requires the accumulation of empirical data about neurometabolic changes in a strictly controlled experiment. It is particularly interesting to compare the metabolic parameters of laboratory animals with normal and high blood pressure kept in the standard conditions on exactly the same diet. In this study, cortex and hypothalamus metabolites of ISIAH and Wistar male rats at the age of 8–9 weeks were examined. Cortex and hypothalamus metabolites were measured in animals under isoflurane anesthesia using proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  MRS). Processing of primary data using Partial least squares Discriminant Analysis (PLS-DA) allowed us to identify the main discriminating axis ( $Y_1$ ), its variations reflecting the predominance of excitatory neurometabolites (glutamine and glutamate) over inhibitory ones (GABA and glycine). In the cortex, the values of the  $Y_1$ -axis were lower in ISIAH than in Wistar rats. This fact indicates a decrease in cortical excitability in hypertensive animals. By contrast, in the hypothalamus, the values of the  $Y_1$ -axis were higher in ISIAH than in Wistar rats and the predominance of excitatory neurometabolites positively correlated with the level of mean blood pressure, which agrees well with the view of caudal hypothalamic activation in hypertensive animal models.

Key words: brain metabolites;  $^1\text{H}$  MRS; hypertension; Reishi.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Шевелев О.Б., Серяпина А.А., Маркель А.Л., Мошкин М.П. Метаболиты мозга у крыс линий НИСАГ и Вистар. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):427–431. DOI 10.18699/VJ15.056

### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Shevelev O.B., Seryapina A.A., Markel A.L., Moshkin M.P. Brain metabolites in ISIAH and Wistar rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):427–431. DOI 10.18699/VJ15.056

DOI 10.18699/VJ15.056

УДК 577.121

Поступила в редакцию 17.07.2015 г.

Принята к публикации 31.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: shevelev.oleg.nsk@gmail.com; mmp@bionet.nsc.ru

Как известно, гипертоническая болезнь является болезнью века. Это заболевание выступает в роли фактора риска для инфаркта миокарда, инсульта и других сердечно-сосудистых нарушений. Кроме того, хроническое течение артериальной гипертензии сопровождается целым комплексом психосоматических отклонений, среди которых заметное место занимают приступы бессонницы, депрессия, падение умственной работоспособности и др. (Carnevale et al., 2012; Кауано et al., 2015). В качестве одной из причин нейрональных расстройств рассматриваются дефицит кровоснабжения различных отделов мозга и, как следствие, изменения нейрометаболизма.

В последние годы благодаря развитию спектроскопии ядерно-магнитного резонанса, стало возможным изучение метаболитов головного мозга без очевидных негативных воздействий на пациентов. Эти исследования показали, что у лиц с артериальной гипертензией имеет место снижение уровня N-ацетиласпартата и холина во фронтальной коре головного мозга (Cao et al., 2015) и таламусе (Ben Salem et al., 2008), которые являются показателями жизнеспособности нейронов. Пока немногочисленные результаты спектроскопических исследований указывают на перспективность прижизненного определения параметров нейрометаболизма у пациентов с различными формами артериальной гипертензии. Для трансляции этой методологии в клиническую практику большое значение имеет накопление данных прижизненной спектроскопии мозга, полученных в условиях контролируемого лабораторного эксперимента, в частности при фенотипировании генетических линий мышей и крыс с наследственной артериальной гипертензией.

В ИЦиГ СО РАН методами селекции на значительное повышение артериального давления в условиях эмоционального стресса (Markel, 1992) получена генетическая линия крыс НИСАГ (наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия), которая и послужила объектом для изучения методом протонной спектроскопии ядерно-магнитного резонанса ( $^1\text{H}$  МРС) особенностей метаболизма в коре головного мозга и гипоталамуса. Для сравнения были исследованы метаболиты тех же отделов мозга у крыс нормотензивной линии Wistar.

