Studiul modificãrilor aminoacizilor excitatori în boli neurologice prin analiza HPLC

RODICA LIANA MÃRGINEAN*
UMF Cluj-Napoca "Iuliu Haþieganu", Catedra de fiziopatologie, Str. Victor Babeº, Nr. 41, 400012, Cluj, România

Excitatory aminoacids (EAA) are responsible for the neurotoxicity in various neurological disorders. Their measurement through the HPLC method from the LCR fluid from pacients with stroke and epilepsy represents a marker in the evolution of the disorder.The possibility of using a neuroprotective therapy is connected with the changes from the critical days.

Keywords: excitatory aminoacids, HPLC method , stroke, epilepsy, neuroprotective therapy

Neurotoxicitatea, proprietatea unor factori de a produce leziuni cerebrale, a fost recunoscutã prin date experimentale în 1978 de cãtre Olney. Datele actuale permit realizarea unei imagini cuprinzãtoare privind mecanismele neurotoxicitãþii ºi implicarea lor în patogeneza unor boli cu morbiditate ridicatã în patologia actualã, cum ar fi ischemia cerebralã, epilepsia sau bolile degenerative ale creierului (boala Parkinson, boala Alzheimer, coreea Huntington) (Lutz F., º.a., 1993)[1]. Aminoacizii excitatori (EAA) constituie o verigã importantã în producerea leziunilor neuronale, în variate condiþii patologice (ischemia - hipoxia cerebralã, crizele convulsive). Acþiunea lor de neurotransmiþãtori se exercitã prin stimularea receptorilor celulari de tip NMDA sau non-NMDA (AMP) din numeroase zone nervos-centrale.

Mecanismul molecular al excitotoxicitãþii constã în favorizarea influxului excesiv de calciu în neuronul depolarizat, urmat de leziuni mitocondriale, producerea de radicali liberi ai oxigenului, care în final vor determina moartea celularã apoptoticã. Acþiunea excitotoxinelor este influenþatã de numeroºi factori locali, cum ar fi *p*H-ul, nivelul diferiþilor electroliþi, glicemia, temperatura (Komura J., º.a., 1990) [2]. EAA acþionează asupra neocortexului ºi hipocampului, în special în perioada de reperfuzie postischemicã în zona de penumbrã, prin acþiune atât pe receptorii NMDA cât ºi pe AMP [3].

EAA au efecte convulsivante demonstrate pe numeroase modele experimentale de electroºoc. MK-801 (dizocilpina) este cea mai puternicã substanþã anticonvulsivantã cunoscutã, fiind un antagonist necompetitiv al receptorilor NMDA, blocând calea hidrofobicã (respectiv ionoforul canalelor ionice). S-a demonstrat, de asemenea, cã MK-801 protejeazã zona CA_1 ºi hipocampul în timpul ischemiei cerebrale experimentale (Buchan A., º.a., 1991) [4]. În prezent, sunt puþine studii clinice care au urmãrit modificãrile aminoacizilor excitatori ºi efectele unor medicamente de tip antagonist al receptorilor pentru aminoacizii excitatori cu rol neuroprotector [3].

În lucrarea de faþã, ne-am propus sã evidenþiem eventualele modificãri ale nivelului din LCR al EAA, în afecþiuni neurologice în care implicarea aminoacizilor excitatori în patogeneza lor este demonstratã (AVC ischemic ºi epilepsia majorã) (Liana Mãrginean, Luminiþa Pleºca, 1995) [5], (Hobai S., 1996) [6].

Partea experimentalã

S-au luat în studiu clinic un numãr de 24 subiecþi, repartizaþi în 3 loturi, astfel : lotul I martor este format din 8 subiecþi sãnãtoºi ; lotul II este format din 8 pacienþi cu AVC ischemic acut constituit ; lotul III este format din 8 pacienþi cu epilepsie majorã. S-a recoltat de la toþi subiecþii LCR, pentru determinarea nivelului de aminoacizi. La lotul II, recoltarea s-a fãcut la 7 zile de la debutul clinic, iar la lotul III, la 3 zile postcritic.

