

УДК 577.122: 616.89

## СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПРЕРЫВИСТОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

О.В. Артемова<sup>1</sup>; В.В. Лелевич<sup>2</sup>, профессор, д.м.н.

<sup>1</sup> ГУ НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»

<sup>2</sup> УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Выявлено, что введение алкоголя в прерывистом режиме вызывало аминокислотный дисбаланс в печени крыс, выражавшийся в постепенном накоплении аминокислот, увеличении соотношения ЗА/НА, уменьшении индекса АРУЦ/ААК и колебаниях уровней гликогенных и кетогенных аминокислот. Предполагается, что многократное повторение циклов алкоголизация-отмена в данном эксперименте приводило к определённым адаптивным изменениям, направленным на устранение аминокислотного дисбаланса на фоне накопления свободных аминокислот в ткани печени, источником которых, по всей видимости, является плазма крови.*

**Ключевые слова:** свободные аминокислоты, прерывистая алкоголизация, этанол

*It was found, that alcohol input in interrupted routine caused a misbalance of amino acid pool in rat liver expressed by progressive accumulation of amino acids, essential/nonessential amino acid ratio increase, branched-chain amino acid/aromatic amino acid ratio decreasing and glycogenic/ketogenic amino acid ratio fluctuations. It is supposed that multiple repetition of alcohol-withdrawal cycle in present data leads to certain adaptive changes, aimed at the elimination of amino acid disturbance in liver tissue in free amino acids accumulation, blood plasma being their source.*

**Key words:** free amino acids, interrupted alcoholization, ethanol.

### Введение

Употребление алкоголя приводит к многочисленным метаболическим сдвигам в организме, включающим как собственно эффекты этанола на обмен веществ, так и адаптационные перестройки, происходящие в результате длительной алкоголизации. В том числе алкогольная интоксикация сопровождается дисбалансом пула свободных аминокислот – как плазменного, так и висцерального [8]. Известна центральная роль печени в формировании и стабилизации аминокислотного фонда в организме, в связи с чем нарушения аминокислотного обмена в печени влекут за собой достаточно серьёзные последствия [8].

В литературных источниках имеются данные о воздействии острой и хронической алкоголизации на аминокислотный фонд печени, а так же в состоянии абстиненции. Показано, что острая алкогольная интоксикация вызывает увеличение поступления свободных аминокислот в ткани, приводя к обеднению аминокислотного фонда плазмы крови. В тканях отмечается уменьшение соотношения заменимые/незаменимые аминокислоты (ЗА/НА) [9]. При длительном введении этанола было выявлено увеличение способности печени метаболизировать этанол. В результате этого многие фармакологические (токсические) эффекты алкоголя либо нивелируются, либо продолжительность их снижается [9]. Отмечено некоторое снижение степени обогащения аминокислотного фонда печени по сравнению с острой алкогольной интоксикацией, вследствие адаптационных перестроек и формирования метаболической толерантности [8, 9]. При состоянии алкогольной абстиненции в печени обнаруживают несколько повышенное содержание свободных аминокислот. В основном дисбаланс

формируется за счёт заменимых аминокислот (Ала, Асп, Гли), уровень которых значительно повышается, при фактически неизменном содержании незаменимых аминокислот [4, 8] Среди незаменимых аминокислот снижено относительное количество ароматических аминокислот (соотношение аминокислоты с разветвлённой углеродной цепью/ароматические аминокислоты (АРУЦ/ААК) повышено) [9].

Одной из реально встречающихся ситуаций среди множества форм алкоголизаций человеческой популяции является прерывистый приём алкоголя по целому ряду причин. Такую «прерывистую алкогольную интоксикацию» можно рассматривать как чередование более или менее длительных периодов алкогольной интоксикации и абстиненции. С учётом выраженных клинических и патохимических реакций алкогольной абстиненции прерывистую алкоголизацию следует рассматривать как новое клиническое состояние алкогольной болезни [6]. В связи с этим нами в эксперименте была предпринята попытка изучения пула свободных аминокислот печени крыс в условиях прерывистой алкоголизации.

