

УДК 547.21/.31:576.2:577.1

ВЛИЯНИЕ ТАЛЕРИНА НА СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ИНТОКСИКАЦИИ ДИНИЛОМ

В.М. Шейбак, О.Н. Могилевец, Е.М. Дорошенко,
В.Ю. Смирнов

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В работе изучены нарушения обмена свободных аминокислот и биогенных аминов в организме животных при хронической интоксикации динилом, а также определение возможности стимуляции адаптационных механизмов введением талерина. Хроническая интоксикация динилом ведет к дезорганизации обменных процессов, с преобладанием катаболического компонента, регистрируемого в виде интегрального увеличения концентрации свободных аминокислот и их производных в плазме крови, а также характеризуется преобладанием процессов торможения на уровне ЦНС. Курсовое введение талерина животным, подвергнутым хронической интоксикации динилом оказывает существенное воздействие на обмен веществ как в периферических тканях, так и в клетках центральной нервной системы. Важным моментом в эффектах талерина является нормализация обмена нейроактивных аминокислот и их производных, оптимизация процессов биосинтеза белка и фосфолипидов. Эффект талерина в целом следует рассматривать как протекторный.

Ключевые слова: аминокислоты, биогенные амины, динил, талерин.

The disturbances of the metabolism of amino acids and biogenic amines in the organism of rats in chronic intoxication with dinyl and the possibility of stimulation of the adaptive mechanisms by introduction of talerin have been investigated. The chronic intoxication with dinyl is characterized by prevalence of processes of CNS inhibition and produces the disorganization of metabolic processes with prevalence of the catabolic component. This component is registered as an integrated increase of the concentration of free amino acids and their derivatives in plasma. The course application of talerin in conditions of chronic introduction of dinyl influences the metabolism both in the peripheral tissues and in cells of the central nervous system. The normalization of the metabolism of neuroactive amino acids and their derivatives, optimization of processes of biosynthesis of protein and phospholipids are an important moment in the effects of talerin. The effect of talerin is protective.

Key words: amino acids, biogenic amines, dinyl, talerin.

Создание новых композиций, обладающих высокой биологической активностью, на основе аминокислот, микроэлементов и витаминов является одной из приоритетных задач биохимии и фармакологии [4]. Существуют многочисленные доказательства в пользу того, что аминокислоты и их производные относятся к соединениям, на основе которых могут быть разработаны лекарственные средства, обладающие нейротропной, гепатотропной и иммуномодулирующей активностью. Эти положительные качества могут быть усилены одновременным введением некоторых микроэлементов и витаминов, что позволяет максимально эффективно стимулировать определенные метаболические пути в организме [3, 6]. Этот класс препаратов предназначен для направленной метаболической коррекции состояний, возникающих при длительном воздействии токсического фактора экзогенной или эндогенной природы. Учитывая, что такие препараты практически не обладают (или обладают очень низкой) токсичностью, это позволяет широко применять их с лечебной и профилактической целью. Таким образом, исследования новых биологических свойств композиций, содер-

жащих определенные сочетания аминокислот, микроэлементов и витаминов, позволят разработать показания их применения для коррекции метаболического, иммунного статуса, повышения неспецифической резистентности организма и в полной мере реализовать их свойства в качестве средств метаболической терапии.

Нами разработана композиция («талерин»), отвечающая вышеуказанным положениям. В качестве длительно действующего в эксперименте токсического фактора нами использованы динил, смесь ароматических углеводородов, широко применяемая в химической промышленности. Известны клинические проявления интоксикации динилом, появляющиеся при поступлении его в организм в дозах, многократно превышающих ПДК [2, 5]. Вместе с тем, у работающих длительное время в контакте с этим веществом отмечается широкий спектр нарушений, позволяющий предположить нарушение адаптационных возможностей организма при хроническом поступлении в организм данного ксенобиотика.

Целью работы было изучение нарушений обмена свободных аминокислот и биогенных аминов

в организме животных при хронической интоксикации динилом, а также определение возможности стимуляции адаптационных механизмов введением талерина.