## Материалы и методы

### Экспериментальные животные и условия содержания

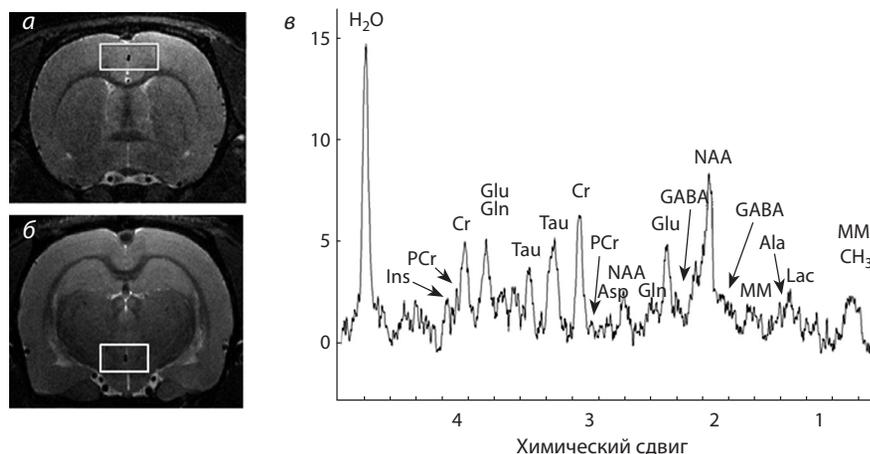
Всех животных содержали в соответствии с правилами Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН в условиях без патогенов. Исследование выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI62114X0010). Было исследовано 12 лабораторных крыс линии НИСАГ и 13 лабораторных крыс линии Wistar в возрасте 8–9 нед. Животных содержали по одному в индивидуально вентилируемых клетках высотой 20,5 см и площадью 929 см<sup>2</sup> (OptiRAT, Animal Care, США), при свободном доступе к воде и гранулированному корму для лабораторных грызунов SPF-категории содержания «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия), искусственном фотопериоде

14С:10Т, температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. В качестве подстилочного материала использовали сухие обеспыленные опилки (ООО «Альбион», Новосибирск). Корм и подстилку перед использованием автоклавировали при температуре 121 °С. Для поения животных использовали деионизированную воду, полученную на установке Millipore, после обогащения минеральной добавкой «Северянка» (ООО «Эко-Проект», Санкт-Петербург). Содержание и изучение животных выполнены в соответствии с нормами GLP и правилами Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

### Схема эксперимента

За два дня до томографии у животных измеряли неинвазивным методом систолическое и диастолическое артериальное давление на аппарате CODA Standard (Kent Scientific Corporation, США). Среднее динамическое артериальное давление рассчитывали по формуле: (систолическое давление – диастолическое давление)/3 + диастолическое давление. Исследования нейрометаболитов проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, Biospec 117/16 USR, Германия). При помощи  $^1\text{H}$  радиочастотных катушек исследовали диаметр брюшной аорты, почечных и сонных артерий, объемную скорость кровотока в указанных сосудах, а также уровни метаболитов коры головного мозга и гипоталамуса крыс. За 5 мин до исследования крыс обездвигивали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Malta). Температуру животных поддерживали благодаря использованию водного контура в томографическом столике-кроватке, имевшем температуру поверхности 30 °С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

$^1\text{H}$  МРС. Все протонные спектры головного мозга крыс получены с использованием передающей объемной (500,3 МГц, диаметр 72/89 мм) и приемной поверхностной (500,3 МГц, размером 123 × 64 × 31 мм)  $^1\text{H}$  радиочастотных катушек. Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей, размер которых составлял 1,6 × 4,0 × 3,0 мм, методом RARE (rapid with relaxation enhancement) с параметрами импульсной последовательности TE = 11 мс, TR = 2,5 с были сняты T2-взвешенные изображения головного мозга крысы высокого разрешения (толщиной среза 0,5 мм, полем обзора 2,5 × 2,5 см и размером матрицы 256 × 256 точек). Расположение вокселя на аксиальном срезе показано на рис. 1, а, б. Все протонные спектры получены с помощью пространственно локализованной одновоксельной спектроскопии методом STEAM (stimulated echo acquisition mode spectroscopy) с параметрами импульсной последовательности TE = 3 мс, TR = 5 с и количеством накоплений 100. Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя с помощью методики FastMap. Подавление сигнала воды в спектрах осуществлялось с помощью импульса переменной мощности и оптимизированной задержки релаксационной последовательности (VAPOR).



