

УДК: 547.262.099:612.398.192:612.17

## ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ВВЕДЕНИЯ АРУЦ, ТАУРИНА И L-ТРИПТОФАНА НА ФОНД СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В.Ю. Смирнов, Ю.Е. Разводовский, Е.М. Дорошенко,  
М.М. Золотухин, А.В. Наумов

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Исследовано влияние композиции АРУЦ, таурина и триптофана на пул свободных аминокислот плазмы крови крыс при хронической алкогольной интоксикации. Установлено, что алкогольная интоксикация (3 мес.) вызывает снижение в плазме крови крыс уровней глицина, метионина, гистидина и 3-метилгистидина и повышение уровня тирозина. Введение в последние 7 сут алкогольной интоксикации исследуемой композиции способно предотвращать развитие алкоголь-индуцированного аминокислотного дисбаланса и нормализует сниженное соотношение АРУЦ/ААК в плазме крови, а также активирует процессы биосинтеза белка.*

**Ключевые слова:** аминокислоты, алкогольная интоксикация, плазма крови, таурин, триптофан, АРУЦ.

*The influence of branched-chain amino acids (BCAA), taurine and tryptophan composition on the free amino acids pool of blood plasma in rats in chronic ethanol intoxication has been investigated. Three-months' ethanol intoxication has been found to decrease blood plasma glycine, methionine, histidine and 3-methylhistidine and to increase the level of tyrosine in blood plasma of rats. The induction of ethanol intoxication by the composition under discussion within the last 7 days of chronic intoxication has been found to prevent the development of alcohol-induced amino acid misbalance and to normalize the decreased BCAA/AAA (aromatic amino acids) ratio in blood plasma and to activate protein biosynthesis as well.*

**Key words:** amino acids, ethanol intoxication, blood plasma, taurine, tryptophan, BCAA.

Хроническая алкогольная интоксикация может сопровождаться нарушением обмена белков и аминокислот [1, 2, 3]. Наиболее часто встречающимися изменениями в пуле свободных аминокислот плазмы крови у больных алкоголизмом является снижение содержания аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АРУЦ) [4, 5, 6].

В настоящее время не вызывает сомнений, что ряд аминокислот при их дополнительном (экзогенном) введении, помимо участия в биосинтезе белка, обладают уникальными физиологическими и метаболическими эффектами. Так, терапевтическое действие АРУЦ связано не только с их незаменимостью для организма человека, но и органоспецифичностью их метаболических превращений. Введение АРУЦ на фоне алкоголизации способно предотвращать ряд негативных эффектов этанола [7], а при циррозе печени нормализует метаболизм глюкозы [8]. Для таурина, обладающего гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами, показана способность к нормализации фонда свободных аминокислот при поражениях печени [1]. Триптофан оказывает снотворное, антиалкогольное и антинаркотическое действие, снижает острую токсичность этанола [4, 5]. Поскольку при хронической алкогольной интоксикации угнетается активность центральной серотонинергической системы [9], целесообразным представляется исследовать эффекты триптофана при его совместном введении с АРУЦ и таурином в составе комплексной аминокислотной композиции, обладающей антиалкогольными и гепатопротекторными свойствами.

Цель исследования – анализ влияния АРУЦ, таурина и триптофана при их совместном введении на аминокислотный пул плазмы крови при хронической алкогольной интоксикации.