Материалы и методы

В эксперименте использованы 24 белые крысы гетерогенной популяции, массой 180-220 г, находящиеся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. Опытной группе животных в течение 30 дней внутрибрюшинно вводили динил в дозе 5 мг/кг массы и объеме 0,5 мл/кг. В течение последних 10 суток части животных из опытной группы внутривенно вводили талерин (композицию, состоящую из аминокислот, витаминов и микроэлементов). Животные контрольной группы получали эквивалентные количества физиологического раствора. Через 24 ч после последнего введения животных декапитировали и для биохимических исследований забирали плазму крови, печень, сердце и отделы мозга – стриатум, средний мозг и гипоталамус.

Определение свободных аминокислот плазмы крови, тканей печени и сердца проводили в хлорнокислых экстрактах на аминокислотном анализаторе ААА339Т [1].

Определение свободных аминокислот и их производных проводили в хлорнокислых экстрактах, полученных из ткани мозга. Отделы мозга гомогенизировали в соотношении 1:10 в 0,2 М HClO_4 , содержащей 1 мМ гомо-таурин и 1 мкМ ванилиновой кислоты (внутренние стандарты), 20 мг/л ЭДТА и 50 мг/л метабисульфата натрия, затем центрифугировали на холоду при 20000g 15 мин, после чего супернатант немедленно отделяли от осадка. Определение проводили методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Условия: колонка Диасорб 130 C_{16} Т, 3х150 мм; подвижная фаза: 0,1 М Na-ацетатный буфер pH 5,7 / 50% метанол - 100 / 54 (об/об). Скорость потока 0,8 мл/мин, температура колонки 30°C. Дериватизация производилась путем смешивания пробы с 5 объемами 0,4% раствора о-фталевого альдегида и 0,3% 3-меркаптопропионовой кислоты в 0,4 М Na-боратном буфере, pH 9,4. Нейтрализация осуществлялась добавлением равного объема 0,1 М хлорной кислоты. Дополнительно проводили определение ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм – для триптофана). Условия определения: колонка Сепарон SGX C_{18} , 8 мкм, подвижная фаза: 0,1 М NaH_2PO_4 , 17 мМ CH_3COOH , 20 мг/л ЭДТА, 180

мг/л октилсульфоната натрия, 230 мг/л гептилсульфоната натрия. Скорость потока 0,5 мл/мин, температура колонки 27°C. Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработка данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Обработка данных была реализована с помощью программы Statistica 7.0 [8].

Результаты и обсуждение

Хроническая интоксикация динилом характеризуется повышением общего содержания свободных аминокислот и их производных в плазме крови (табл.1). Среди определяемых нами свободных аминокислот достоверно были повышены только уровни треонина, серина, глутамина и аланина. Между тем, у животных, которые последние 10 дней эксперимента получали наряду с динилом препарат талерин, регистрировались гораздо большие изменения со стороны аминокислотного пула плазмы крови (см. табл.1). Прежде всего, следует отметить нормализацию общего суммарного содержания аминокислот и их производных, хотя изменения концентраций индивидуальных компонентов пула носили разнонаправленный характер. Так, у животных, получавших талерин, были выше контрольных значений концентрации аспартата, серина, глицина, а также уровни незаменимых аминокислот треонина, лизина и гистидина. Вероятно, как следствие дополнительного введения в организм содержащегося в препарате таурина, у животных этой группы возрастал в плазме крови уровень этой серосодержащей аминокислоты. Одновременно содержание ряда других как заменимых, так и незаменимых аминокислот либо было ниже, или они не отличались от контрольных значений: гидроксипролин, глутамин, пролин, аланин, лейцин, орнитин. Именно снижение концентраций этих аминокислот характерно для усиления процессов синтеза белка и, напротив, уменьшения катаболической направленности обмена веществ. Как благоприятное действие талерина следует рассматривать падение количества α -аминобутирата и свободного этаноламина в плазме крови [7].

Если в ткани печени хроническое введение динила характеризовалось увеличением содержания фенилаланина и глутамина (см. табл.1), то дополнительное одновременно назначение динила и талерина в течение 10 дней в еще большей степени повышало содержание фенилаланина, нормализовало количество глутамина и характеризовалось увеличением концентраций лизина и фосфоэтаноламина, структурного компонента фосфолипидов [7]. Общее содержание свободных аминокислот и их производных в печени опытных групп животных достоверно не изменялось.

