

УДК (612.35:577.31) – 092.9

**ОСТРЫЕ ЭФФЕКТЫ ВАЛЬПРОАТА НАТРИЯ НА СПЕКТР СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЕЧЕНИ И ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС, НАХОДИВШИХСЯ НА ИСКУССТВЕННОМ ЦИКЛЕ ДЕНЬ/НОЧЬ**

М.М. Золотухин, В.Ю. Смирнов, Е.М. Дорошенко

ЦНИЛ

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Исследованы острые эффекты вальпроата натрия (Na-VPA) в дозе 400 мг/кг на спектр свободных аминокислот и их производных в печени и плазме крови крыс в темновую фазу. Введение Na-VPA приводило к снижению содержания Pro, Ctr, Lys, Orn, Ala в плазме крови и увеличению уровней  $\alpha$ -аминомасляной кислоты ( $\alpha$ ABA) и  $\text{NH}_3$ . В печени снижались уровни фосфоэтанолamina, этаноламина, Pro, Ile, leu, Orn, Lys и увеличивалось содержание Phe и Tyr. Это свидетельствует, что Na-VPA, вводимый в темновую фазу, вызывает через 1,5 ч угнетение цикла мочевинообразования, влияет на транспорт Leu, Ile, Phe, Tyr в гепатоциты и вызывает усиление катаболизма кетогенных и гликогенных аминокислот.*

**Ключевые слова:** вальпроат натрия, крыса, печень, плазма крови, аминокислоты, циркадианный ритм.

*The effects of acute sodium valproate (Na-VPA) administration in a dose of 400 mg/kg on the levels of free amino acids in the liver and blood plasma were studied in rats in the dark phase. The Na-VPA treatment led to a decrease in the concentrations of Pro, Ctr, Lys, Orn, and Ala in the blood plasma and increase in the levels of  $\alpha$ ABA and  $\text{NH}_3$ . In the liver the levels of PEA, EA, Pro, Ile, leu, Orn, Lys decreased while those of Phe and Tyr were increased. It is suggested that Na-VPA administration in dark phase can lead to depression of urea cycle as well as affects the transport of Leu, Ile, Phe, Tyr to liver and speeds up the catabolism of ketogenic and glycogenic amino acids (1.5 h following the administration).*

**Key words:** sodium valproate, rat, liver, blood plasma, amino acids, circadian rhythm.

Вальпроат (VPA, 2-пропилпентановая кислота) широко используется как антиконвульсант, но проведенные клинические и экспериментальные исследования выявили ряд его эффектов в отношении метаболизма углеводов, липидов и аминокислот в печени. Так, при введении вальпроовой кислоты или ее натриевой соли отмечали ингибирование  $\beta$ -окисления и синтеза жирных кислот, глюконеогенеза, цикла мочевинообразования и окислительного фосфорилирования [5]. При введении крысам вальпроовой кислоты или вальпроил-СоА наблюдалось значительное ингибирование глицин-расщепляющей системы и повышение уровня глицина в сыворотке крови, печени и моче, причем эффект был дозозависимым [5, 6, 9]. Введение вальпроата в дозе 200 мг/кг в течение 8 дней приводило к снижению уровней Ser, Gln и Ala в плазме крови и Gln, Cys, Phe и His и увеличению содержания Tau, Thr, Gly,  $\alpha$ ABA, Ile и Tyr в печени [4]. Отмечено, что использование вальпроата в больших дозах (80 мг/100 г массы тела) приводит к снижению синтеза белка в печени, индуцированного триптофаном [10]. Были отмечены также изменения конформации белков внутренней мембраны митохондрий, гипераммониемия и увеличение оттока желчи. Механизмы эффектов длительного введения вальпроата или его метаболитов мало изучены [5].

Очень мало работ посвящено влиянию вальпроата на обмен аминокислот при однократном его введении. Так, перфузия через яремную вену VPA в дозе 4 мг/кг/мин в течение 50 мин приводила к увеличению уровней пирувата и аланина в ткани печени крыс, при этом содержание лактата не изменялось. Уровни Gln, Glu, Asp, малата и цитрата были очень высокими [12].

При использовании дозы 400 мг/кг максимальное влияние VPA на обмен метионина наблюдалось спустя 1 ч после введения. В печени отмечалось повышение уровней S-аденозилгомоцистеина (SAH), окисленного

глутатиона, снижение активности метионин-S-аденозилтрансферазы на 56% и снижение соотношения SAM/SAH. Все эти изменения приходили в норму в течение 24 ч с параллельным снижением концентрации VPA в сыворотке крови [14].