Pentru determinarea aminoacizilor, s-a utilizat ca tehnicã analiza cromatograficã HPLC cu faze inversate, cu urmãtoarele caracteristici :

1. Aparatura utilizatã : Amino Sys Pharmacia LKB
- pompe ºi formare gradient : 2xHPLC pump 2248
  High Presure Mixer 2152
- injector : autosampler 2157
- coloana : Super Pac Pep-S
  5µm / 4,0 x 250mm
- detector : Fluorescence Detector 2144
  excitare 330 nm / emisie 450 nm
- preluarea datelor : Calculator cu HPLC manager 2146
  ºi program Nelson

2. Condiþiile de separare au fost urmãtoarele
- eluent A : 12,5 mM NaH_2PO_4 pH 7.2
  Preparat din 85 H_3PO_4 p.a. adus
  la pH 7,2 cu 30. NaOH p.a.
  Filtrat prin filtru 0,45 µm
- eluent B : 500 mL acetonitril HPLC grade ºi
  500 mL eluent A
- debit eluent : 1,2 mL / min.
- volum injectat : 10 µL
- gradient : 0 . B timp de 2 min
  0 - 40 B în 50 min
  40 - 100 B în 5 min

3. Metoda de derivatizare a fost :
- 15 µL din soluþia : 5 mg OPA (ortoftaldialdehidã)
  1050 µL 1 M borat de potasiu
  400 µL metanol
  5 µL acid 3-mercaptopropionic
- etalonarea s-a fãcut derivatizându-se o probã de 10 µL Protein Hidrolisate (SIGMA) care este formatã dintr-un amestec de 16 aminoacizi