### Материалы и методы

В эксперименте было использовано 60 крыс-самцов линии Wistar массой 160-180г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животные опытных групп дважды в сутки подвергались внутрижелудочному введению 25% раствора этанола в дозе 3,5 г/кг. Группа 1 получала алкоголь в течение 4 сут, эвтаназию проводили через 24 ч. после последнего введения этанола. Животные группы 2 также получали раствор этанола в течение 4 сут, однако декапитацию проводили через 3-е сут абстиненции. Животные группы 3 подвер-

гались декапитации после двукратного повторения цикла – 4 сут алкоголизации/3 сут отмены – на 14-е сут эксперимента. Животные группы 4 и 5 претерпевали 4-кратное повторение цикла, при этом животные группы 4 были декапитированы через 1 сут отмены этанола, а животные группы 5 – через 3 сут. Животным контрольной группы вводили эквивалентное количество воды.

Определение уровня свободных аминокислот и их производных в хлорокислых экстрактах ткани печени и плазмы крови проводилось методом катионообменной хроматографии на автоанализаторе аминокислот ААА Т-339М [1]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Origin 6.0. Сокращения названий аминокислот приведены в соответствии с общепринятыми стандартами.

### Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента было выявлено, что прерывистый режим введения алкоголя вызывал выраженный аминокислотный дисбаланс в печени крыс.

У животных группы 1, подвергшихся 4-дневной алкоголизации с последующей однодневной отменой этанола, было отмечено достоверное возрастание суммарного содержания свободных аминокислот, обусловленное накоплением заменимых аминокислот и снижением уровня незаменимых (рис. 1, 2).

Увеличение концентраций аминокислот в печени при введении этанола можно объяснить выбро-

сом адреналина и норадреналина надпочечниками, что усиливает кровоснабжение печени за счет возбуждения  $\beta$ -адренорецепторов и приводит к поступлению аминокислот в печень, тем самым приводя к снижению уровня последних в плазме [10]. Алкогольный абстинентный синдром сопровождается усилением стресс-реакции, вызываемой этанолом. Такой режим приводит к повышению функциональной активности надпочечников, при этом увеличивается их масса [9]. Данная трактовка в известной мере объясняет рост концентраций аминокислот в ткани печени. Однако нельзя не обратить внимание и на тот факт, что острое и хроническое воздействие этанола в общем оказывает ингибирующий эффект на синтез белков в печени, что также могло повлиять на накопление свободных аминокислот в ткани [3]. Анализ динамики изменений пула свободных аминокислот плазмы крови в данных экспериментальных условиях выявил прогрессирующее снижение общего уровня аминокислот по мере увеличения количества повторов циклов «алкоголизация-отмена» (рис. 1), что могло быть обусловлено усилением транспорта аминокислот в ткани. Кроме того, нельзя не учитывать возможность угнетения синтеза белков плазмы в условиях алкоголизации, что подтверждается многими исследователями [2, 3]. Выявлено, что гипопроотеинемия является одним из тяжелейших метаболических последствий при алкоголизме, так как уровень белка в плазме является жёсткой генетической константой с достаточно узким диапазоном [2].

Дисбаланс в соотношении заменимых и незаменимых аминокислот выражался в повышении индекса ЗА/НА (рис. 2). Среди незаменимых аминокислот наибольшему снижению были подвержены концентрации Лей и Лиз. Уровень Гис, однако, превышал норму (табл.). Кроме того, было выявлено возрастание индекса гликогенные/кетогенные аминокислоты (ГА/КА). Четырёхдневная алкоголизация с последующей отменой этанола в течение суток вызывала снижение уровней кетогенных аминокислот, в частности, Лей, на фоне неизменного суммарного содержания гликогенных аминокислот, что может косвенно свидетельствовать об активации процессов кетогенеза. Также был отмечен рост уровней Тау, цистеата и фосфоэтаноламина. Уровень мочевины, превышавший контрольные значения, мог свидетельствовать об активации процессов обезвреживания аммиака.