**Рис. 1.** Расположение вокселя для  $^1\text{H}$  МРС коры головного мозга (а) и гипоталамуса (б).

в – типичный спектр и расшифровка названий метаболитов: Ins – мио-инозитол; PCr – фосфокреатин; Cr – креатин; Glu – глутаминовая кислота; Gln – глутамин; Tau – таурин; Asp – аспарат; NAA – N-ацетиласпарат; GABA – гамма-аминомасляная кислота; MM – макромолекулы; Ala – аланин; и Lac – лактат.

**Обработка  $^1\text{H}$  спектров.** Для обработки экспериментальных спектров  $^1\text{H}$  МРС и определения количественного состава метаболитов использовалась оригинальная разработанная специализированная компьютерная программа, основанная, как и программный пакет LCModel (Provencher, 1993), на предположении о том, что спектр смеси известных соединений представляет собой линейную комбинацию спектров анализируемых компонентов. Подробное описание работы программы представлено в статье Moshkin с соавт. (2014).

**Статистика.** Данные представлены как Mean  $\pm$  SE. Сравнения средних значений с контролем выполнены на основе метода наименьших значимых различий – one-way ANOVA, Post-hoc LSD-test. Число начальных переменных, характеризующее относительное количество метаболитов мозга, было уменьшено с помощью анализа Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). Корреляции осей PLS-DA с метаболитами анализировали методом Пирсона.

## Результаты

Как показала протонная ЯМР спектроскопия коры головного мозга и гипоталамуса, содержание отдельных метаболитов не отличалось на статистически значимом уровне между линиями НИСАГ и Wistar (таблица). Вместе с тем были выявлены межлинейные отличия по метаболомным паттернам, для анализа которых использовали общепринятую в ЯМР-спектроскопических исследованиях многомерную статистику (Allen et al., 2013). Методом PLS DA для метаболитов коры головного мозга выделена ось  $Y_1$ , характеризующая изменчивость сопряженных переменных (рис. 2), которая положительно коррелировала с уровнями глутамин + глутамат, мио-инозитолом, N-ацетиласпаратом и отрицательно – с уровнем глицина. У крыс линии НИСАГ значения этой оси были отрицательными, а у крыс линии Вистар – положительными.

Для метаболитов гипоталамуса выделена ось  $Y_1$ , характеризующая изменчивость сопряженных переменных (рис. 3), которая отрицательно коррелировала с уровнями гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), лактатом и положительно – с уровнями суммы глутамин + глутамат, мио-инозитолом. У крыс линии НИСАГ значения этой оси были положительными, а у крыс линии Вистар – отрицательными.

Среднее артериальное давление положительно коррелировало со значениями оси  $Y_1$  в гипоталамусе ( $r = 0,48, p < 0,02$ ), и отрицательно в коре головного мозга ( $r = -0,40, p < 0,05$ ).

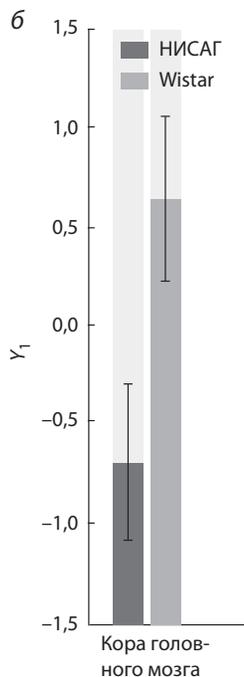
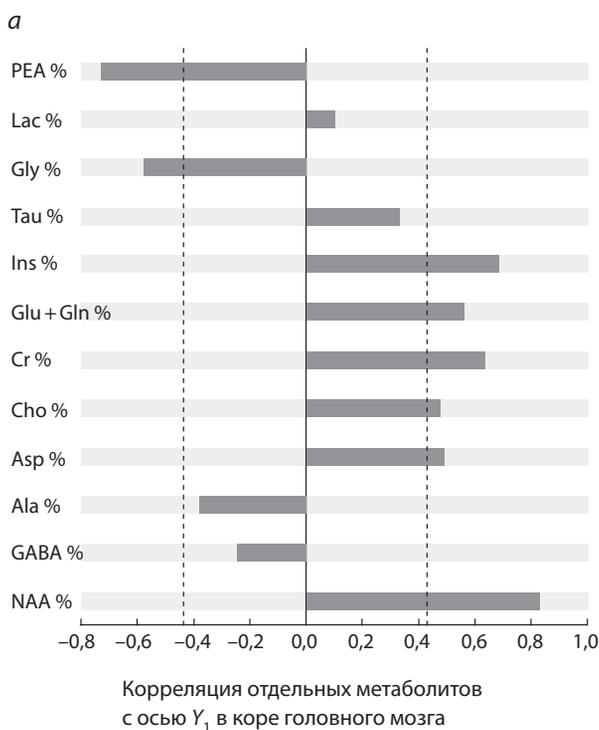
## Обсуждение

