

УДК 577.122: 616.89

ФОРМИРОВАНИЕ ПУЛА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ КОРРЕКЦИИ L-АРГИНИНОМ И L-NAME

О.В. Артемова; В.В. Лелевич, д.м.н., профессор
«Гродненский государственный медицинский университет»

Хроническая алкоголизация белых крыс линии Wistar (42 сут) с последующей отменой этанола в течение 1 сут. и прерывистая алкоголизация (42 сут) вызывают дисбаланс фонда свободных аминокислот в печени, характеризующийся обеднением аминокислотного пула, истощением ресурсов гликогенных аминокислот и ростом концентрации аммиака на фоне сниженного уровня мочевины. Введение L-NAME в условиях хронической алкоголизации уменьшает дисбаланс аминокислот и повышает индекс АРУЦ/ААК, а введение L-аргинина в условиях прерывистой алкогольной интоксикации нормализует основные показатели аминокислотного пула, увеличивают соотношение ГА/КА.

Ключевые слова: печень, свободные аминокислоты, прерывистая алкоголизация, этанол, L-аргинин, L-NAME.

It was found that chronic alcoholization (42 d) with 1-day ethanol withdrawal and intermittent alcoholization (42 d) caused disbalance of amino acid pool in Wistar rat liver associated with the decrease in amino acid pool and glycogenic amino acid resources and increase in ammonium concentration when the urea level was low. Injections with L-NAME has been shown to decrease amino acid disbalance and to increase BCAA/AAA ratio under chronic alcohol intoxication, while treating with L-Arginine caused a normalization of the most important amino acid indices and increased glycogenic/ketogenic amino acid ratio in intermittent alcoholization.

Key words: liver, free amino acid, interrupted alcoholization, ethanol, L-arginine, L-NAME.

Введение

Алкогольная интоксикация сопровождается дисбалансом практически всех обменных процессов организма, в том числе и нарушениями обмена аминокислот и их производных. В научной литературе существует достаточно данных об изменении аминокислотного пула плазмы крови и тканей, наблюдаемых при различных формах алкогольной интоксикации и при алкогольном абстинентном синдроме (ААС), который также является фактором, вносящим вклад в нарушения аминокислотного пула, вызванные алкогольной интоксикацией [7, 9, 11].

Ранее нами было исследовано состояние аминокислотного пула в режиме прерывистой алкогольной интоксикации с 3-дневным периодом отмены этанола [5, 13]. Показано, что по мере увеличения количества повторов циклов «алкоголизация–отмена» в плазме крови отмечалось прогрессирующее снижение общего уровня аминокислот на фоне нормализации основных аминокислотных индексов (аминокислоты с разветвлённой углеродной цепью/ ароматические аминокислоты (АРУЦ/ААК), заменимые/незаменимые (ЗА/НА), гликогенные/кетогенные аминокислоты (ГА/КА)). В печени аналогичные условия приводили к относительному устранению аминокислотного дисбаланса и, в то же время, вызывали накопление свободных аминокислот, источником которых, по всей видимости, являлась плазма крови.

Прерывистая алкоголизация с 7-дневным периодом отмены этанола вызывала нарастание аминокислотного дисбаланса в плазме и печени в отда-

лённые сроки отмены этанола после однократно перенесённого цикла алкоголизация/отмена. Двукратное повторение цикла вызывало наибольшие сдвиги концентраций отдельных аминокислот в печени и плазме и накопление аминокислот в печени в первые сутки отмены этанола.

Разработка новых, эффективных и, в то же время, малотоксичных средств коррекции нарушений пула свободных аминокислот, выявляемых при алкоголизации и синдроме отмены этанола, представляется весьма актуальной на сегодняшний день задачей. Основные подходы к нормализации фонда аминокислот предполагают устранение дефицита аминокислот — предшественников биогенных аминов, недостаточности нейротрансмиттерных аминокислот и субстратов ЦТК [1, 11]. В этих целях успешно применяются композиции аминокислот, общее действие которых направлено на устранение белкового дефицита и функциональной недостаточности печени [8].