После введения терапевтической дозы VPA новорожденным мышам в плазме крови снижались уровни  $\beta$ -гидроксипутирата и глюкозы, в печени снижался поток субстратов через CoA-зависимые ферменты ЦТК, повышался уровень Ala в 2 раза и снижались уровни Asp, Glu и Gln [3].

Другой эффект, проявляющийся в начальных сроках после введения вальпроата – модуляция активности натриевых каналов [11]. Возможно, таким образом осуществляется его влияние на транспорт некоторых аминокислот.

Известно, что транспорт ряда аминокислот в различные органы подчиняется циркадианным изменениям, в ходе которых происходит активация метаболических цепочек, где происходит синтез интермедиатов, обладающих рядом физиологических эффектов. Биосинтез этих метаболитов зависит от доступности предшественников, которыми являются некоторые аминокислоты [8]. Из приведенных выше работ видно, что вальпроат способен изменять конформации некоторых белков мембран, возможно, эти изменения могут затрагивать транспортные системы аминокислот, изменяя их транспортную емкость, вызывая тем самым дисбаланс в обмене аминокислот. Однако эффекты вальпроата в отношении показателей обмена аминокислот в тканях не исследовались в зависимости от фазы циркадианных ритмов, в частности, при его введении в темновую фазу. Такой подход может быть использован для метаболической коррекции дисбаланса в обмене аминокислот, вызванного некоторыми патологическими процессами (изменения в серотонинергичес-

кой системе головного мозга, расстройство цикла сон-бодрствование, печеночная энцефалопатия и др.).

Целью данной работы было оценить влияние вальпроата натрия на пул свободных аминокислот плазмы крови и печени у крыс с синхронизированным циклом сон-бодрствование после его введения в темновую фазу.

#### Материалы и методы

В эксперименте использовалось 12 (по 6 в каждой группе) половозрелых белых беспородных крыс-самцов массой 160-200 г, содержащихся при искусственном световом режиме (12 ч/12 ч) 14 дней на стандартном рационе вивария. Вальпроат натрия вводили однократно внутривенно в дозе 400 мг/кг (доза, при которой вальпроат натрия реализует разнообразные эффекты в тканях [7, 8, 11, 13, 14]. Контрольные животные получали воду в эквивалентных количествах. Введение препарата осуществлялось с началом темновой фазы с последующей декапитацией спустя 1,5 ч.

После забоя животных печень быстро извлекали и замораживали в жидком азоте. Кровь отбирали в гепаринизированные пробирки и получали плазму центрифугированием на холоду (2°C) при 2000g 15 мин.

Содержание свободных аминокислот и их производных определяли в хлорнокислых экстрактах плазмы крови и ткани печени методом ионообменной хроматографии в собственной модификации [1] на автоматическом анализаторе аминокислот Т-339М (Чехия). Регистрация и обработка хроматограмм осуществлялась с помощью программно-аппаратного комплекса «МультиХром-1» (Россия).

В работе использовались реактивы квалификации не ниже хч. Реагенты для аминокислотного анализа готовились из коммерческих комплектов для определения свободных аминокислот («Lachema», Чехия) на деионизованной воде, которая перед использованием была подвергнута тройной дистилляции.

Статистическая обработка данных (сравнение средних по *t*-критерию Стьюдента, корреляционный анализ) реализована программой 3d из пакета BMDP (BMDP Statistical Software).

#### Результаты

Введение вальпроата натрия в начале темновой фазы приводило к снижению уровней пролина, аланина, цитруллин, орнитина в плазме крови, а также пролина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, тирозина, этаноламина, фосфотаноламина, цистеата в печени крыс. Вальпроат повышал содержание аммиака,  $\alpha$ -АВА в плазме крови (табл. 1–2).

Характер этих изменений можно интерпретировать в определенном приближении при помощи корреляционного анализа. Так, снижение уровней Orn, Ctr и повышение содержания аммиака в плазме может указывать на угнетение цикла мочевинообразования. Появление положительной корреляции между Glu и Gln ( $r = 0,95$ ) в печени свидетельствует об активации глутаминсинтетазной реакции, в которой происходит связывание части аммиака. Концентрация Ala в плазме крови снижалась, при этом достоверных изменений содержания аланина в печени не наблюдалось. Характер этих изменений может свидетельствовать об активации глюкозо-аланинового

цикла и гликолиза в периферических тканях, в результате чего происходит дополнительная наработка пирувата, утилизируемого в ЦТК [2]. Появление положительной корреляции между уровнями аспартата и глицина ( $r = 0,97$ ) в печени может говорить об активации деградации углеродного скелета последнего в ЦТК, при этом уровень глицина в печеночной ткани не изменялся, возможно, за счет поступления углеводородного скелета, образующегося при деградации РЕА [11]. Об этом свидетельствует снижение уровней EA, РЕА и появление положительных связей между уровнями РЕА Gln ( $r = 0,92$ ), а также EA ( $r = 0,93$ ) в печени.

