

УДК 616.36-092.9:615.212

КОМПОЗИЦИЯ, СОСТОЯЩАЯ ИЗ ЛЕЙЦИНА И ЦИНКА СУЛЬФАТА, УМЕНЬШАЕТ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ, ВЫЗВАННЫЕ ВВЕДЕНИЕМ АЦЕТАМИНОФЕНА

В.М. Шейбак, В.Ю. Смирнов, Р.И. Кравчук, М.В. Горецкая

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Композиция, состоящая из лейцина и цинка сульфата в дозах 100 и 25 мг/кг массы, соответственно, обладает гепатопротекторным действием, препятствуя нарушениям ультраструктуры ткани печени и нарушениям в метаболизме свободных аминокислот, вызываемым токсической дозой ацетаминофена.

Ключевые слова: ацетаминофен, лейцин, цинка сульфат, печень, морфология, аминокислоты.

Composition of leucine and zinc sulphate (100 and 25 mg/kg, respectively) has a hepatoprotective effect, preventing the ultrastructural injuries in hepatic tissue and disorders in free amino acid metabolism induced by a toxic dose of acetaminophen.

Keywords: acetaminophen, leucine, zinc sulphate, liver, morphology, amino acids.

Введение

До недавнего времени парацетамол считался безопасным лекарственным препаратом, отличающимся малым количеством и редкой частотой развития нежелательных реакций [6]. Несмотря на то, что гепатотоксичность этого соединения проявляется при передозировке, описаны случаи поражения печени и при употреблении терапевтических доз [6, 8, 10, 13]. Лечение токсического поражения печени, как правило, предусматривает восстановление нарушенного гомеостаза глутатиона серусодержащими аминокислотами или их производными [11, 14]. Вместе с тем, изучение возможности снижения токсичности ацетаминофена, введением соединений природного происхождения, включая микроэлементы, обладающих широким спектром биологической активности, также представляется перспективным.

Пул свободных аминокислот является интегральным показателем изменений обмена веществ, охватывающим практически все метаболические пути, что позволяет использовать его не только для получения информации об общей направленности метаболических процессов, но и для определения эффективности коррекции возникающих нарушений [2, 3, 4].

Целью работы было исследование возможности коррекции метаболических нарушений, вызываемых ацетаминофеном, путем введения животным лейцина или композиции, состоящей из аминокислоты лейцина и цинка сульфата.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 40 белых крысах-самках породы Вистар массой 170-200 г. Ацетаминофен вводили в желудок в виде взвеси в 2% слизи крахмала 1 раз в день ежедневно в течение 5 дней в дозе 750 мг/кг массы тела. Лейцин аналогичным образом вводили в дозе 100 мг/кг массы и композицию, состоящую из лейцина и цинка сульфата соответственно в дозах 100 и 25 мг/кг массы [5], через 30 мин после введения ацетаминофена. Через 24 ч после последнего введения ацетамино-

фена животных декапитировали. Электронно-микроскопическое изучение проводили в образцах печени от трех особей из каждой экспериментальной группы животных, фиксированных 1% раствором четырехоксида осмия на 0.1 М буфере Миллона, pH 7.4 при +4°C в течение 2 часов. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали в смесь эпон – аралдит. Из полученных блоков на ультрамикротоме MT-7000 ULTRA (USA) готовили полутонкие срезы, которые окрашивали метиленовым синим. Препараты просматривали в световом микроскопе и выбирали участок для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений (для соблюдения стандартности при окончательной заточке образца печени отбирали однотипные участки печеночной дольки). Затем изготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали 2%-ым раствором уранилацетата на 50% метаноле и цитратом свинца. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-100 CX (Япония) при увеличениях x7000 – 24000. В депротенинизированных 0,2н хлорной кислотой образцах плазмы крови определяли содержание свободных аминокислот на автоматическом анализаторе аминокислот Т339М (Чехия). Математическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерных программ из пакета «Statistica».