Спустя 3 сут после отмены этанола (группа 2) значение суммарного фонда аминокислот в печени нормализовалось, однако были выявлены нарушения уровней отдельных метаболических групп аминокислот (рис. 1). Так, общее содержание незаменимых аминокислот по-прежнему снижено. В частности, это Вал, Лей, а также Гис, уровень которого, ранее превышавший контрольные значения, в данной ситуации упал ниже нормы (табл.). Суммарное содержание заменимых аминокислот оставалось в пределах нормы, хотя определённый дисбаланс среди отдельных аминокислот этой

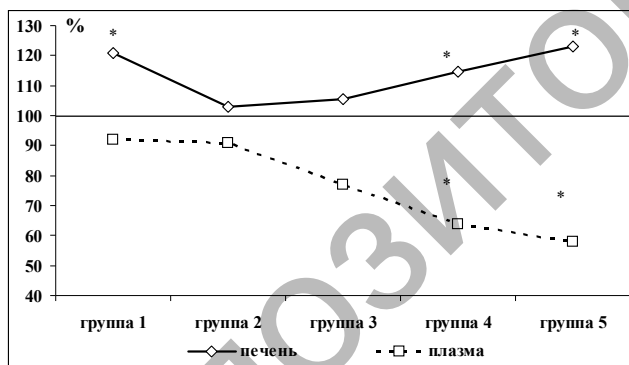


Рис. 1. Изменение общего содержания свободных аминокислот в печени и плазме крови крыс в условиях прерывистой алкогольной интоксикации (за 100% приняты контрольные величины)

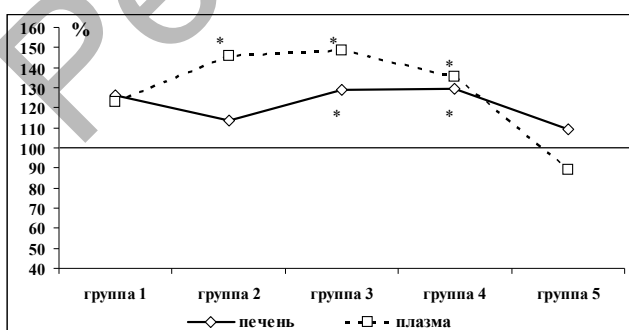


Рис. 2. Изменение соотношения заменимые/незаменимые аминокислоты в печени и плазме крови крыс в условиях прерывистой алкогольной интоксикации (за 100% приняты контрольные величины)

**Таблица.** Свободные аминокислоты печени крыс в условиях прерывистой алкогольной интоксикации с 3-дневным сроком отмены этанола (мкМ/г)

показатель	Контроль	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
истинно-воя кислота	187.68± 20.38	341.17± 53.59*	186.58± 7.74#	136.11± 7.32#Δ	185.17± 12.31*	379.92± 37.67*Δ&
ау	1150.33± 146.27	1957.35± 295.44*	1638.95± 175.6	1832.29± 219.34*	1453.47± 206.01	2823.41± 290*Δ&
фосфо-ганоламин	247.4± 20.82	359.52± 31.42*	318.31± 19.25*	237.8± 14.75#Δ	373.54± 20.26**	400.83± 30.03*Δ
очевина	1168.43± 42.57	1729.45± 150.76*	1466.44± 45.91*	731.3± 38.87#Δ	1615.58± 162.33**	1362.94± 132.07*
сп	1174.05± 35.53	1240.93± 56.37	1239.04± 28.16	926.14± 71.01#Δ	1247.49± 138.77	1380± 58.18**
ре	579.11± 46.59	476.49± 30.32	458.15± 40.03	338.77± 24.54#Δ	367.15± 51.65*	545.25± 36.39*Δ&
ер	2905.13± 213.84	2788.11± 161.48	2254.67± 127.15#	2356.99± 50.88#	2421.44± 121.83	2644.14± 295.92
лу	8101.25± 283.39	9414.65± 774.34	5750.6± 176.78#	7827.27± 290.35Δ	9866.55± 480.66*Δ	7797.29± 440.15Δ&
лн	6152.89± 259.49	6016.85± 346.22	5066.01± 327.08*	6811.95± 307.77Δ	7149.93± 578.01Δ	6891.18± 322.89Δ
ро	649.46± 32.1	675.96± 48.37	612.97± 18.25	584.06± 66.92	507.54± 21.77#Δ	540.48± 70.86
ли	3501.16± 130.47	4191.48± 293.9	3326.68± 271.21	3789.89± 90.68	3188.17± 193.27**	3875.83± 285.72
ла	3105.31± 109.97	3317.82± 217.26	3993.6± 252.53*	2642.4± 223.54Δ	2669.33± 281.49Δ	3827.68± 104.68**&
ал	388.83± 7.06	341.83± 22.85	300.42± 21.86*	350.41± 14.99*	419.5± 22.53*Δ	403.99± 10.02*Δ
ей	166.21± 7.21	112.24± 4.73*	107.77± 3.15*	119.66± 7.37*	126.34± 10.6*	149.79± 7.03*Δ
ир	239.29± 8.43	221.23± 18.63	159.53± 13.38#	190.63± 21.12	198.12± 17.52	265.46± 19.09Δ&
ен	253.65± 28.62	196.31± 22.44	229.06± 8.01	134.14± 8.96#Δ	146.28± 14.63*Δ	112.16± 11.75#Δ
таноламин	2200.43± 244.6	2637.56± 253.86	3547.93± 51.48#	1985.47± 49.59#Δ	2135.18± 169.21Δ	2569.92± 267.63Δ
НЗ	1354.4± 142.17	1078.94± 41.6	809.3± 34.55*	1317.07± 82.49#Δ	1161.07± 106.19#Δ	1424.84± 50.24*Δ
рн	349.41± 30.32	323.01± 17.37	313.65± 14.14	310.06± 12.01	294.86± 16.58	380.77± 10.62*Δ&
из	408.77± 53.04	251.11± 21.1*	365.24± 30.22#	245.11± 7.59*Δ	355.55± 24.46*	497.45± 37.83*Δ&
ис	660.62± 20.06	804.45± 12.74*	595.21± 15.43#	696.6± 20.12#Δ	610.82± 43.62*	837.25± 47.96*Δ&