Таблица 1 – Содержание свободных аминокислот и родственных соединений в плазме крови, мкмоль/л

	Контроль	Вальпроат, 400 мг/кг
Tau	302,5 ± 56,2	275,5 ± 23,7
Asp	28,42 ± 4,71	27,38 ± 1,69
HPro	34,97 ± 4,37	30,48 ± 3,46
Thr	166,2 ± 33,2	197,9 ± 15,0
Ser	323,5 ± 48,7	269,9 ± 10,0
Glu	98,4 ± 12,9	138,0 ± 15,8
Gln	1751 ± 242	1969 ± 137
Pro	170,3 ± 13,9	65,72 ± 9,55*
Gly	340,6 ± 34,4	345,8 ± 33,6
Ala	537,6 ± 58,2	354,1 ± 41,9*
Ctr	107,12 ± 6,67	83,26 ± 7,18*
$\alpha$ ABA	27,41 ± 1,10	33,35 ± 1,96*
Val	101,66 ± 9,37	103,7 ± 15,5
Cys	13,05 ± 3,38	17,12 ± 1,49
Met	31,45 ± 2,54	34,79 ± 2,65
Ile	58,65 ± 3,56	55,71 ± 6,61
Leu	94,20 ± 5,22	83,10 ± 9,19
Tyr	46,80 ± 3,73	38,95 ± 5,36
Phe	45,12 ± 2,57	49,98 ± 2,94
EA	22,22 ± 2,03	23,17 ± 3,71
NH <sub>3</sub>	458,92 ± 9,01	531,0 ± 29,5*
Orn	36,15 ± 2,00	27,27 ± 1,95*
Lys	303,4 ± 28,9	272,3 ± 14,8
His	48,48 ± 2,71	46,56 ± 3,13
Trp	83,8 ± 4,19	66,7 ± 7,0

Таблица 2 – Содержание свободных аминокислот и родственных соединений в печени, нмоль/г

	Контроль	Вальпроат, 400 мг/кг
CA	457,9 ± 26,7	307,0 ± 36,7*
Tau	1894 ± 472	1047 ± 171
PEA	1640 ± 159	533,8 ± 37,0*
urea	835 ± 286	651 ± 170
Asp	6169 ± 563	5117 ± 410
Thr	718 ± 130	486 ± 113
Ser	1269 ± 114	946,0 ± 99,0
Glu	2966 ± 343	2902 ± 283
Gln	3892 ± 356	4353 ± 666
Pro	269,0 ± 57,4	119,0 ± 16,0*
Gly	2928 ± 217	2740,5 ± 51,0
Ala	1423 ± 398	1419 ± 312
Ctr	85,3 ± 21,6	74,9 ± 13,9
$\alpha$ Aba	46,5 ± 16,6	58,40 ± 8,33
Val	207,3 ± 33,4	136,5 ± 16,8
Met	72,4 ± 13,8	47,87 ± 6,70
Ile	138,1 ± 10,4	68,19 ± 9,83*
Leu	277,3 ± 28,1	129,0 ± 11,3*
Tyr	146,1 ± 11,5	58,11 ± 9,49*
Phe	106,4 ± 14,0	51,46 ± 6,27*
EA	1844 ± 196	1033 ± 101*
NH <sub>3</sub>	8732 ± 1073	5984 ± 927
Orn	260,9 ± 44,2	159,5 ± 13,0
Lys	466,0 ± 65,2	314,8 ± 25,6
His	456,1 ± 55,1	368,6 ± 30,5

Примечание: \* —  $p < 0,05$  по отношению к контролю

Особый интерес представляют аминокислоты, имеющие разветвленную углеводородную цепь (Leu, Ile, Val) и ароматические (Phe, Tyr). Введение вальпроата привело к появлению положительных корреляционных связей между уровнями Ile в печени, с одной стороны, и Ile ( $r = 0,96$ ), Leu ( $r = 0,99$ ), Phe ( $r = 0,97$ ), и Val ( $r = 0,98$ ) в плазме, а также Leu в печени и Leu ( $r = 0,88$ ) и Phe ( $r = 0,92$ ) в плазме. Снижение концентраций Ile, Leu, Phe и Tyr в печени (табл. 2) при неизменном уровне этих аминокислот в плазме крови, возможно, объясняется способностью вальпроата изменять транспорт этих соединений, а также усилением их катаболизма [5].