4. Limita de detecþie : 5 pmol

* *email: margineanlianadoc@yahoo.com*

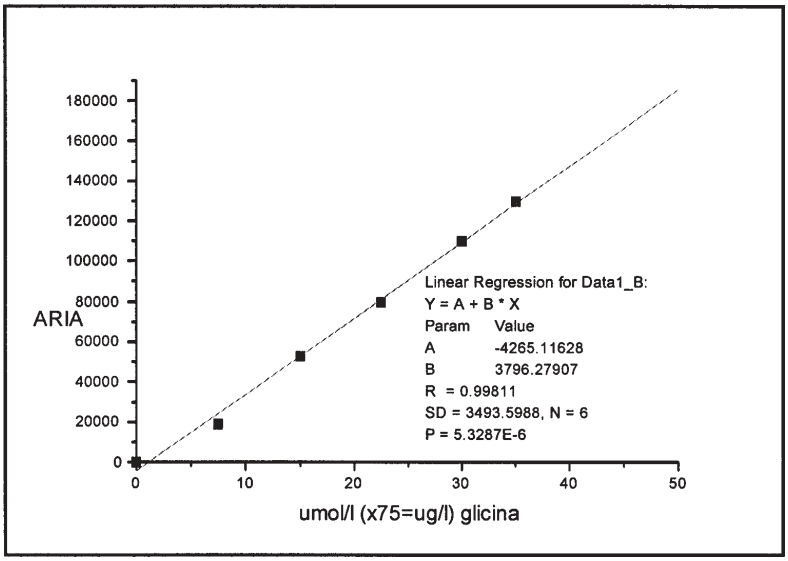

Fig. 1. Curba de calibrare pentru glicinã

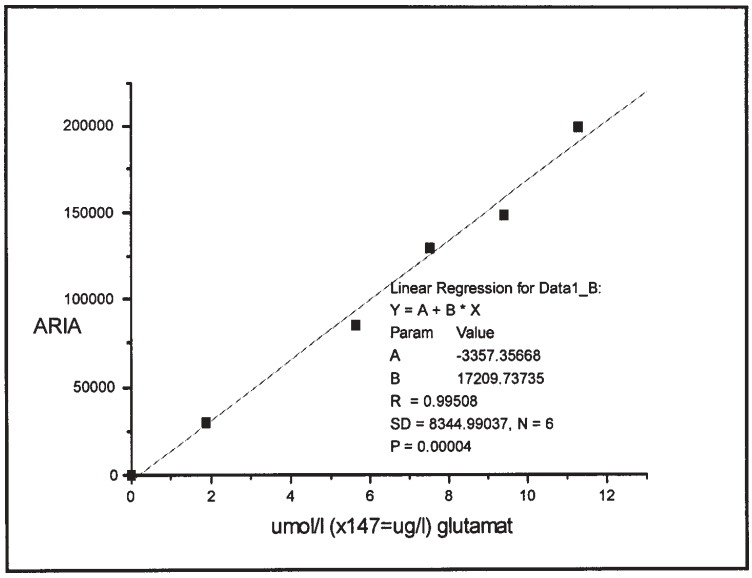

Fig. 2. Curba de calibrare pentru glutamat

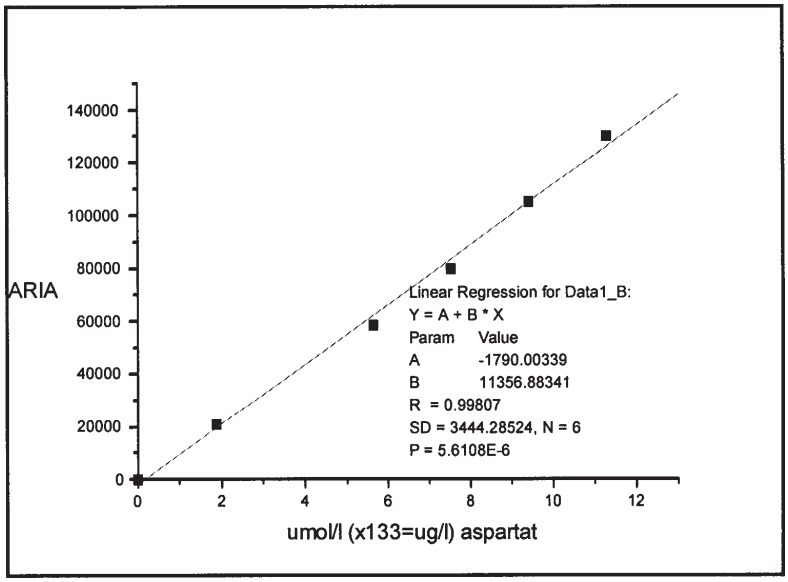

Fig. 3. Curba de calibrare pentru aspartat

Curbele de calibrare pentru glicinã, glutamat, aspartat obþinute cu substanþe etalon Merck sunt prezentate în figurile 1-3, iar în tabelul 1 ºi figura 4 valorile respective cromatograma obþinute pentru etalonare.

Tabelul 1

VALORILE ETALON ALE CROMATOGRAMEI

Pk No	Ret Time	Peak Area	Area .	B L	Peak Ht.	Normalised .	Area / Height
1	6.123	5717153	7.6901	1	268669	51.832	21.3
2	9.665	7121320	9.5788	1	249565	64.562	28.5
3	15.780	8604302	11.5735	1	266554	78.007	32.3
4	19.982	11030203	14.8366	1	258712	100.000	42.6
5	21.912	2280861	3.0680	1	89537	20.678	25.5
6	24.737	7142657	9.6075	1	225827	64.755	31.6
7	27.313	1546428	2.0801	2	164988	14.020	9.4
8	27.375	3724443	5.0097	2	177873	33.766	20.9
9	31.645	6600239	8.8779	1	206327	59.838	32.0
10	36.068	73308	0.0986	2	23457	0.665	3.1
11	36.477	3719147	5.0026	2	158513	33.718	23.5
12	38.537	4546324	6.1152	1	170600	41.217	26.6
13	43.833	371680	0.4999	1	21555	3.370	17.2
14	45.372	5192835	6.9848	1	161508	47.078	32.2
15	46.973	5162175	6.9436	1	177765	46.800	29.0
16	49.398	650987	0.8756	2	110144	5.902	5.9
17	49.627	632637	0.8510	2	91378	5.736	6.9
18	50.443	227914	0.3066	1	17210	2.066	13.2

Total Area : 74344608 Area Reject : 0 One sample per 0.100 sec.