### Материалы и методы

В работе использовались 18 белых беспородных крыс-самцов массой 150–200 г, которые содержались на стандартном рационе вивария (2 нед.). Хроническую алкогольную интоксикацию моделировали в течение 14 недель, используя 20% раствор этанола в качестве единственного источника питья [9]. Средняя доза этанола за весь период алкоголизации составила 8 г/кг (по данным регистрации потребления). Крысам опытной группы в течение последних 7 дней перед забоем внутривенно вводили раствор композиции АРУЦ, таурина и L-триптофана (600 мг/кг) в 11:00 ч. Интактному контролю и кон-

тролю, получавшему этанол, вводили эквивалентные количества изотонического раствора хлорида натрия. Декапитацию проводили после 12 ч после последнего введения аминокислот. Кровь собирали в пластиковые пробирки, содержащие 10% раствор Na<sub>2</sub>EDTA, и центрифугировали 15 мин при 3000 g. К полученной плазме добавляли равные объемы среды для депротенинизации, содержащей 1 М хлорную кислоту, 25 мг/л ЭДТА и 250 мкмоль/л DAVA (дельта-аминовалериановой кислоты). Центрифугировали 15 мин при 13000 g (+4°C). Супернатанты хранили при –78°C. После размораживания экстракты повторно центрифугировали. Количественная и качественная идентификация свободных аминокислот и их дериватов проводилась обращенно-фазной хроматографией с предколоночной дериватизацией 0,4% о-фталевым альдегидом и 0,3% 3-меркаптопропионовой кислотой в 0,4М Na-боратном буфере, pH 9,4. Для дериватизации вторичных аминокислот (пролина и оксипролина) проба далее смешивалась с раствором FMOС-хлорида в ацетонитриле (6 мг/мл). Детектирование по флуоресценции (231/445 нм, начиная с времени выхода пиков пролина и оксипролина и до конца хроматограммы –260/313 нм). Идентификация и количественная оценка полученных значений производилась программой Agilent ChemStation A10.01 путем сравнения результатов анализа исследуемых биологических объектов со стандартной калибровочной кривой искусственной смеси аминокислот. Последняя содержала равные количества определяемых соединений по 2500 нмоль/мл каждого и обрабатывалась так же, как соответствующие пробы (плазмы или ткани). Использовался концентрат стандартной смеси физиологических аминокислот фирмы «Calbiochem» (США). Использовалась колонка Zorbax XDB C<sub>8</sub>, 3,5 мкм, 3x150 мм. Подвижная фаза А: 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 6,85, содержащий 20 мг/л ЭДТА; подвижная фаза В: ацетонитрил/вода 6/4 (об./об.). Разделение проводили с градиентным элюированием от 5 до 100 % В за 78 мин; температура колонки 37°C. Для определений использовали хроматограф Agilent 1100.

В работе использовались реактивы квалификации не ниже хч. Тридистиллированную воду для подвижных фаз пропускали через патрон «Norganic» (Millipore, США), подвижные фазы фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 7.

## Результаты и их обсуждение

Хроническая алкогольная интоксикация приводит к снижению концентрации в плазме крови глицина, метионина, гистидина и 3-метилгистидина, а также повышению уровня тирозина (табл.). Одновременно наблюдалось снижение соотношения уровней ароматических аминокислот (ААК) и АРУЦ. Последнее, в свою очередь, может индуцировать нарушения транспорта АРУЦ в мозг, где роль АРУЦ включает в том числе поддержание уровня аминокислоты-тормозного трансммиттера глицина на относительно постоянном уровне. Кроме того, снижение соотношения АРУЦ/ААК может вызвать снижение клиренса ароматических аминокислот из ЦНС. Понижение концентрации гистидина и его метаболита (3-метилгистидина) может свидетельствовать о снижении доступности гистидина для мышечной ткани.

Внутрижелудочное введение раствора таурина, L-триптофана и АРУЦ в дозе 600 мг/кг субстанций на кг массы животных за 12 ч до декапитации нормализует уровни глицина, метионина, гистидина и 3-метилгистидина в плазме крови, устраняя таким образом большую часть эффектов хронической алкогольной интоксикации. Кроме этого, наблюдалась тенденция к нормализации соотношений АРУЦ/ААК и тирозин/фенилаланин (табл.). Другим эффектом введения исследуемой композиции явилось повышение уровней таурина, изолейцина, лейцина и триптофана в плазме крови. Очевидно, это может являться следствием их экзогенного поступления и сохранения повышенного уровня через 12 ч после введения. Наряду с этим, происходило повышение уровней цитруллина, аланина и фенилаланина, а также снижение концентраций глутамин и лизина. Эти изменения могут частично объясняться ускорением оборота глюкозо-аланинового цикла и активацией цикла мочевины.