Результаты и обсуждение

В гепатоцитах всех зон долек печени животных, которым вводили ацетаминофен, происходит усиление активности ядерного аппарата (увеличение размеров ядер, а также размера и количества ядерышек, часто тесно контактирующих с кариолеммой и содержащих преимущественно гранулярный компонент) (рисунок 2) по сравнению с гепатоцитами контрольных животных (рисунок 1). Отмечали гетерогенность гепатоцитов и резко выраженный полиморфизм митохондрий (рисунок 3). В цитоплазме гепатоцитов перипортальной и интермедиальной зон долек наблюдалась умеренно развитая гранулярная эндоплазматическая сеть, с цис-

тернами которой ассоциировались многочисленные рибосомы. Обнаруживалось множество свободных рибосом. В целом, данные ультраструктурные изменения свидетельствуют об усилении биосинтеза белка, как для нужд своих клеток, так и на экспорт [1, 7]. При одновременном введении ацетаминофена и лейцина наблюдали выраженные ультраструктурные изменения в ткани печени как со стороны гепатоцитов, так и микрососудистого русла: конденсацию хроматина в ядрах и их фрагментацию, гиперплазию митохондрий (сопровождаемую набуханием матрикса, атипизмом крист) (рисунок 4), изменение формы и наружных контуров органелл (рисунок 5), утолщение мембран латеральных поверхностей гепатоцитов, гипертрофию желчных капилляров.

На сосудистом полюсе гепатоцитов имел место локальный отек, деструктивные изменения эндотелиальных клеток, активация макрофагов (рисунок 6).

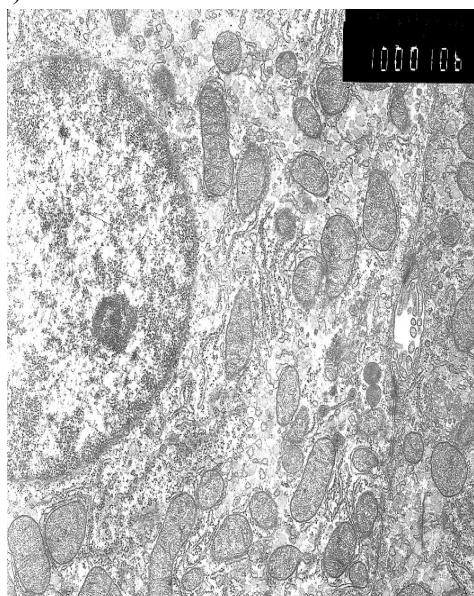


Рисунок 1. Фрагмент гепатоцита контрольных животных

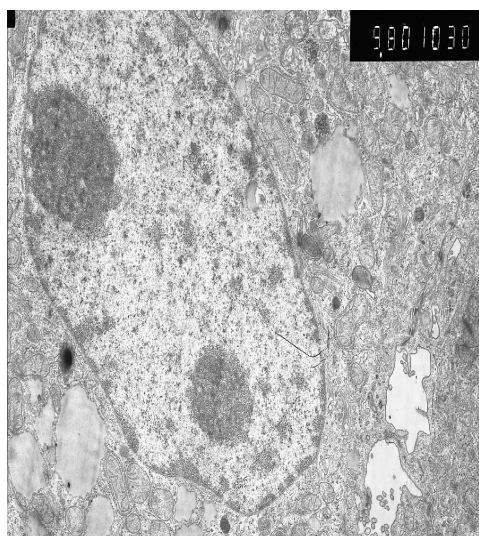


Рисунок 2. Активация ядерного аппарата гепатоцита при введении ацетаминофена в дозе 750 мг/кг

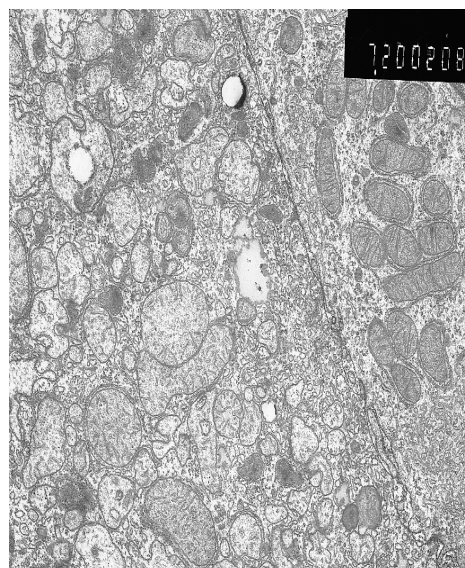


Рисунок 3. Гетерогенность гепатоцитов, резко выраженный полиморфизм митохондрий при введении ацетаминофена в дозе 750 мг/кг.