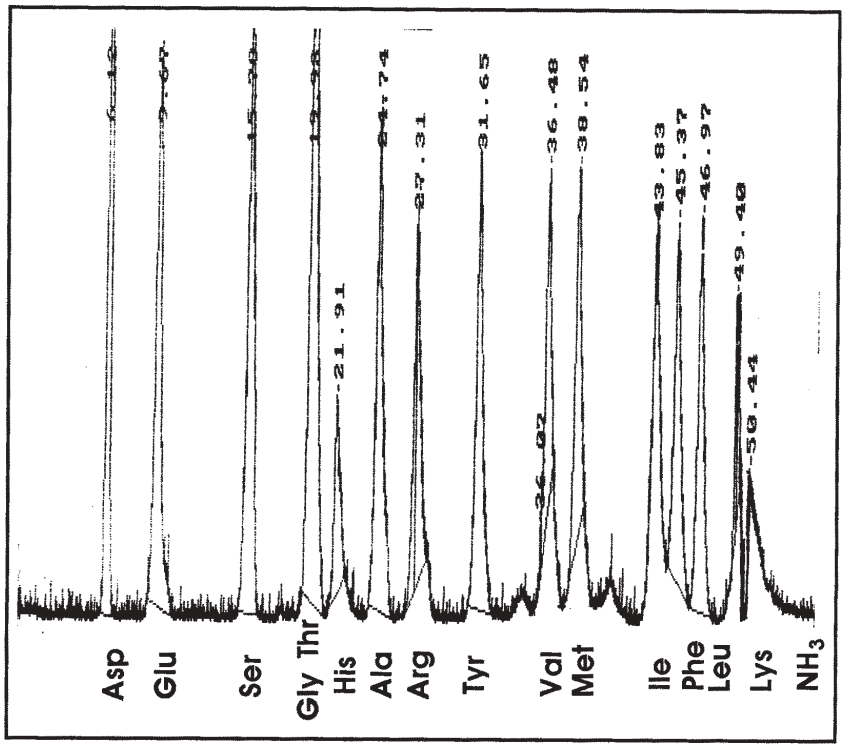

Fig. 4. Cromatograma etalon

Tabelul 2
VARIAÞIA MEDIEI ARITMETICE ªI A ABATERII STANDARD PENTRU ASPARTAT, GLUTAMAT ªI GLICINÃ LA LOTURILE STUDIATE

	Media aritmetică ± abaterea standard		
Probe\Specii	**ASPARTAT**	**GLUTAMAT**	**GLICINĂ**
LOT I (MARTOR)	2,23 ± 0,41	2,60 ± 0,72	8,48 ± 0,91
LOT II (AVC)	6,12 ± 0,30	9,66 ± 0,64	24,73 ± 0,24
LOT III (E)	5,28 ± 0,23	8,80 ± 0,71	21,03 ± 0,32

Tabelul 3
COMPARAÞIA STATISTICĂ (TESTUL t) PENTRU ASPARTAT, GLUTAMAT ªI GLICINĂ LA LOTURILE STUDIATE

COMPARAȚIA	ASPARTAT	GLUTAMAT	GLICINĂ
LOT I-II	**24,21**	**23,18**	**54,60**
LOT I-III	**20,52**	**19,89**	**41,14**
LOT II-III	**7,03**	2,85	**29,25**

Rezultate ºi discuþii

În tabelul 2 sunt prezentate valorile medii obþinute la glutamat, aspartat ºi glicinã pentru cele trei loturi studiate.

Compararea statisticã între loturi s-a fãcut utilizând testul t (Student). În tabelul 3 pentru compararea mediilor valoarea minimã a lui t pentru care existã o diferenþã semnificativã este de 4,140 (la o probabilitate de 99,9,, la o probabilitate a erorii de genul I având pragul de semnificaþie $\alpha / 2 = 0,05$ ºi la numãrul gradelor de libertate cumulativã G = 14).

S-au evidenþiat modificări (semnificative statistic) ale aminoacizilor excitatori, respectiv creºterea glutamatului, aspartatului ºi glicinei la pacienþii cu AVC ischemic (la 7 zile de la debutul clinic) ºi la pacienþii cu epilepsie (la 3 zile postcritic) faþã de lotul martor.

Comparaþia dintre loturile II ºi III aratã o creºtere mai semnificativã a aspartatului ºi a glicinei la lotul cu accident vascular cerebral ºi nesemnificativã a glutamatului.

Aceste date sugerează posibilitatea utilizării acestor determinări în monitorizarea evoluþiei pacienþilor din aceste categorii pentru atenuarea efectelor excitotoxice. Aplicarea unor terapii neuroprotectoare ar putea fi corelatã cu modificãrile înregistrate[7].

Concluzii

1. Analiza cromatograficã prin HPLC reprezintã o metodã sensibilã ºi precisã de determinare a aminoacizilor.

2. În ischemia cerebralã acutã aspartatul, glutamatul ºi glicina cresc în LCR în primele 7 zile de la debutul AVC ischemic ºi prezintã creºteri moderate în cazul epilepsiei la 3 zile postcritic.

3. Determinarea concentraþiei din LCR a aminoacizilor în anumite momente evolutive ale ischemiei cerebrale sau epilepsiei, poate constitui un reper paraclinic important pentru aprecierea prognosticului sau a alegerii unei terapii adecvate.

4. Detectarea modificãrilor acestor aminoacizi poate constitui baza de aplicare a unor terapii neuroprotectoare care sã vizeze atenuarea efectelor excitotoxicitãþii aminoacizilor excitatori.

Bibliografie

1.LUTZ, F., ALBRECHT, D., PETER, R., Neurochemical Research, **18**, no. 12, 1993, p.1239

2.KORY-CALOMFIRESCU, S., Factori de risc în accidentele vasculare cerebrale, 1993, Ed. Muºatinii, Suceava

3.BORSTEIN, N., Neuroprotection in acute ischemic stroke, vol of The Fourth Annual Meeting of The Global College of Neuroprotection & Neuroregeneration, 15 ,2007

4. BUCHAN, A., SHARMA, M., Current Opinion in Neurol. and Neurosurg., 1991, 4, 38

5. MĂRGINEAN, L., PLEªCA, L., BLIDARU, M., FĂGĂRĂªAN, E., "Zilele UMF Iuliu Haþieganu", 1995, Litografia UMF Cluj, vol. Rezumate, p. 57

6. HOBAI, S., Biochimie, 1996, Litografia UMF Tg. Mureº

7. MUREªANU, D. F., Neuroprotection and Neuroplasticity – Two complementary sides of the same process, vol of The Fourth Annual Meeting of The Global College of Neuroprotection & Neuroregeneration, 15 ,2007

Intrat în redacþie: 4.05.2007