Поскольку значения оси  $Y_1$ , выявленной для коры головного мозга, положительно коррелировали с суммарным уровнем возбуждающих нейромедиаторов (глутамин + глутамат) и отрицательно с уровнем тормозного нейромедиатора (глицин), а также положительно коррелировали с уровнем маркера функции глии и нейрональной активности (мио-инозитол) (Громова и др., 2013; Tušková et al., 2015) и маркером доли нормально функционирующих нейронов (N-ацетиласпарат) (Tušková et al., 2015), то вариации данной оси можно отождествить с преобладанием возбуждающих нейромедиаторов над тормозными, а также с активностью нейронов и глии. Исходя из наших данных, возбудимость и функциональная активность нейронов и глии коры головного мозга крыс линии НИСАГ ниже, по сравнению с линией Wistar. В работе И.О. Мешкова с соавт. (2012) было показано, что в тесте открытого поля крысы линии НИСАГ демонстрировали большую исследовательскую активность, а в тесте на звуковой раздражитель – пониженную тревожность по сравнению с нормотензивной линией крыс. Результаты поведенческого тестирования хорошо соотносятся с нашими данными о пониженной возбудимости коры головного мозга у крыс линии НИСАГ.

Значения оси  $Y_1$ , выявленной для гипоталамуса, отрицательно коррелировали с тормозным нейромедиатором (ГАМК) и положительно – с суммой возбуждающих нейромедиаторов (глутамин + глутамат); положительно коррелировали с уровнем маркера функции глии (мио-инозитол) (Громова и др., 2013; Tušková et al., 2015) и отрицательно – с маркером кислородного дефицита (лактат) (Silachev et al., 2015). Вариации этой оси можно отождествить с преобладанием возбуждающих нейромедиаторов над тормозными, а также с повышением активности глии. Следовательно, у крыс линии НИСАГ уровень нейрональной активности гипоталамуса выше, по сравнению с нормотензивными крысами. В работе Крамера с соавт. (Kramer et al., 2000) было показано, что при моделировании артериальной гипертензии возрастает

Относительные значения отдельных метаболитов (в % от суммы всех метаболитов) в коре головного мозга и гипоталамусе крыс линий НИСАГ и Вистар (*in vivo*  $^1\text{H}$  МРС)

Генетическая линия	Кора головного мозга					
	NAA % (N-ацетил-аспартат)	GABA % (гамма-амино-масляная кислота)	Ala % (аланин)	Asp % (аспартат)	Cho % (холин)	Cr % (креатин)
НИСАГ ( $n = 12$ )	17,23 ± 0,65	2,91 ± 0,52	3,53 ± 0,71	0,09 ± 0,01	0,82 ± 0,15	13,78 ± 0,87
Вистар ( $n = 13$ )	18,78 ± 0,62	3,81 ± 0,76	2,76 ± 0,73	0,31 ± 0,20	1,10 ± 0,13	14,45 ± 1,08
	Гипоталамус					
	NAA %	GABA %	Ala %	Asp %	Cho %	Cr %
НИСАГ ( $n = 12$ )	12,48 ± 0,61	1,63 ± 0,39	4,44 ± 1,08	2,52 ± 0,89	1,94 ± 0,32	13,87 ± 0,94
Вистар ( $n = 13$ )	13,04 ± 1,03	3,52 ± 1,02	7,13 ± 1,76	1,50 ± 0,55	2,13 ± 0,34	13,89 ± 1,07
	Гипоталамус					
	Glu + Gln % (глутамин и глутамат)	Ins % (мио-инозитол)	Tau % (таурин)	Gly % (глицин)	Lac % (лактат)	PEA % (фосфорил-этанол-амин)
НИСАГ ( $n = 12$ )	16,09 ± 1,19	4,82 ± 1,86	4,18 ± 0,37	19,48 ± 3,13	6,37 ± 1,15	10,70 ± 1,78
Вистар ( $n = 13$ )	16,89 ± 1,23	7,23 ± 1,91	4,78 ± 0,49	15,47 ± 3,32	5,73 ± 1,63	8,68 ± 1,72



нейрональная активность каудальной части гипоталамуса, оцененная по электрофизиологическим критериям и по падению концентрации ГАМК.

