

УДК: 547.262.099:612.398.192

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ТАЛЕРИН НА ФОНД СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В.Ю. Смирнов, Ю.Е. Разводовский, Е.М. Дорошенко, В.М. Шейбак

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Исследовано влияние внутрижелудочного введения препарата «Талерин» на пул свободных аминокислот плазмы крови и печени крыс при хронической алкогольной интоксикации (ХАИ). Установлено, что ХАИ сопровождается снижением концентраций глицина, тирозина, лизина и α -аминобутирата в плазме крови крыс, повышением уровня аспартата в печени и понижением концентраций треонина, лизина и доли незаменимых аминокислот в суммарном пуле свободных аминокислот печени. Показано, что препарат «Талерин» повышает в печени соотношение АРУЦ/ААК, предотвращает снижение доли незаменимых аминокислот, однако вызывает выраженный аминокислотный дисбаланс в плазме крови и печени.

Ключевые слова: аминокислоты, хроническая алкогольная интоксикация, таурин, лейцин, АРУЦ, цинк, магний, рибофлавин.

We investigated the effect of intragastrical administration of preparation "Talerin" on the pool of free amino acids in the blood plasma and the liver of rats undergoing chronic ethanol intoxication (ChAI). It has been found that ChAI decreases the levels of glycine, tyrosine, lysine and α -aminobutyrate in the blood plasma, elevates the level of aspartate, and decreases concentrations of threonine, lysine and fraction of essential amino acids in the total pool of proteinogenic amino acids in liver. Administration of the preparation has been found to raise hepatic BCAA/AAA ratio, prevent lowering fraction of essential amino acids, but induce amino acid imbalance in the blood plasma and the liver.

Key words: amino acids, chronic ethanol intoxication, taurine, leucine, BCAA, zinc, magnesium, riboflavin.

Разработка гепатопротекторных средств предусматривает исследование их активности на моделях поражения печени, среди которых одной из наиболее распространенных является хроническая алкогольная интоксикация. Ранее нами были предложены композиции на основе таурина, аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ) и микроэлементов, имеющих широкий спектр биологической активности и обладающих как иммуномодулирующими, так и гепатопротекторными свойствами [1-3]. В настоящей работе нами исследовано действие композиции, основными компонентами которой являются таурин, лейцин, рибофлавин и катионы цинка и магния. Включение в композицию таурина, обладающего гепатопротективными и антиоксидантными свойствами, обусловлено тем, что, несмотря на принципиальную возможность синтеза таурина из поступающих с пищей метионина и цистеина, его внутриклеточная концентрация в значительной степени зависит от транспорта таурина из плазмы крови [4]. Цинк является необходимым элементом для жизнедеятельности организма, так как он выступает в качестве кофактора у более чем 300 ферментов. Он играет важную роль в репликации ДНК, транскрипции и синтезе белка, влияет на процессы деления и дифференцировки клеток [5]. Обедненная цинком диета замедляет рост организма [6]. Максимальная концентрация цинка в мозге, особенно в гиппокампе и коре [5, 7]. Недостаток цинка влияет на гомеостаз цинка в мозге и вызывает изменение поведения, задержку умственного развития [6]. Включение лейцина в композицию обусловлено его ролью в энергопродукции и биосинтезе белка, активизации им процессов детоксикации на фоне печеночной недостаточности и энцефалопатии. Очевидно, что действие данной композиции будет проявляться в первую очередь влиянием на аминокислотный пул плазмы крови и тканей, анализ изменений в котором способен оценить перспективность данной композиции в условиях действия гепатотоксичных веществ, включая алкоголь. Исследование такого влияния и явилось целью нашего исследования.

Материалы и методы

В эксперименте использовано 19 белых беспородных крыс-самцов массой 180-200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Раствор этанола (25%) вводили внутрижелудочно дважды в сутки равными объемами по 14 мл/кг на протяжении 28 суток (суточная доза этанола составляла 7 г/кг массы животных). Препарат «Талерин», состоящий из таурина, лейцина, рибофлавина, цинка сульфата и магния сульфата, вводили в виде водного раствора внутрижелудочно в дозе 125 мг/кг через 30 мин после каждого введения этанола на протяжении последних 10 дней алкоголизации. Контрольные животные получали воду в эквивалентных количествах. После забоя животных кровь забирали в пробирки с гепарином и получали плазму центрифугированием при 2000 g в течение 15 мин. К полученной плазме добавляли равные объемы среды для депротенинизации, содержащей 1 М хлорную кислоту и 250 мкМ норлейцина, центрифугировали 15 мин при 13000 g (+4°C) и немедленно отбирали надосадочную жидкость. Ткань печени гомогенизировалась в 0,2 М хлорной кислоте с норлейцином (250 мкМ) в качестве внутреннего стандарта в соотношении 1 : 10 по массе, полученные гомогенаты центрифугировались при 13000 g в течение 15 мин при температуре +4°C. Затем экстракты немедленно отделялись от белкового осадка. Содержание свободных аминокислот и их производных в хлорнокислых экстрактах определяли методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе Т-339М (Чехия), регистрация и обработка хроматограмм осуществлялась с помощью программно-аппаратного комплекса «МультиХром-1» (Россия). Статистическая обработка данных, включающая описательную статистику, корреляционный, дисперсионный и дискриминантный анализ, выполнена при помощи программы Statistica 7.0. В работе использовались реактивы квалификации не ниже хч.