Из полученных результатов следует, что как хроническая алкогольная интоксикация, так и введение на ее фоне композиции АРУЦ, таурина и триптофана не изменяет как суммарного содержания протеиногенных аминокислот в плазме крови, так и соотношения заменимых и незаменимых аминокислот. Этот факт свидетельствует, с одной стороны, о незначительности влияния хронической алкогольной интоксикации (в данных условиях эксперимента) на синтез и распад белка в периферических тканях, с другой стороны, можно предположить активацию глюконеогенеза и биосинтеза белка при введении исследуемой аминокислотной композиции, так как увеличение концентраций АРУЦ за счет их экзогенного поступления при постоянстве соотношения уровней заменимых и незаменимых аминокислот предполагает снижение доли эндогенных незаменимых аминокислот в плазме крови вследствие усиления их утилизации в периферических тканях.

Согласно результатам пошагового дискриминантного анализа, в эксперименте достигнута 100% корректная классификация наблюдений, а наиболее значимыми показателями, вносящими максимальный вклад в дискриминацию между группами, являлись тирозин, аспарагин, цистатионин, цитруллин, метонин и серин.

Таким образом, результаты эксперимента свидетельствуют о том, что курсовое введение композиции таурина, триптофана и АРУЦ на фоне алкоголизации может предотвращать ряд метаболических последствий хронической алкогольной интоксикации, включающих влияние ее на превращения и транспорт аминокислот, а также активировать биосинтез белка.

## Литература

1. Rao, G. A. Effects of chronic alcohol ingestion: role of nutritional factors / G. A. Rao, E. C. Lankin, R. F. Derr // *Biochem. Arch.*, 1989. – N. 3. – P. 289-296.
2. Takada A. Alcoholic liver disease: Its classification and pathogenesis. Biomedical and social aspects / A. Takada // *Alcohol*

Таблица – Содержание свободных аминокислот и их производных в плазме крови крыс (мкмоль/л)