Значительный вклад в общую интоксикацию организма при алкоголизации вносит гипераммониемия, возникающая вследствие усиленного катаболизма белков и влияния алкоголя на ферменты, участвующие в обезвреживании аммиака. В удалении аммиака из организма, особенно из нервной ткани, ведущая роль принадлежит взаимопревращениям глутамина и глутамата. Хроническая алкогольная интоксикация подавляет активность глутаминсинтазы, что способствует росту концентрации свободного аммиака и таким образом повышает нагрузку на цикл мочевинообразования [14].

Одним из ключевых субстратов цикла мочевины является L-аргинин. Кроме того, L-аргинин является предшественником NO и субстратом для NO-синтетазы [6]. Эта аминокислота обладает широким спектром биологического действия, обусловленным её многосторонней метаболической ролью в организме. Назначение L-аргинина значительно улучшает эндотелиальную функцию при патологиях сердечно-сосудистой системы (гиперхолестеринемия, атеросклероз, гипертензия) [8]. Отмечено ингибирование процессов ПОЛ и снижение продукции супероксиданиона при введении L-аргинина [10]. Кроме того, существуют данные об активации реакций ЦТК при введении L-аргинина [4]. Известно, что высокие дозы L-аргинина вызывают увеличение концентраций некоторых гормонов в плазме крови (инсулина, пролактина, глюкагона, соматотропина) [15]. Многочисленные экспериментальные подтверждения биологической активности L-аргинина, продемонстрированные при различных патологических ситуациях, вызвали интерес к исследованию коррекции нарушений, вызванных алкогольной интоксикацией. Назначение L-аргинина при хронической алкогольной интоксикации вызывает снижение ПОЛ, уровня эндотоксина в крови, предотвращает развитие воспаления, фиброза, некроза и ожирения печени [12]. Кроме того, существуют сведения о значительности роли L-аргинина в детоксикационных процессах, при нейтрализации аммиака в условиях хронической алкоголизации [14].

В связи с этим нами была предпринята попытка коррекции нарушений пула свободных аминокислот, вызванных различными режимами алкогольной интоксикации, с помощью L-аргинина, являющегося субстратом цикла мочевинообразования и донором NO-средства, ограничивающего окислительные повреждения тканей. С другой стороны, оксид азота может быть источником активных форм азота. Учитывая этот факт, мы использовали ингибитор NO-синтетазы — метиловый эфир N ω -нитро-L-аргинина (L-NAME), чтобы исключить возможный эффект окисляющего действия метаболитов оксида азота на клеточные структуры.

Методика

В эксперименте использовались белые крысы — самцы линии Wistar массой 160–180 г, содержащиеся на обычном рационе вивария. Этанол вводили дважды в сутки в наркотической дозе (3,5 г/кг, в/ж, 25% раствор). Животные были разделены на 6 групп (n=6). Первая опытная группа (I) получала алкоголь в течение 42 сут, декапитация через 1 сут после отмены этанола. Второй группе (II) в течение 42 сут чередовали 7-дневный цикл введения алкоголя с 7-ю сутками абстиненции, декапитация на 43-й день. Третья опытная группа (III) получала алкоголь в течение 42 сут, декапитацию проводили через 7 сут отмены этанола. Четвёртой группе (IV), в течение 42 дней помимо этанола, ежедневно в течение 42 дней вводили L-

NAME, «Sigma» (25 мг/кг, в/бр) декапитация на 43-й день. Пятая группа животных (V) подвергалась тем же манипуляциям, что и вторая, однако во время периодов абстиненции получала L-аргинин, «Merck» (500 мг/кг, в/ж, 1 раз/сут). Контрольная группа получала эквивалентное количество воды. Определение аминокислот и их производных в экстрактах ткани печени крыс проводилось методом катионообменной хроматографии на автоанализаторе аминокислот ААА Т-339М [2]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 7.0. Сокращения названий аминокислот приведены в соответствии с общепринятыми стандартами.