Индивидуальные вариации среднего артериального давления коррелируют со значениями оси  $Y_1$ , отражающей преобладание возбуждающих нейромедиаторов над тормозными. Причем для метаболитов коры головного мозга эта корреляция положительная, а для гипоталамуса – отрицательная. Разнонаправленная взаимозависимость согласуется с данными литературы о противоположном влиянии барорецепторов мозговых артерий на нейрональную активность в коре головного мозга (Rau, Elbert, 2001; Pramlea et al., 2015) и гипоталамусе (Kawabe et al., 2012).

### Благодарности

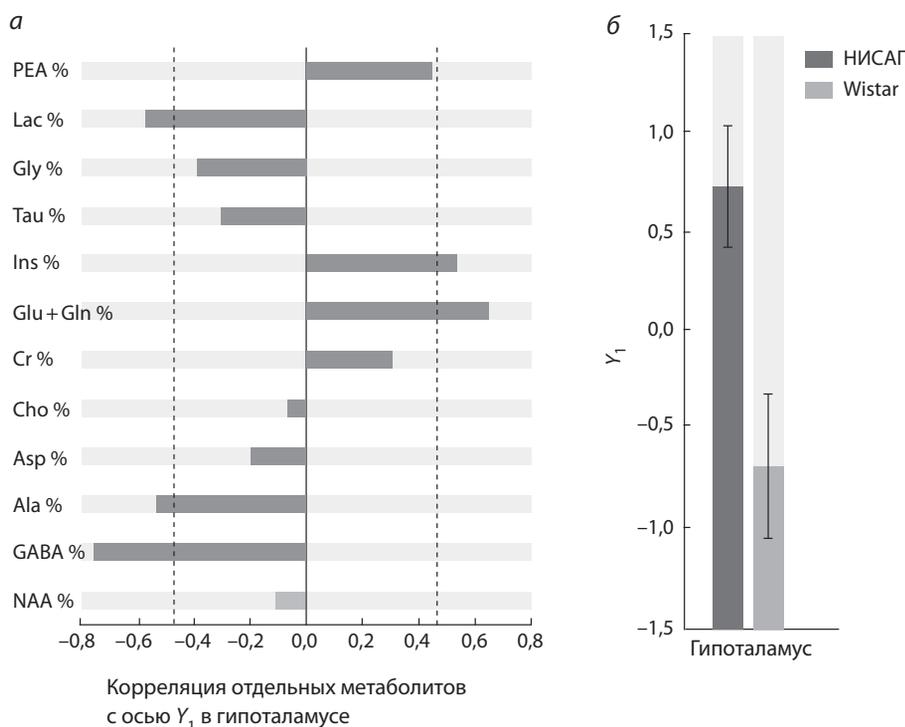
Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Магнитно-резонансная спектроскопия выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-14-00221), обработка спектров  $^1\text{H}$  МРС проведена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00020).

Преобладание возбуждающих нейромедиаторов над тормозными, повышение активности нейронов и функции глии

Эффективность общего метаболизма и энергообмена

**Рис. 2.** Корреляция отдельных метаболитов со значениями оси  $Y_1$  в коре головного мозга крыс (а); значения оси  $Y_1$  в коре головного мозга крыс (б).

PEA – фосфорилэтанол-амин; Lac – лактат; Gly – глицин; Tau – таурин; Ins – мио-инозитол; Glu – глутаминовая кислота; Gln – глутамин; Cr – креатин; Cho – холин; Asp – аспартат; Ala – аланин; GABA – гамма-аминомасляная кислота; NAA – N-ацетиласпартат.



Преобладание возбуждающих нейромедиаторов над тормозными, повышение активности нейронов и функции глии

**Рис. 3.** Корреляция отдельных метаболитов со значениями оси Y<sub>1</sub> в гипоталамусе крыс (а); значения оси Y<sub>1</sub> в гипоталамусе крыс (б).