Примечание: \* - достоверно относительно контроля; # - достоверно относительно группы 1; Δ - достоверно относительно группы 2; \*\* - достоверно относительно группы 3; & - достоверно относительно группы 4.

группы был выявлен: снижение уровней Сер, Гли, Глу и Тир при повышенных концентрациях Ала, этаноламина и фосфоэтаноламина (табл.). Стоит отметить, что при нормальных значениях соотношения ГА/КА в ткани печени наблюдалось уменьшение содержания равно как гликогенных, так и кетогенных аминокислот (рис. 3). Единственной гликогенной аминокислотой, уровень которой превышал контрольные значения, был аланин, однако уровни других гликогенных аминокислот – Сер, Вал, Глу и Гис были ниже контрольных значений. Среди кетогенных аминокислот наиболее выраженному снижению были подвержены уровни Лей и Тир. Соотношение АРУЦ/ААК оставалось в пределах нормы (рис. 3). Концентрация мочевины превышала контрольные значения, а уровень аммиака был снижен, что указывает на интенсивную утилизацию аммиака.

В печени животных 3-й группы, подвергнутых двукратному повторению цикла алкоголизация/отмена, не было выявлено изменений общего содержания свободных аминокислот, но наблюдался рост относительного количества заменимых аминокислот, что выражалось в повышенном значении индекса ЗА/НА (рис. 2). Суммарный уровень незаменимых аминокислот находился в пределах нормы. Среди этой группы аминокислот наиболее сни-

жены были концентрации Тре, Вал, Лей, Фен и Лиз. Несмотря на достоверное увеличение индекса ГА/КА, по-прежнему снижены уровни как гликогенных, так и кетогенных аминокислот. Из гликогенных это Асп, Тре, Сер и Вал, из кетогенных – Лей и Фен. Значение индекса АРУЦ/ААК (рис. 3) превышало контрольные значения. Двукратное повторение цикла алкоголизация/отмена привело к резкому падению уровня мочевины при нормальных концентрациях аммиака, что может указывать на интенсивное использование аминокислот в условиях дефицита белка.

У животных 4-й группы было выявлено обогащение аминокислотного фонда печени, в основном, за счёт заменимых аминокислот (рис. 1, 2). Из незаменимых аминокислот всё ещё снижены уровни Тре, Лей и Фен (табл.). Зарегистрированы повышенные уровни Глу и Фен. В данных экспериментальных условиях произошла нормализация суммарного уровня гликогенных аминокислот (рис. 4), снижен только уровень Тре, а концентрация Глу превышает контрольные значения. По-прежнему снижены уровни кетогенных аминокислот Лей и Фен.