Результаты и их обсуждение

Выявлено, что 42-дневная алкоголизация с последующей 24-часовой отменой этанола приводит к снижению соотношения гликогенные/кетогенные аминокислоты (ГА/КА) в ткани печени, что могло происходить в связи с использованием аминокислот тканевых белков в качестве энергетического субстрата, наиболее выгодного в данной ситуации, хотя при этом наблюдается лишь незначительное снижение суммарного содержания аминокислот и соотношения ЗА/НА (рис. 1). Снижение индекса АРУЦ/ААК на 32% может говорить как об активной утилизации АРУЦ, так и о накоплении ААК, свидетельствующем о дисфункции печени. В данных экспериментальных условиях, действительно, имеет место уменьшение концентрации Лей и рост уровня Тир (табл.). Подтверждением катаболических процессов в белках печени может явиться выявленное накопление свободного аммиака. При этом отмечается резкое снижение уровня мочевины, что могло быть связано с интенсивным использованием аминокислот в условиях алиментарного белкового дефицита [3]. Среди отдельных аминокислот было выявлено снижение концентраций таких гликогенных аминокислот, как Асп, Сер и Про. Также отмечалось снижение уровней Лей, Цис и фосфоэтаноламина.

При исследовании аминокислотного фонда в динамике последующей отмены этанола было выявлено, что через 7 сут после 42-дневной алкоголизации произошла нормализация суммарного содержания свободных аминокислот, а также индек-

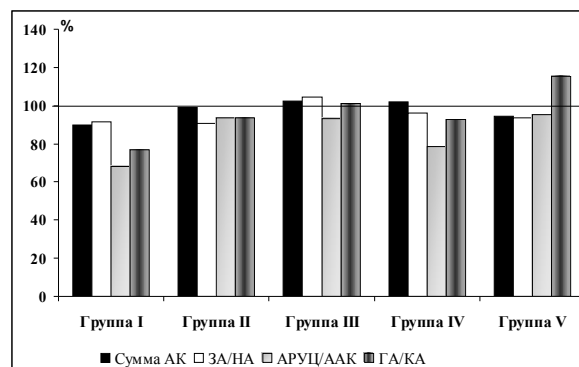


Рисунок 1 - Характеристика пула свободных аминокислот печени крыс на фоне различных режимов алкогольной интоксикации и при введении L-Аргинина и L-NAME

Таблица – Содержание свободных аминокислот (нМ/г) в печени крыс на фоне прерывистой алкогольной интоксикации (в/ж, 3,5 г/кг 2 раза/сут) и при введении L-аргинина (в/ж, 500 мг/кг) и L-NAME (в/бр, 25 мг/кг)