Результаты и их обсуждение

Хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ) вызвала у крыс снижение уровней глицина, тирозина, лизина, α -аминомасляной кислоты (α -АВА) и повышение уровня этаноламина в плазме крови (табл. 1). Таким образом, через 28 суток алкоголизации не наблюдалось характерного для гепатопатии повышения уровней ароматических аминокислот (ААК) и снижения – АРУЦ [8]. Это может быть обусловлено тем, что влияние этанола на уровни АРУЦ имеет неоднозначный характер: с одной стороны, поражение печени этанолом вызывает снижение АРУЦ, с другой – длительное введение этанола способно снизить катаболизм АРУЦ, что может привести к накоплению их как в тканях, так и в плазме крови [9]. Не выявлялось также изменений в уровнях метионина и аланина, несмотря на то, что экзогенный этанол влияет на метаболизм этих соединений [8]. Очевидно, что при субхронической 28-дневной алкоголизации в организме крыс происходят адаптационные процессы, способствующие устранению метаболических нарушений, однако еще не возникает органического поражения печени.

Введение на этом фоне препарата «Талерин» вызвало в плазме крови выраженный аминокислотный дисбаланс, проявившийся в увеличении уровней таурина, цистина и лейцина, а также снижение концентраций целого ряда гликогенных аминокислот – аспартата, серина, пролина, валина, метионина, изолейцина, тирозина, фенилаланина и гистидина. Снижались также уровни аминокислот, связанных с функционированием цикла мочевины (цитруллин и орнитин), что может свидетельствовать о снижении его активности. Как следствие, происходило снижение суммарной концентрации протеиногенных аминокислот, однако соотношение заменимых и незаменимых аминокислот сохранялось неизменным (табл. 1). Следует отметить нарушение баланса уровней АРУЦ – двукратное увеличение лейцина сопровождалось таким же снижением уровней изолейцина и валина. Это может объясняться наличием в составе композиции только лейцина (но не других АРУЦ), поступление которого в организм в суточной дозе 80 мг/кг способно, из-за конкурентных взаимоотношений, снижать транспорт валина и изолейцина из тканей.

В печени крыс ХАИ вызвала снижение концентраций треонина, лизина и повышение – аспартата. При этом снизилась доля незаменимых аминокислот в суммарном пуле свободных аминокислот печени (табл. 2). Других эффектов хронической алкоголизации в отношении концентраций исследуемых показателей в печени не наблюдалось, в том числе не снижалось соотношение АРУЦ/ААК, что подтверждает отсутствие органического поражения печени. Однако анализ корреляционных связей между уровнями аминокислот в печени позволяет предположить возникновение при ХАИ ряда нарушений метаболизма аминокислот. Так, возникновение положительной корреляции между уровнями глицина и серина может говорить о снижении вероятности превращения последнего в глицин (табл. 3). Снижение уровня треонина может свидетельствовать об активации альтернативных путей его деградации, так как накапливающийся при введении этанола ацетальдегид тормозит треонинальдолазную реакцию образования глицина. Снижение уровня лизина как в печени, так и в плазме крови может быть объяснено связыванием образующегося из экзогенного этанола ацетальдегида с аминогруппами лизина [9]. Ис-

Таблица 1 – Содержание свободных аминокислот и их производных в плазме крови крыс после внутрижелудочного введения Талерина на фоне хронической алкогольной интоксикации, мкмоль/л