Таблица 1 - Концентрация свободных аминокислот и их производных в тканях крыс после интоксикации динилом и введения на его фоне талерина (представлены только достоверные изменения)

Показатели	Контроль	Динил	Динил + талерин
Плазма крови, мкмоль/л			
Таурин	262 ± 16	259 ± 24	309 ± 12*
Аспаргат	27 ± 3	34 ± 4	37 ± 1*
Гидроксипролин	35 ± 14	54 ± 6	20 ± 4†
Треонин	141 ± 7	190 ± 8*	230 ± 16*†
Серин	289 ± 17	369 ± 13*	353 ± 17*
Глутамин	2710 ± 132	3460 ± 211*	2930 ± 106†
Пролин	379 ± 85	488 ± 61	188 ± 14*†
Глицин	265 ± 13	304 ± 23	348 ± 28*
Аланин	821 ± 32	993 ± 44*	870 ± 50
α-аминомасляная кислота	14 ± 1	12 ± 1	10 ± 1*
Лейцин	101 ± 6	113 ± 4	96 ± 3†
Этаноламин	40 ± 9	46 ± 11	11 ± 1*†
Орнитин	45 ± 1	51 ± 3	40 ± 2†
Лизин	167 ± 19	217 ± 20	255 ± 23*
Гистидин	63 ± 3	73 ± 4	73 ± 2*
Сумма аминокислот и их производных	5416 ± 235	6724 ± 253*	5836 ± 212†
Заменимые / незаменимые аминокислоты	6,23 ± 0,38	6,56 ± 0,36	5,23 ± 0,097*+
Печень, нмоль/г			
Фосфозаноламин	446 ± 38	439 ± 53	706 ± 91*†
Глутамин	4760 ± 220	5778 ± 366*	5339 ± 429
Фенилаланин	67 ± 5	92 ± 4*	105 ± 10*
Лизин	242 ± 35	279 ± 230	381 ± 30*†
Сумма аминокислот и их производных	21124 ± 618	21965 ± 815	20535 ± 1599
Сердце, нмоль/г			
Глутамат	4517 ± 470	4460 ± 253	6626 ± 374*†
Глутамин	4799 ± 544	4992 ± 268	7948 ± 709*†
Пролин	277 ± 32	364 ± 48	600 ± 108*
Глицин	489 ± 33	516 ± 59	618 ± 27*
Фенилаланин	66 ± 4	80 ± 6	88 ± 8*
β-аланин	151 ± 20	232 ± 23*	214 ± 73
Лизин	250 ± 24	326 ± 42	442 ± 32*†

Условные обозначения: p<0,05 при сравнении с группами:

* - контроль, † - динил

Хроническая интоксикация динилом вызывала увеличение в ткани сердца концентрации β-аланина, антагониста транспорта таурина через плазматические мембраны [12], иных изменений со стороны аминокислотного фонда сердца отмечено не было (см. табл.1). Между тем, в группе животных, получавших талерин, достоверно повышались концентрации глутамата (на 47%), глутамина (на 65%), пролина (на 115%), глицина (на 26%), фенилаланина (на 33%) и лизина (на 76%). Таким образом, несомненно, что талерин обладает определенным кардиотропным действием, усиливая приток свободных аминокислот в сердечную мышцу, что, вероятно, позволяет оптимизировать процессы синтеза белка, а также энергетическое обеспечение кардиомиоцитов [11].

Хроническая интоксикация динилом, по-видимому, характеризуется преобладанием процессов торможения на уровне ЦНС [9]. Нами в исследованных отделах мозга отмечено увеличение концентрации серотонина (стриатум), а также снижение уровней аспарагина (стриатум, гипоталамус) и тирозина (средний мозг). Очевидно, падение концентрации тирозина и отсутствие изменений концент-

Таблица 2 - Содержание нейроактивных аминокислот и биогенных аминов в стриатуме крыс при введении динила и талерина, нмоль/г (представлены только достоверные изменения)