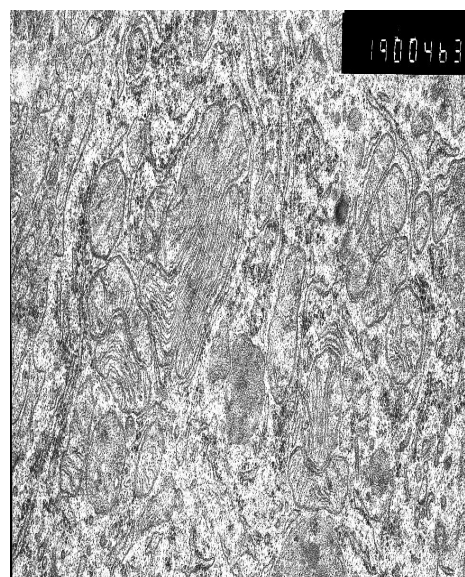


Рисунок 4. Гипертрофированные, атипичные митохондрии с многочисленными удлиненными кристами при введении с ацетаминофеном лейцина

Одновременное введение ацетаминофена и композиции, содержащей лейцин и цинка сульфат (рисунок 7), нивелирует деструктивные изменения, наблюдаемых в других опытных группах, получавших ацетаминофен.

Одной из интегральных характеристик состояния метаболизма является пул свободных аминокислот, образование которого есть отражение совокупности анаболических и катаболических процессов. Курсовое введение ацетаминофена вызывает достоверное снижение пула свободных аминокислот в плазме крови (3327 ± 169 мкмоль/л против 3912 ± 119 мкмоль/л в контрольной группе) что, вероятно, обусловлено усилением их утилизации. Одновременное введение ацетаминофена и аминокислоты лейцин общее содержание аминокислот несколько повышается (3765 ± 143 мкмоль/л),

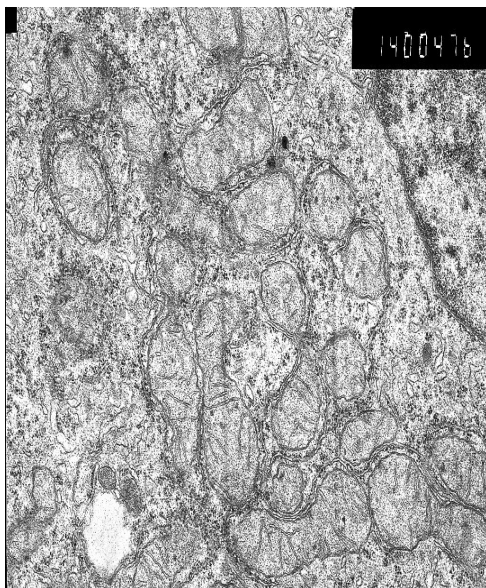


Рисунок 5. Волнистые очертания наружных мембран митохондрий при введении совместно ацетаминофена и лейцина

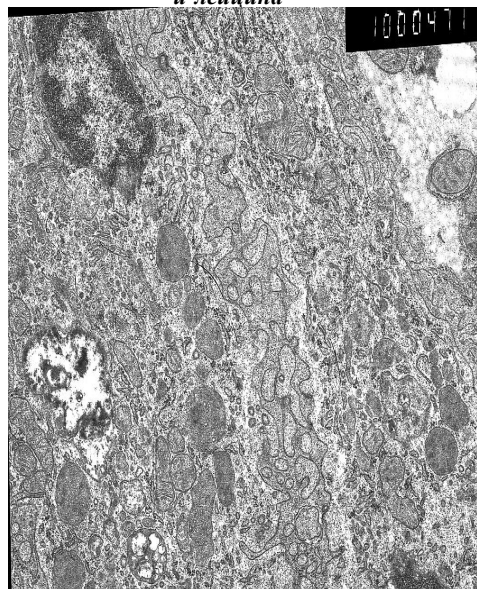


Рисунок 6. Отек и фрагментация эндотелиальных клеток, активация макрофагов митохондрий при введении ацетаминофена и лейцина

тогда как при введении ацетаминофена и композиции, содержащей лейцин и цинка сульфат пул аминокислот не отличается от контрольных значений (3913 ± 113 мкмоль/л). Следует отметить отсутствие преобладания катаболизма мышечных белков при введении ацетаминофена (отношение суммарных концентраций заменимых аминокислот к незаменимым аминокислотам - ЗА/НА - практически не изменялось). Так, в контрольной группе ЗА/НА составило $1,74 \pm 0,025$, а в группе, получавшей ацетаминофен – $1,77 \pm 0,07$. Следует отметить, что при одновременном введении с ацетаминофеном лейцина, а также композиции наблюдается тенденция к повышению этого соотношения ЗА/НА ($1,84 \pm 0,134$ и $1,87 \pm 0,132$, соответственно). Соотношение аминокислот с разветвленной углеродной цепью к ароматическим аминокислотам