Показатель	контроль	Группа I	Группа II	Группа III	Группа IV	Группа V
Цистеат	174.59± 19.35	159.81± 15.49	230.02± 17.04 Δ	253.82± 9.04* Δ	202.48± 15.86**	232.49± 39.5
Таурин	2017.27± 225.2	1671.47± 275.88	1794.76± 157.69	1611.15± 122.12	1936.48± 148.64	1335.26± 158.77*+
Фосфо-этаноламин	1077.25± 120.54	592.54± 144.62*	776.05± 117.37	608.9± 84.63*	839.35± 174.53	473.96± 89.51*
Мочевина	1283.06± 220.14	422.01± 172.42*	719.5± 150.05*	578.4± 72.94*	580.72± 91.29*	739.96± 71.47*
Аспаргат	2991.4± 226.29	1916.59± 151.99*	2659.09± 90.34 Δ	2593.54± 107.26 Δ	2325.01± 178.34 *	2641.51± 221.71 Δ
Треонин	303.75± 28.3	385.32± 78.32	321.16± 77.99	217.6± 22.78*+	139.79± 12.64* Δ#	344.9± 62.43+
Серин	1094.42± 41.58	631.86± 82.92*	881.62± 61.83* Δ	864.83± 138.25	643.08± 125.26*	1011.92± 94.96 Δ+
Пролин	191.43± 33.3	83.44± 3.13*	75.69± 15.38*	156.06± 33	97.02± 13.44*	106.15± 17.42*
Аланин	1364.87± 93.88	1410.29± 194.99	1954.95± 235*	1410.86± 230.22	1499.32± 82.36	1233.75± 61.08#
Валин	422.27± 54.13	376.09± 23.24	379.09± 28.6	432.4± 28.87	369.14± 29.07	356.85± 30.76
Цистеин	49.04± 3.61	22.64± 2.52*	24.81± 4.78*	25.48± 2.66*+	17.5± 2.04*	21.02± 2.34*
Метионин	217.47± 29.45	178.87± 39.31	195.04± 41.93	208.69± 30.11	135.57± 21.41*	153.92± 16.72
Изолейцин	129.91± 9.76	136.42± 19.76	146.6± 16.07	137.26± 6.41	123.36± 10.68	135.78± 10.16
Лейцин	203.64± 7.26	147.97± 12.04*	183.62± 17.31	172.15± 6.15*	162.11± 8.59*	146.16± 14.2*
Тирозин	212.78± 15.13	286.6± 16.7*	220.54± 23.17 Δ	229.66± 16.53 Δ	266.19± 21.3	212.5± 23.06 Δ
Фенил-аланин	193.16± 12.04	232.82± 23.93	195.35± 12.92	214.92± 29.28	183.09± 9.99	159.99± 19.87 Δ
Этаноламин	577.82± 44.51	456.23± 73.89	390.7± 97.07	252.64± 12.08* Δ+	441.74± 63.23	285.79± 17.2* Δ+
Аммиак	5986.61± 255.83	7778.29± 554.48*	7652.38± 731.57*	8142.79± 418.27*+	6465.89± 339.3	7164.03± 280.64*
Орнитин	379.59± 11.52	436.7± 46.3	388.24± 19.88	424.67± 34.48	411.85± 40.47	354.28± 23.8
Лизин	509.65± 61.73	341.31± 65.02	237.71± 43.71*	482.79± 108.14	632.12± 90.75 Δ#	495.08± 65.82#
Гистидин	984.11± 39.73	901.85± 79.31	1139.72± 34.28* Δ	1113.69± 37.21* Δ	1106.3± 43.05 Δ	1035.61± 24.25*

Примечание: * – достоверно относительно контроля; Δ – достоверно относительно группы 1; # – достоверно относительно группы 2; ** – относительно группы 3.

сов ГА/КА и АРУЦ/ААК (рис. 1). При этом нормализуются уровни большинства гликогенных аминокислот, сниженных в группе I: Сер, Асп, Про (таблица). Концентрации Лей и Цис по-прежнему ниже контрольных величин. Отмечена нормализация уровня Тир. Однако в данных условиях было выявлено увеличение концентрации цистеата, Гис и снижение уровня Тре. По-прежнему оставался сниженным уровень фосфоэтанолamina, на фоне чего отмечается резкое падение содержания ЭА. Несмотря на очевидную нормализацию большинства показателей аминокислотного пула, уровень аммиака повышен, при этом, уровень мочевины более чем в 2 раза ниже нормы (таблица).

При 3-кратном повторении цикла (7 сут этанол + 7 сут отмены) не было выявлено столь выраженного дисбаланса аминокислотного пула, как это наблюдалось в группе I. Не отмечалось отклонений суммарного содержания аминокислот и индексов ЗА/НА, АРУЦ/ААК, ГА/КА. Сходными с группой I явлениями были сниженные уровни Сер, Про

и Цис. Также наблюдается низкий уровень мочевины при тенденции к повышению концентрации аммиака. В отличие от группы I, было выявлено повышение уровня цистеата, Асп и Сер. Кроме того, не происходило повышения уровня Тир и снижения концентрации фосфоэтанолamina, наблюдавшегося в группах I и II (табл).

В обеих группах, подвергшихся одной или нескольким 7-дневным отменам этанола (группы II и III), выявлено, в отличие от группы I, повышенное содержание цистеата, Асп и Гис. Уровень Тир в этих группах ниже, чем в группе I (таблица).