Показатели	Контроль	Динил	Динил+талерин
Стриатум			
Цистеиновая кислота	5,9±0,96	11,4±3,47	32,4±4,4*+
Аспаргат	376±13	525±140	1239±61*+
Глутамат	3883±204	4980±892	10157±426*+
Аспарагин	43,2±4,32	27,3±4,90*	158±5,83*+
Глутамин	765±73	869±81	1527±86*+
Гистидин	3,9±1,19	18,9±9,47	76±3,74*+
Треонин	94±19	217±58	802±43*+
Фосфозаноламин	383±80	480±122	1324±68*+
Аргинин	80±3,5	83±5,8	121±5,0*+
Гомованилиновая кислота	2,9±0,26	2,3±0,24	2,2±0,23*+
Серотонин	1,75±0,17	2,62±0,35*	2,09±0,17
Средний мозг			
Аспарагин	131±6	117±5	112±4*+
Глутамин	717±85	612±49	487±24*+
Аланин	413±15	405±18	480±17*+
Тирозин	69±4	51±7*	67±4
Адреналин	0,57±0,104	0,79±0,042	0,54±0,005+
5-гидрокситриптофан	2,2±1,01	0,19±0,007	0,17±0,006+
Диоксифенилуксусная кислота	3,35±0,359	2,40±0,276	2,46±0,22*
Дофамин	1,2±0,20	2,1±0,39	1,0±0,19+
Гомованилиновая кислота	2,7±0,47	2,1±0,14	3,0±0,30+
Гипоталамус			
Цистеиновая кислота	19,6±0,94	31,5±3,27	29,1±2,67*
Аспарагин	143±3	120±8*	86±5*+
Глутамин	1768±137	1629±157	991±95*+
Гистидин	51±3	58±2,8	64±2,9*+
Глицин	728±39	679±26	609±25*+
Треонин	746±45	719±45	595±24*+
Фосфозаноламин	1321±54	1467±46	1653±52*+
Аргинин	118±4	112±4	100±4*+
β-аланин	56±3	61±5	42±3*+
5-гидрокситриптофан	0,26±0,023	0,22±0,014	0,20±0,011*+

Условные обозначения: p<0,05 при сравнении с группами:

* - контроль, + - динил

раций его метаболитов является следствием снижения интенсивности общего синтеза катехоламинов [10].

Между тем, введение талерина на фоне интоксикации динилом привело к выраженным сдвигам в содержании и взаимоотношениях между собой нейроактивных соединений в исследованных отделах мозга. Так, в стриатуме животных, получавших дополнительно динил, отмечена нормализация уровня триптофана. Значительно выше контрольных значений, а также по сравнению с группой животных, получавших только динил, были концентрации возбуждающих аминокислот аспартата, глутамата, аспарагина и глутамина (см. табл. 2). Резко увеличивалось в стриатуме содержание аминокислот гистидина, треонина и донора оксида азота – аргинина. Более чем в 2 раза возрастало содержание структурного компонента фосфолипидов плазматических мембран – фосфозаноламина. Вероятно, снижалась интенсивность обмена катехоламинов, поскольку одновременно достоверно уменьшался уровень одного из конечных метаболитов тирозина – гомованилиновой кислоты.

В среднем мозге наблюдалась несколько иная

ситуация: курсовое введение талерина достоверно снижало концентрацию аспарагина и глутамина. При этом регистрировали увеличение количества аланина, основной глюконеогенной аминокислоты. Интересным представляется воздействие талерина на обмен ароматических аминокислот и, соответственно, катехоламинов в среднем мозге. Так, если содержание тирозина нормализовалось, то это сопровождалось одновременным повышением концентрации одного из конечных метаболитов – гомованилиновой кислоты. Поскольку при этом уменьшались концентрации дофамина и диоксифенилуксусной кислоты, то можно предположить активацию обмена катехоламинов (см. табл.2) [13].

В гипоталамусе животных, которым вводили талерин, как это наблюдалось и в стриатуме, резко возрастало количество цистеиновой кислоты. Это, возможно, благоприятно отражается на антиоксидантном статусе клеток в этих отделах мозга, вследствие повышения антиоксидантного потенциала. Как и в среднем мозге, после введения талерина регистрировали падение содержания аспарагина и глутамина, в то время как количество гистидина несколько увеличивалось. Снижалось содержание в-аланина и аргинина, а также уровень тормозной нейромедиаторной аминокислоты – глицина. Достоверно уменьшалось количество одного из метаболитов серотонинового пути – 5-гидрокситриптофана. Наблюдаемое на фоне этих сдвигов увеличение концентрации фосфоэтанолamina предполагает оптимизирующее действие талерина на синтетические процессы в клетках, способствующие образованию фосфолипидов [7].