Через 3 сут абстиненции после четырёх циклов алкоголизация/отмена (группа 5) общее содержание свободных аминокислот в ткани печени также повышено, нормализуется уровень незаменимых аминокислот, а общее количество заменимых аминокислот превышает контрольный уровень (рис. 1, 2). При этом выявлен рост концентраций основных гликогенных аминокислот – заменимых Асп и Ала, а из незаменимых – Гис (табл.), что указывает на сокращение использования аминокислот в качестве энергетического субстрата. Из кетогенных аминокислот снижен только уровень Фен. Наблюдается достоверное возрастание концентраций Тау и цистеата по отношению как к контролю, так и к другим экспериментальным группам, что может свидетельствовать о повышении деградации их предшественника – Мет [5]. Увеличение концентрации Тау может также происходить вследствие нарушения процессов конъюгации желчных кислот и активации распада таурохолатов [5]. В данных экспериментальных условиях происходит нормализация концентраций остальных исследованных аминокислот.

При анализе аминокислотного пула плазмы крови в аналогичных условиях были выявлены изменения уровней некоторых нейротрансмиттерных аминокислот. В частности, во всех алкоголизованных группах обнаружено снижение уровня глутамата. Уровень ГАМК был ниже контрольных зна-

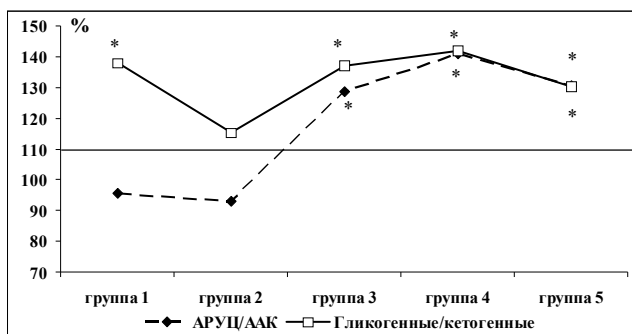


Рис. 3. Изменение аминокислотных индексов печени крыс в условиях прерывистой алкогольной интоксикации (за 100% приняты контрольные величины)

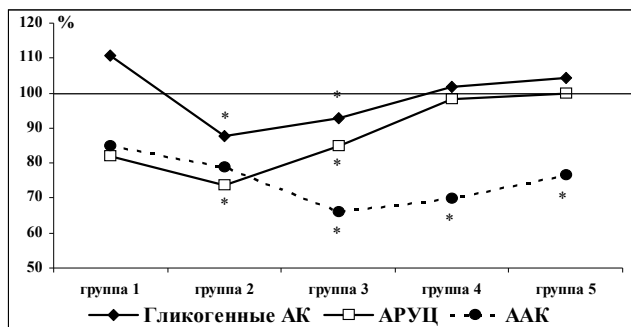


Рис. 4. Изменение суммарного содержания отдельных групп аминокислот печени крыс в условиях прерывистой алкогольной интоксикации (за 100% приняты контрольные величины)

чений в группах 1, 2 и 5. Среди возбуждающих аминокислот выявлено снижение уровня таурина (группы 1, 2, 4, 5). Снижение концентрации глутамата, характерное для абстинентного синдрома, происходило лишь после 4-х циклов алкоголизация-отмена. Уровень аспартата, повышенный в группах 1 и 2, стабилизировался у животных групп 3 и 4, а в группе 5, напротив, был выше контрольного уровня.

### Заключение

Таким образом, в первые сутки абстиненции после 4-дневного введения этанола отмечается повышенное суммарное содержание свободных аминокислот в ткани печени с его нормализацией к концу третьих суток отмены. На третьи сутки после 2-кратного повторения цикла алкоголизация-отмена суммарный уровень свободных аминокислот также находится в пределах нормы. Четырехкратное повторение цикла алкоголизация-отмена сопровождается обогащением пула свободных аминокислот печени, которое сохраняется в течение трёх суток абстиненции. Накопление аминокислот в тканях при воздействии этанола может быть связано с обеднением пула свободных аминокислот плазмы. Последующая абстиненция приводит к усилению стресс-реакции, тем самым вторично индуцируя поглощение аминокислот тканями, в частности — печенью. Этанол ингибирует синтез белков в печени [3], что, на фоне возможной белково-витаминовой недостаточности, явившейся следствием полной или частичной анорексии алкоголизованных животных, приводит к накоплению в ткани печени свободных аминокислот, преимущественно заменимых.