Введение L-NAME на фоне хронической алкоголизации с последующей отменой этанола в течение 1 сут приводило к нормализации индекса ГА/КА, а также к повышению соотношения АРУЦ/ААК относительно группы 1, хотя и не до значений контроля. Суммарное содержание аминокислот и значение ЗА/НА регистрировались в пределах контрольных величин (рис. 1). Как и в группе I, выявлено пониженное содержание Асп, Сер, Про, Цис и Лей. Также снижен уровень мочевины. Однако, в отличие от группы I, концентрация аммиака нормализовалась. Также нормализуется содержание фосфоэтанолamina. Отличительным эффектом введения L-NAME являлось резкое снижение концентрации Тре и Мет (табл).

Введение L-аргинина на фоне прерывистой алкоголизации вызывало относительную нормализацию основных показателей аминокислотного пула (рис. 1, 2). Некоторое увеличение соотношения ГА/КА происходило за счёт снижения доли гликогенных аминокислот в поддержании энергетического статуса организма. В отличие от группы II, наблюдалось снижение уровня Тау и ФЭА, а также увеличение содержания Сер, Лиз и уменьшение содержания Ала и ЭА (табл.). По-прежнему выявляется низкий уровень мочевины на фоне повышенной концентрации аммиака, что не подтверждает предположение о способности аргинина оказывать активирующее действие на процессы утилизации

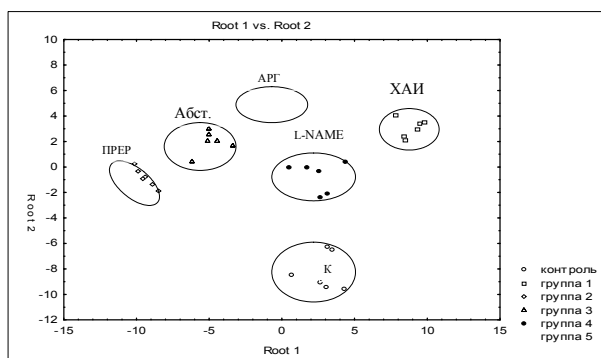


Рисунок 2 - Расположение показателей пула свободных аминокислот печени крыс на плоскости двух главных компонент при различных режимах алкогольной интоксикации и при коррекции L-Аргинином и L-NAME

аммиака в данных экспериментальных условиях. Результаты дискриминантного анализа не выявили значительного улучшения показателей аминокислотного пула при введении L-аргинина относительно группы II.

При сопоставлении влияния L-NAME и аргинина на фонд свободных аминокислот в различных условиях алкогольной интоксикации необходимо отметить, что L-NAME не нормализует уровень АРУЦ/ААК, сниженный при хронической алкоголизации. Введение аргинина на фоне прерывистой алкоголизации вызывает некоторое возрастание соотношения ГА/КА по сравнению с группой II, в то время как L-NAME практически нормализует данный показатель, резко сниженный в условиях хронической алкоголизации. L-NAME нормализует уровень аммиака, повышенный в условиях алкоголизации, в то время как аргинин не оказывает такого эффекта, как предполагалось изначально.

Дополнительное исследование всего пула аминокислот с применением пошагового дискриминантного анализа выявило, что наиболее приближенными к контрольным величинам были показатели группы, подвергшейся хронической алкоголизации с последующей 7-дневной отменой этанола, а также группы, которой назначали L-NAME (Рис.2), в то время как показатели остальных опытных групп выявляли максимальную миграцию в сторону, противоположную контрольной группе. Данные дискриминантного анализа свидетельствуют также о том, что показатели групп III и IV значительно отличаются от группы хронически алкоголизованных животных

Выводы

1. Хроническая алкоголизация в течение 42 суток с последующей отменой этанола в течение 1 суток вызывает наибольший дисбаланс фонда свободных аминокислот в ткани печени, характеризующийся истощением ресурсов гликогенных аминокислот, падением индекса АРУЦ/ААК и ростом концентрации аммиака на фоне сниженного уровня мочевины.