Таким образом, курсовое введение талерина животным, подвергнутым хронической интоксикации динилом:

- оказывает существенное воздействие на обмен веществ как в периферических тканях, так и в клетках центральной нервной системы, одним из механизмов которого может быть активация возбуждающих рецепторов на дофаминергических нейронах в мозге крыс [14].

- важным моментом в эффектах талерина является нормализация обмена нейроактивных аминокислот и их производных;

- оптимизация в условиях интоксикации динилом процессов биосинтеза белка и фосфолипидов;

- введение талерина уменьшает на уровне отделов ЦНС образование тормозных нейротрансмиттерных аминокислот (глицин) и нейромедиаторов (серотонин), что позволяет в большей мере

реализовать влияние возбуждающих нейротрансмиттерных аминокислот и активировать путь обмена катехоламинов. Следовательно, эффект талерина, в целом, следует рассматривать как протекторный, что позволяет с оптимизмом смотреть на перспективность будущих исследований биологической активности данной композиции.

Литература

1. Бенсон, Дж. В. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Дж. В. Бенсон, Дж. А. Паттерсон. – Москва, 1974. – С. 16-64.
2. Березин, В.И. Некоторые вопросы гигиены труда при работе с динилом и малениновым ангидридом / В.И. Березин // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1968. – № 11. – С. 38-39.
3. Громова, О.А. Элементарные основы молекулярной фармакологии нейротрофиков природного происхождения. Микроэлементы как компонент нейропротекторных лигандов / О.А. Громова // Вести НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2006. – № 2. – С. 113-117.
4. Дубовик, Б.В. Задачи по разработке отечественных препаратов на основе высокоочищенных L-аминокислот / Б.В. Дубовик // Актуальные проблемы белорусской фармакологии. – Минск, 2002. – С.9.
5. Капустина, А.Н. Два случая острой интоксикации динилом / А.Н. Капустина // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1983. – № 3. – С. 50-51.
6. Нефедов, Л.И. Механизмы регуляторных эффектов и стратегия использования аминокислот и их производных в качестве эффективных средств метаболической терапии и новых лекарственных препаратов / Л.И. Нефедов // Клинико-лабораторные аспекты метаболической терапии. – Витебск, 1999. – С. 16-19.
7. Островский, Ю.М., Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю.М. Островский, С.Ю. Островский. – Минск, 1995. – 280 с.
8. Эффекты аминокислотных композиций на спектр нейроактивных аминокислот в мозге крыс при хронической алкогольной интоксикации / Дорошенко Е.М. [и др.] // Журнал ГрГМУ – 2007. - №1. – С. 129-135.
9. Kimelberg, H.K. Swelling-activated release of excitatory amino acids in the brain: relevance for pathophysiology / H.K. Kimelberg, A.A. Mongin // Contrib. Nephrol. – 1998. – V. 123. – P. 240-257.
10. Kravitz, H. Dietary supplements of phenylalanine and other amino acid precursors of brain neuroamines in treatment of depressive disorders / H. Kravitz, H. Sabelli, J. Fawcett // J.Am.Osteopath.Assoc. – 1984. – V. 84, № 1 Suppl. – P. 119-123.
11. Protective effect of taurine against free radicals damage in rat myocardium / J. Hanna [et al.] // Exp. Toxicol. Pathol. – 2004. – V. 56, № 3. – P. 189-194.
12. Regulation of taurine transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor- α , taurine and hypertonicity / Y. Kang [et al.] // J. Neurochem. – 2002. – V. 83. – P. 1188-1195.
13. Taurine inhibition of metal-stimulated catecholamine oxidation / R. Dawson [et al.] // Neurotox. Res. – 2000. – V. 2, № 1. – P. 1-15.
14. Wang, F. Taurine activates excitatory non-synaptic glycine receptors on dopamine neurons in ventral tegmental area of young rats / F. Wang, C. Xiao, J. Ye // J.Physiol. – 2005. – V. 565. – Pt. 2. – P. 503-516.

Поступила 09.11.07