	Контроль (n = 6)	ХАИ (n = 7)	Талерин (n = 6)
Таурин	144 ± 15	139 ± 17,6	336 ± 34*†
Asp	26,9 ± 2,0	28,3 ± 1,9	19,9 ± 1,3*†
Оксипролин	46,7 ± 4,7	42,6 ± 9,2	18,3 ± 3,4*†
Thr	172 ± 26	120 ± 17	140 ± 20
Ser	450 ± 19	439 ± 26	382 ± 19*
Glu	103 ± 4,5	116 ± 8,8	91,6 ± 3,0†
Gln	3933 ± 227	3991 ± 246	3523 ± 145
Pro	301 ± 25	332 ± 25	131 ± 9*†
Gly	534 ± 29	468 ± 18	472 ± 14
Ala	536 ± 49	481 ± 22	469 ± 21
Сtr	84,7 ± 10,2	65,7 ± 10,6	36,5 ± 2,8*†
α -аминобутират	48,2 ± 5,4	34,9 ± 4,2	18,9 ± 2,1*†
Val	190 ± 12	164 ± 6,9	84,3 ± 6,2*†
Cys	23,7 ± 2,8	30,3 ± 4,4	38,8 ± 2,9*
Met	32,2 ± 1,3	32,0 ± 2,5	26,0 ± 1,3*
Ile	75,8 ± 2,5	67,0 ± 4,3	29,3 ± 3,5*†
Leu	104 ± 6,2	116 ± 5,6	218 ± 23*†
Tyr	58,8 ± 3,5	51,3 ± 1,8	41,7 ± 3,7*†
Phe	42,3 ± 2,0	46,7 ± 2,5	30,0 ± 2,6*†
Этаноламин	37,1 ± 2,7	49,2 ± 3,0*	43,4 ± 4,6
NH ₃	470 ± 25	481 ± 13,5	414 ± 14†
Orn	59,9 ± 3,2	56,5 ± 4,5	49,1 ± 3,2*
Lys	270 ± 33	171 ± 20*	188 ± 33
His	111 ± 3,8	94,8 ± 7,7	74,1 ± 6,0*
Сумма протеиногенных АК	7024 ± 233	6575 ± 311	6009 ± 161*
АРУЦ / ААК	3,70 ± 0,24	3,63 ± 0,10	4,89 ± 0,72
Замен. / незам.АК	6,12 ± 0,55	7,17 ± 0,39	6,58 ± 0,32
Phe / Tyr	0,726 ± 0,035	0,905 ± 0,047*	0,72 ± 0,038†

Условные обозначения: p < 0,05 при сравнении с группами: * – контроль; † – ХАИ.

Примечание: Здесь и в табл. 2 сравнение групп производилось с использованием дисперсионного анализа на основании критерия Фишера.

чезновение положительной корреляции Met–Ser может свидетельствовать в пользу снижения синтеза цистатионина в цистатионин- β -синтазной реакции и/или активации метионинсинтазной реакции (табл. 3).

Введение «Талерина» на фоне ХАИ вызвало в печени рост концентраций треонина, глицина, лейцина, β -аланина и этаноламина (как по отношению к контролю, так и к ХАИ), а также рост, по отношению к контролю, уровня серина (табл. 2). Наряду с этим, происходило снижение уровней аланина, α -аминомасляной кислоты и тирозина. Отмечался рост уровня таурина, достоверный по отношению к группе крыс, получавших этанол. К положительным эффектам композиции можно отнести повышение соотношения АРУЦ и ААК, а также предотвращение снижения доли незаменимых аминокислот в печени. Снижение концентрации фенилаланина и соотношения Phe/Tyr в печени, а также исчезновение между ними положительной корреляции (табл. 2-3) может свидетельствовать об активации фенилаланингидроксилазной реакции и дальнейшей деградации тирозина. Таким образом, повышение соотношения АРУЦ/ААК в печени происходит также вследствие усиления катаболизма ароматических аминокислот. Как и в плазме крови, в печени нарушался баланс АРУЦ, о чем свидетельствует исчезновение положительных коррелятивных связей между их уровнями (табл. 3), снижение уровня изолейцина и рост – лейцина.

Дискриминантный анализ уровней свободных аминокислот в данной модели показал, что наиболее значимыми показателями в плазме крови являются лейцин и

Таблица 2 – Содержание свободных аминокислот и их производных в печени крыс после внутрижелудочного введения на фоне хронической алкогольной, нмоль/г