	Контроль	Хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ)	ХАИ + композиция таурина, триптофана и АРУЦ
Аспарат	54,36 ± 6,026	55,1 ± 7,22	52,0 ± 5,37
Глутамат	499,3 ± 53,1	627,9 ± 27,3	583,7 ± 29,7
Аспарагин	60,5 ± 2,54	55,5 ± 3,40	58,2 ± 3,5
Серин	300,5 ± 18,2	296,8 ± 10,4	354,4 ± 32,6
α-Аминоадипинат	1,12 ± 0,15	1,15 ± 0,122	1,00 ± 0,149
Глутамин	565,3 ± 89,3	364,8 ± 81,1	267,1 ± 41,2*
Гистидин	35,2 ± 2,72	28,1 ± 1,27*	33,2 ± 3,09
Глицин	206,8 ± 16,9	155,8 ± 12,9*	183,0 ± 23,6
3-Метилгистидин	8,97 ± 1,01	5,89 ± 0,48*	8,25 ± 0,798†
Фосфозаноламин	8,23 ± 0,44	6,89 ± 1,20	8,98 ± 1,30
Треонин	225,6 ± 8,26	264,6 ± 24,9	242,2 ± 19,5
1-Метилгистидин	1,73 ± 0,23	1,45 ± 0,17	1,39 ± 0,175
Цитруллин	53,4 ± 1,6	53,0 ± 2,45	64,9 ± 3,13*†
Аргинин	91,3 ± 7,4	83,6 ± 5,18	98,8 ± 8,56
β-Аланин	5,61 ± 0,70	4,16 ± 0,70	3,81 ± 0,615
Аланин	502,9 ± 28,3	496,1 ± 25,9	638,1 ± 41,1*†
Таурин	114,6 ± 8,87	99,6 ± 17,7	156,9 ± 13,7*†
ГАМК	0,837 ± 0,104	0,616 ± 0,028	0,747 ± 0,116
Тирозин	60,0 ± 3,08	91,6 ± 8,37*	81,0 ± 3,41*
α-Аминобутират	19,5 ± 7,59	11,3 ± 2,02	12,9 ± 3,62
Этанолламин	9,20 ± 0,96	7,40 ± 0,49	9,02 ± 1,27
Валин	148,9 ± 9,02	153,5 ± 7,08	174,9 ± 13,6
Метионин	32,9 ± 1,78	27,9 ± 0,99*	36,7 ± 2,47†
Цистатионин	7,80 ± 0,62	6,24 ± 0,83	5,97 ± 0,515*
Цистин	14,2 ± 1,24	11,0 ± 1,21	14,5 ± 1,11
Триптофан	35,1 ± 1,55	32,2 ± 1,26	48,5 ± 2,17*†
Фенилаланин	70,5 ± 3,09	77,2 ± 2,9	92,2 ± 5,48*†
Изолейцин	64,2 ± 1,74	65,8 ± 1,85	75,6 ± 3,34*†
Лейцин	99,9 ± 4,83	94,6 ± 6,45	126,0 ± 13,3†
Оксипролин	103,0 ± 19,8	103,9 ± 15,0	87,5 ± 19,8
Пролин	879,4 ± 176,2	933,8 ± 148,7	1043,4 ± 262,9
Орнитин	61,9 ± 3,75	57,9 ± 4,94	60,7 ± 5,0
Лизин	319,8 ± 29,6	260,5 ± 27,9	187,9 ± 30,1*
АРУЦ/ААК	2,40 ± 0,03	1,88 ± 0,10*	2,17 ± 0,09*†
Тирозин/фенилаланин	1,19 ± 0,06	0,898 ± 0,082*	1,14 ± 0,06†
Сумма протеиногенных АК	4267 ± 212	4176 ± 237	4391 ± 360
Заменимые / незаменимые АК	3,07 ± 0,18	3,11 ± 0,18	3,32 ± 0,38

\* — p &lt; 0,05 по отношению к контролю; † — p &lt; 0,05 по отношению к ХАИ

and alcoholism: Proc. 4th Congr. ISBRA, Kyoto, Amsterdam etc. – 1988. – P. 9-16.

3. Островский, Ю. М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю. М. Островский, С. Ю. Островский. – Мн.: Наука и техника, 1995. – 280 с.

4. 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.

5. Dominicus, D. A. Effect of alcohol on blood levels of branched-chain ketoacids in male wistar rats / D. A. Dominicus, H. Todoriki, M. Ariizumi // *Alcohol and Alcoholism*, 1991. – Vol. 26, N. 5/6. – P. 597-603.

6. Liber, C.S. Alcohol and the liver: metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury / C. S. Liber // *Acta Medica Scandinavica symposium Series No.1 Stockholm: almqvist and Wilksell International*, 1985. – P. 11-56.

7. Farbiszewski, R. Branched-chain amino acid enriched diet given simultaneously with ethanol partially prevents morphological and biochemical changes in the liver / R. Farbiszewski, L. Chyczewski, A. Holownia, D. Pawlowska, M. Chwiecko // *Patol. Pol.*, 1990. – Vol. 41, No. 4 – P. 183-186.

8. Nishitani, Sh. Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis / Sh. Nishitani, K. Takehana, Sh. Fujitani, I. Sonaka // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2005. – Vol. 288. – P. 1292-1300.

9. Разводовский, Ю.Е. Влияние L-триптофана на фонд центральных нейроактивных соединений при синдроме отмены этанола / Ю. Е. Разводовский, Е. М. Дорошенко // *Нейрохимия*, 2004. – Т. 21, № 1. – С. 44-51.

Поступила 03.09.08