Расшифровку метаболитов см. в подписи к рис. 2.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Громова О.А., Торшин И.Ю., Гришина Т.Р., Громов А.Н., Лиманова О.А. Систематический анализ молекулярно-физиологических эффектов мио-инозитола: данные молекулярной биологии, экспериментальной и клинической медицины. *Акушерство и гинекология*. 2013;3:4-12.
- Мешков И.О., Алехина Т.А., Морева Т.А., Маркель А.Л. Характеристика поведения гипертензивных крыс линии НИСАГ. *Журн. высш. нервн. деят-сти*. 2012;62(2):1-10.
- Allen G.I., Peterson C., Vannucci M., Maletic-Savatić M. Regularized partial least squares with an application to NMR spectroscopy. *Stat. Anal. Data Min.* 2013;6(4):302-314.
- Ben Salem D., Walker P.M., Bejot Y., Aho S.L., Tavernier B., Rouaud O., Ricolfi F., Brunotte F. N-acetylaspartate/creatine and choline/creatine ratios in the thalami, insular cortex and white matter as markers of hypertension and cognitive impairment in the elderly. *Hypertens. Res.* 2008;31(10):1851-1857. DOI: 10.1291/hypres.31.1851
- Cao Z., Ye B.D., Shen Z.W., Cheng X.F., Yang Z.X., Liu Y.Y., Wu R.H., Geng K., Xiao Y.Y. 2D-1H proton magnetic resonance spectroscopic imaging study on brain metabolite alterations in patients with diabetic hypertension. *Mol. Med. Rep.* 2015;11(6):4232-4238. DOI: 10.3892/mmr.2015.3305
- Carnevale D., Mascio G., D'Andrea I., Fardella V., Bell R.D., Branchi I., Pallante F., Zlokovic B., Yan S.S., Lembo G. Hypertension induces brain  $\beta$ -amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature. *Hypertension*. 2012;60(1):188-197. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.195511
- Kawabe T., Kawabe K., Sapru H.N. Effect of barodenervation on cardiovascular responses elicited from the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. *PLoS One*. 2012;7(12):e53111. DOI: 10.1371/journal.pone.0053111
- Kayano H., Koba S., Matsui T., Fukuoka H., Kaneko K., Shoji M., Toshida T., Watanabe N., Geshi E., Kobayashi Y. Impact of depression on masked hypertension and variability in home blood pressure in treated hypertensive patients. *Hypertens. Res.* 2015. DOI: 10.1038/hr.2015.75
- Kramer J.M., Plowey E.D., Beatty J.A., Little H.R., Waldrop T.G. Hypothalamus, hypertension, and exercise. *Brain Res. Bull.* 2000;53(1): 77-85.
- Markel A. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Genet. Hypertension*. 1992;218:405-407.
- Moshkin M.P., Akulov A.E., Petrovski D.V., Saik O.V., Petrovskiy E.D., Savelov A.A., Koptyug I.V. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D-glucose and lipopolysaccharides. *NMR Biomed.* 2014;27: 399-405. DOI: 10.1002/nbm.3074
- Prammea L., Schächinger H., Fringsa C. Baroreceptor activity impacts upon controlled but not automatic distractor processing. *Biol. Psychol.* 2015;pii: S0301-0511(15)30011-9. DOI: 10.1016/j.biopsycho. 2015.06.006
- Provencher S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 1993;30(6):672-679.
- Rau H., Elbert T. Psychophysiology of arterial baroreceptors and the etiology of hypertension. *Biol. Psychol.* 2001;57(1-3):179-201.
- Silachev D.N., Gulyaev M.V., Zorova L.D., Khailova L.S., Gubsky L.V., Pirogov Y.A., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Zorov D.B. Magnetic resonance spectroscopy of the ischemic brain under lithium treatment. Link to mitochondrial disorders under stroke. *Chem. Biol. Interact.* 2015;237:175-182. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.06.012
- Tušková R., Lipták B., Szomolányi P., Vančová O., Uličná O., Sumbalová Z., Kucharová J., Dubovický M., Trattig S., Liptaj T., Kašparová S. Neuronal marker recovery after Simvastatin treatment in dementia in the rat brain: *in vivo* magnetic resonance study. *Behav. Brain Res.* 2015;284:257-264. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.02.016