2. Прерывистая алкоголизация в течение 42 суток также приводит к гипераммониемии в сочетании с низкими концентрациями мочевины. При этом общее состояние аминокислотного пула (ГА/

КА, АРУЦ/ААК) не характеризуется столь выраженным дисбалансом, как это наблюдается в условиях хронической алкоголизации.

3. В отдаленные сроки отмены этанола (7 суток) после хронической алкоголизации отмечается нормализация большинства показателей аминокислотного пула, за исключением высокого уровня аммиака и низкого содержания мочевины.

4. Введение L-NAME в условиях хронической алкогольной интоксикации приводит к относительно устранению дисбаланса пула свободных аминокислот печени, направленному на нормализацию индексов АРУЦ/ААК, ГА/КА и смягчение явлений гипераммониемии.

5. Введение L-аргинина на фоне прерывистой алкоголизации нормализует основные показатели аминокислотного пула печени и увеличивает индекс ГА/КА. Тем не менее, при этом сохраняется низкий уровень мочевины на фоне повышенной концентрации аммиака, что не подтверждает предположения о способности аргинина оказывать активирующее действие на процессы утилизации аммиака в данных экспериментальных условиях.

Литература

1. Аминокислоты и их производные в патогенезе и лечении поражений печени / Л. И. Нефёдов [и др.] // Вестн. АН Беларуси, Сер. біял. навук. — 1997. — №2. — С. 39–48.
2. 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.
3. Биохимия и алкоголизм (I): метаболические процессы при алкоголизме / И.М. Рослый [и др.] // Вопросы наркологии. — 2004. — №2. — С. 70–79.
4. Влияние предшественника монооксида азота — L-аргинина и блокаторов NO-эргической системы на активность дегидрогеназ ЦТК и сопряжённые с ним реакции / Л.М. Караедова [и др.] // Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и при патологии. — Гродно, 2006. — Ч.1. — С. 98–104.
5. Лелевич В.В. Характеристика пула свободных аминокислот плазмы крови крыс в условиях прерывистой алкогольной интоксикации. / В.В. Лелевич, О.В. Артёмова // М-лы респ. конф. «Актуальные вопросы молекулярной эволюции и биохимии», БГМУ, Минск. — 2006, — С. 16–18.
6. Гридлевский Р. Роль монооксида азота в сердечно-сосудистой системе / Р.Гридлевский // Вестник ГГМУ. — 2003. — № 4. — С.
7. Козловский А. В. Характеристика фонда свободных аминокислот сыворотки крови в динамике алкогольного абстинентного синдрома. Автореф. дисс. канд. мед. наук. — Минск. — 1993. — С. 11-13.
8. Марков Х.М. О биорегуляторной системе L-аргинин — оксид азота. / Х.М. Марков // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1996. — № 1. — С. 34–39.
9. Островский Ю.М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю.М. Островский, С.Ю. Островский. — Мн: Наука и техника, 1995. — 280 с.
10. Ходосовский М.Н. Участие L-аргинин —NO системы в развитии реперфузионных повреждений печени / М.Н. Ходосовский, В.В. Зинчук // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2003. — № 3. — С. 39–43.
11. Шейбак В.М. Обмен свободных аминокислот и КоА при алкогольной интоксикации / В.М. Шейбак. — Гродно. — 1998. — 153с.
12. Arginine Reverses Ethanol-Induced Inflammatory and Fibrotic Changes in Liver Despite Continued Ethanol Administration / Amin A. Nanji [et al.] // The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics—2001. — №299. — P. 832–839.
13. Artyomova O.V. Free amino acids in rat liver under interrupted alcohol intoxication / O.V. Artyomova // Alcohol and alcoholism. — 2005. — Vol. 40. — P. 163.
14. Socolovic D. L-Arginine supplementation increases ammonia detoxication in rats treated with ethanol / D. Socolovic // Alcohol and alcoholism. — 2007. — Vol. 42. — P. 153.
15. Vascular and hormonal responses to arginine: provision of substrate for nitric oxide or non-specific effect? / R.J. MacAllister [et al.] // Clin. Sci. — 1995. — № 89. — P.183–90.

Поступила 13.02.08