	Контроль (n = 6)	ХАИ (n = 7)	Талерин (n = 5)
Таурин	1583 ± 325	1191 ± 121	2298 ± 301†
Фосфоэтанолламин	1920 ± 421	1247 ± 165	1284 ± 137
Мочевина	1577 ± 161	1350 ± 159	2122 ± 440†
Asp	3292 ± 119	4062 ± 293*	2870 ± 171†
Thr	413 ± 66,6	238 ± 19*	707 ± 134*†
Ser	2269 ± 158	2459 ± 180	3327 ± 525*
Glu	4223 ± 264	4884 ± 293	5232 ± 923
Gln	5309 ± 378	5090 ± 244	5197 ± 643
Pro	166 ± 23	157 ± 30	252 ± 59
Gly	2390 ± 116	2284 ± 133	3035 ± 248*†
Ala	1666 ± 149	1533 ± 114	1187 ± 97*
Сtr	61,6 ± 10,2	52,2 ± 3,3	60,2 ± 26,2
α-аминобутират	119 ± 13	100 ± 5,8	79,0 ± 11,1*
Val	229 ± 18	210 ± 15	230 ± 10
Met	45,3 ± 11,4	49,6 ± 6,4	38,8 ± 5,5
Ile	141 ± 8,4	118 ± 6,5	103 ± 13*
Leu	252 ± 24	226 ± 17	335 ± 35*†
Tyr	139 ± 17	108 ± 12	99,3 ± 9,1
Phe	119 ± 12	99,5 ± 9,0	73,8 ± 7,3*
β-аланин	169 ± 17	140 ± 8,7	249 ± 20*†
Этанолламин	642 ± 40	859 ± 85	1162 ± 115*†
NH ₃	5467 ± 686	5973 ± 1473	5650 ± 500
Orn	358 ± 21	314 ± 31	321 ± 21
Lys	354 ± 46	191 ± 34*	236 ± 81
His	626 ± 24	612 ± 36	579 ± 84
Сумма протеиногенных АК	21634 ± 560	22321 ± 942	23502 ± 2498
АРУЦ / ААК	2,46 ± 0,12	2,71 ± 0,09	3,88 ± 0,12*†
Замен. / незам. АК	10,6 ± 1,2	14,7 ± 1,2*	10,5 ± 1,1†
Phe / Tyr	0,863 ± 0,039	0,939 ± 0,056	0,759 ± 0,079†

Условные обозначения: p<0,05 при сравнении с группами: * – контроль; † – ХАИ

Таблица 3 – Коэффициенты корреляции между уровнями свободных аминокислот в печени крыс

	Контроль	ХАИ	Талерин
Phe–Tyr	0,952*	0,879*	0,511
Gly–Ser	-0,0449	0,783*	0,845
Met–Ser	-0,830*	-0,668	0,0231
Ile–Val	0,9344*	0,9442*	0,571
Leu–Val	0,889*	0,8956*	0,3171
Leu–Ile	0,9733*	0,9559*	0,3103

* – достоверные корреляции (p<0,05)

валин (F = 28,9 и 113,6), и в печени – лейцин, метионин и серин (F = 26,5; 6,24 и 6,76, соответственно). Это еще раз подтверждает, что наибольший вклад в развитие аминокислотного дисбаланса в печени и плазме крови вносит лейцин в составе композиции, в печени, кроме того, скачивается опосредованное влияние таурина (через уровни метаболически связанных с ним аминокислот).

Таким образом, введение на фоне субхронической алкогольной интоксикации композиции, состоящей из лейцина, таурина, рибофлавина и сульфатов цинка и магния, повышает в печени крыс соотношение АРУЦ и ААК, предотвращает снижение доли незаменимых аминокислот и вызывает выраженный аминокислотный дисбаланс в плазме крови и печени, который, предположительно, связан с отсутствием в композиции изолейцина и валина.

Литература

1. Композиция для коррекции нарушений метаболической функции печени: пат. Респ. Беларусь, от 2008.05.16 № 2005.0673; заявл. 05.07.2005. / В.М. Шейбак, М.В. Горещкая, В.Ю. Смирнов, Р.Е. Лис
2. Композиция, обладающая иммуномодулирующей активностью: пат. Респ. Беларусь, от 2008.08.15 №20061309; заявл. 21.12.2006. / В.М. Шейбак, М.В. Горещкая, А.И. Жмакин
3. Влияние композиции аминокислот с разветвленной углеводородной цепью, триптофана и таурина на обмен аминокислот в экспериментальных моделях алкоголизма / Смирнов В. Ю. [и др.] – Укр. биохим. журнал, 2003. – т. 75, № 4. – С. 101-107.
4. Expression of taurine transporter is regulated through the TonE (tonicity-responsive element)/TonEBP (TonE-binding protein) pathway and contributes to cytoprotection in HepG2 cells / Ito T. [et al.] – Biochem. J., 2004. – Vol. 382. – P. 177-182.
5. Frederickson C. J. Neurobiology of zinc and zinc containing neurons / C. J. Frederickson – Int. Rev. Neurobiol., 1989. – Vol. 31. – P. 145-238.
6. Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain / A. Takeda – Brain Res. Bull., 2000. – Vol. 34. – P. 137-148.
7. Vallee B.L. The biochemical basis of zinc physiology // B. L. Vallee, K. H. Falchuk – Physiol. Rev., 1993. – Vol. 73. – P. 79-118.
8. Островский Ю.М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю. М. Островский, С. Ю. Островский. – Мн.: Наука и техника, 1995. – 280 с.
9. Bernal C.A. Leucine metabolism during chronic ethanol consumption / C. A. Bernal, J. A. Vazquez, S. Adibi – Metabolism, 1993. – Vol. 42, N. 9. – P. 1084-1086.

Поступила 19.11.08