Повышение концентрации  $\alpha$ -АВА в плазме, снижение уровня цистеата и появление положительной корреляции между содержанием Ser и Thr ( $r = 0,89$ ) в печени может свидетельствовать о торможении деградации серосодержащих аминокислот [1] и, возможно, о возрастании утилизации треонина и серина до 2-кетомасляной кислоты с последующим ее переаминированием.

### Выводы

1. Введение интактным животным вальпроата натрия в дозе 400 мг/кг в начале темновой фазы вызывает спустя 1,5 ч увеличение деградации гликогенных аминокислот в печени, что может рассматриваться как компенсаторный механизм вследствие угнетения энергетического обмена при введении Na-VPA.

2. При введении VPA в темновую фазу вероятно изменение транспорта Leu, Ile, а также ароматических аминокислот (Phe, Tyr) в печень. Это может быть вызвано как изменением активности транспортных систем для этих групп аминокислот, так и конкурентными отношениями между вальпроевой (2-пропилпентановой) кислотой и этими аминокислотами за транспортную систему.

3. Введение Na-VPA в примененной дозе вызывает в печени угнетение мочевинообразования.

### Литература

1. Смирнов, В.Ю. Эффекты недостаточности таурина в формировании фонда аминокислот и их производных в центральной нервной системе и периферических тканях / В.Ю. Смирнов, Е.М. Дорошенко, Л.И. Нефедов // Вести АН Беларуси. Сер. биол. наук. – 1997. – № 2. – С. 83-92.

2. Шарманов, Т.Ш. Синтез, транспорт и утилизация аланина (аланин-глюкозный цикл) / Т.Ш. Шарманов, Э.К. Мухамеджанов / / Вопр. мед. химии. – 1981. – Т.27, №3. – С. 300-310.

3. A single therapeutic dose of valproate affects liver carbohydrate, fat, adenylate, amino acid, coenzyme A, and carnitine metabolism in infant mice: possible clinical significance / J.H. Thurston [et al.] // Life. Sci. – 1985. – Vol. 36, № 17. – P. 1643-1651.

4. Bykov, I.L. Valproate-dependent changes in the spectrum of free amino acids in rats: L-carnitine effects / I.L. Bykov // Eksp. Klin. Farmakol.– 2005.– Vol.68, № 2. – P. 36-39.

5. Cotariu, D. Valproic acid and the liver / D. Cotariu, J.L. Zaidman // Clin. Chem. – 1988. – Vol. 34, №5.– P. 890-897.

6. Effects of dipropylacetate on the glycine cleavage enzyme system and glycine levels. A possible experimental approach to non-ketotic hyperglycinemia / A. Martin-Gallardo [ et al.] // Biochem. Pharmacol. – 1985. – Vol. 34, № 16. – P. 2877-2882.

7. Kerwin, R.W. The effect of sodium- n-dipropyl acetate on gamma-aminobutyric acid-dependent inhibition in the rat cortex and substantia nigra in relation to its anticonvulsant activity / R.W. Kerwin, H.R.Olpe, M.Schmutz // Br. J. Pharmacol. – 1980. – Vol.71, № 2. – P. 545- 551.

8. Loscher, W. Cardiovascular effects of GABA, GABA-aminotransferase inhibitors and valproic acid following systemic administration in rats, cats and dogs: pharmacological approach to localize the site of action / W.Loscher // Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. – 1982. –Vol.257, № 1. – P.32 –58.

9. Mortensen, P.B. Inhibition of the glycine cleavage system: hyperglycinemia and hyperglycinuria caused by valproic acid / P.B.Mortensen, S.Kolvra, E.Christensen // Epilepsia. – 1980. – Vol. 21, № 6. – P. 563-569.

10. Sidransky, H. Toxic effect of valproic acid on tryptophan binding to rat hepatic nuclei / H. Sidransky, E.Verney // Toxicology. – 1996. – Vol. 109, № 1. – P. 39-47.

11. The acute effect of valproate on cerebral energy metabolism in mice / C.U. Johannessen [et al.] // Epilepsy. Res. – 2001. – Vol. 47, № 3. – P. 247-256.

12. The early effects of valproic acid in low doses in liver metabolism / M. Culebras [et al.] // Rev. Esp. Fisiol. – 1989. – Vol. 45, № 4. – P. 327-330.

13. The modification of the ethanol withdrawal syndrome in rats by di-n- propylacetate / E.P. Noble [et al.] // Psychopharmacologia. – 1976.– Vol.46, № 2. – P.127- 131.

14. Ubeda, N. Acute valproate administration impairs methionine metabolism in rats / N.Ubeda, E.Alonso-Aperte, G.Varela-Moreiras / / J. Nutr. –2002. – Vol. 132, № 9. – P. 2737-2742.

Поступила 25.03.08