Наибольший дисбаланс в содержании отдельных аминокислот выявлен на третьи сутки после 4-дневной алкоголизации и после 2-кратного повторения цикла алкоголизация-отмена. Наблюдается снижение уровня гликогенных аминокислот, что свидетельствует об активном их использовании в энергетических целях. Кроме того, снижено содержание АРУЦ. Можно предположить, что по мере увеличения длительности абстиненции после однократного периода алкоголизации происходит нарастание аминокислотного дисбаланса в печени. В те же сроки отмены этанола после второго периода алкоголизации в аминокислотном фонде печени были выявлены схожие нарушения. После 4-кратного повторения цикла алкоголизация-отмена отмечалась нормализация уровня гликогенных аминокислот как через 1 сут отмены этанола, так и через 3 сут, что свидетельствует о сокращении их использования в качестве энергетического субстрата. Отношение ЗА/НА, превышавшее контрольные значения на всех сроках эксперимента, нормализуется через 3 сут абстиненции после четырёх периодов алкоголизации. Кроме того, произошла нормализация суммарного уровня АРУЦ в оба срока отмены после четырёх циклов алкоголизация-отмена.

Исходя из вышеизложенных результатов, можно предположить, что многократное повторение циклов алкоголизация-отмена в данном эксперименте вызывает определённые адаптивные изменения, направленные на устранение аминокислотного дисбаланса, и в то же время приводит к накоплению в ткани печени свободных аминокислот, источником которых является плазма крови.

### Литература

- Бенсон Дж. В. Хроматографический анализ аминокислот и пептидов на сферических смолах и его применение в биохимии и медицине / Дж. В. Бенсон, Дж. А. Патерсон // Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков; под ред. Ю. А. Овчинникова — М.: Мир, 1974. — С. 9 — 84.
- Биохимия и алкоголизм (I): метаболические процессы при алкоголизме / И.М. Рослый [и др.] // Вопросы наркологии. — 2004. — №2. — С. 70 — 79.
- Божко Г.Х. Белки крови при алкоголизме / Г.Х. Божко, П.В. Волошин // Журнал неврологии и психиатрии. — 1991 г. — Т.91. — №2. — С.126 — 128.
- Вольнец О.С. Свободные аминокислоты печени крыс в развитии алкогольной «печёночной энцефалопатии» / О.С. Вольнец, С.Ю. Островский, Л.И. Нефёдов // Актуальные вопросы гепатологии: третий симпозиум гепатологов Беларуси. Гродно, 7-8 октября 1998 г.; научн. ред. В.М. Цыркунов. — Минск, 1998. — С. 65.
- Нефёдов Л. И. Аминокислоты и их производные в патогенезе и лечении поражений печени / Л. И. Нефёдов [и др.] // Весці. АН Беларусі, Сер. біял. навук. — 1997.—№2. — С. 39-48.
- Новые подходы в моделировании алкогольной интоксикации / В.В. Лелевич [и др.] // Современные аспекты изучения алкогольной и наркотической зависимости: сб. науч. ст. / НАН Беларуси, Ин-т биохимии; науч. ред. В.В. Лелевич. — Гродно, 2004. — С. 86 — 90.
- Основы биохимии / А.Уайт [и др.] ; под ред. Ю. А. Овчинникова. М: Мир, 1981. — Ч. 2. — С 881 — 967.
- Островский Ю.М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю.М. Островский, С.Ю. Островский; Мн: Наука и техника, 1995. — 280 с.
- Шейбак В.М. Обмен свободных аминокислот и КоА при алкогольной интоксикации/В.М. Шейбак. — Гродно, 1998. — 153 с.
- Effects of hypophysectomy, adrenalectomy and (-)-propranolol on ethanol-induced decrease in plasma amino acids / T. Eriksson [et al.] // Arch.Pharmacol. -1981. -Vol.317. - P.214-218.
- The in vivo and in vitro protective properties of taurine / J.A. Timbrell [et al.] // Gen. Pharmacol. — 1995. — Vol. 26, № 3. — P. 453 — 462.

Поступила 16.05.07