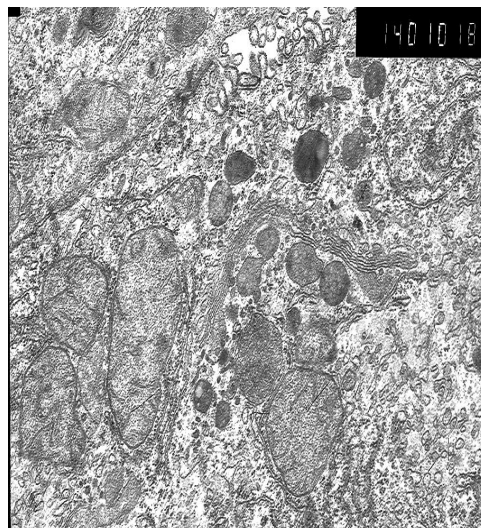


Рисунок 7. Ламеллярные компоненты комплекса Гольджи при введении с ацетаминофеном композиции (лейцин+цинка сульфат)

(АРУЦ/ААК) оставалось без изменений. В контрольной группе оно составило $3,31 \pm 0,063$, а при введении ацетаминофена – $3,63 \pm 0,289$. При совместном введении с ацетаминофеном лейцина или композиции обнаруживалось незначительное снижение соотношения АРУЦ/ААК ($3,15 \pm 0,149$ и $3,16 \pm 0,164$ соответственно).

Анализ изменений концентраций отдельных аминокислот показал, что в группе животных, получавших ацетаминофен, усиливалось связывание аммиака и образование глутамина, что подтверждается достоверным снижением соотношения глутамат/глутамин $0,13 \pm 0,011$ по сравнению с контрольными значениями ($0,16 \pm 0,017$). В группе, получавшей лейцин, данный показатель практически не отличался от контроля – $0,16 \pm 0,009$. Тогда как при введении композиции наблюдали тенденцию к снижению этого соотношения – $0,14 \pm 0,013$. Отношение фенилаланина к тирозину, отражающее степень активности реакций гидроксирования ароматических аминокислот и, соответственно, функцию печени, фактически не изменилось в группе, получавшей ацетаминофен ($0,82 \pm 0,095$), хотя и имело некоторую тенденцию к снижению по сравнению с контрольной группой ($0,84 \pm 0,064$). Совместное введение с ацетаминофеном лейцина привело к увеличению данного показателя на 12% ($0,94 \pm 0,087$), а композиции – на 16% ($0,97 \pm 0,112$). Таким образом, исследуемые препараты несколько тормозят активность гидроксирования фенилаланина, хотя это и не достигает степени достоверности.

Вызванное ацетаминофеном уменьшение в плазме крови уровней метионина (на 22%), лизина (на 16%) и тирозина (на 18%) (таблица 1), вероятно, отражает повышенное использование аминокислот в тканях и активацию процессов биосинтеза белка.

Анализируя изменения в пуле свободных аминокислот, следует заметить, что одной из причин

Таблица 1. Концентрация свободных аминокислот в плазме крови крыс при введении лейцина и его композиции с сульфатом цинка на фоне интоксикации ацетаминофеном

Аминокислоты	контроль	ацетаминофен	ацетаминофен + лейцин	ацетаминофен + композиция
Таурин	302,5 ± 13,8	230,5 ± 17,5*	229,4 ± 21,8*	225,5 ± 24,0*
Аспаргат	68,9 ± 12,9	89,5 ± 25,3	42,80 ± 2,31	46,64 ± 3,77
Треонин	336,3 ± 25,5	273,9 ± 26,7	319,5 ± 30,9	338,8 ± 37,4
Серин	284,5 ± 13,1	296,8 ± 20,3	317,8 ± 28,2	328,1 ± 18,4
Глутамат	130,21 ± 8,90	93,1 ± 10,1*	128,37 ± 6,02†	117,7 ± 11,6
Глутамин	817,7 ± 35,4	706,2 ± 51,5	816,8 ± 38,3с	867,2 ± 26,2†
Пролин	382,9 ± 60,4	272,6 ± 27,8	393,2 ± 28,8†	459,0 ± 64,5†
Глицин	238,6 ± 11,0	178,6 ± 16,1*	173,1 ± 24,6*	194,4 ± 19,9
Аланин	255,12 ± 6,54	240,9 ± 19,4	292,2 ± 17,7*	250,6 ± 13,8
α-аминоасляная кислота	24,14 ± 3,16	17,03 ± 1,27	19,78 ± 2,82	31,7 ± 10,5
Валин	177,75 ± 6,96	158,70 ± 7,33	179,8 ± 13,2	169,15 ± 5,62
Метионин	53,12 ± 2,57	41,47 ± 2,12*	55,82 ± 2,04†	46,16 ± 3,35
Изолейцин	82,79 ± 3,34	71,05 ± 4,67	80,78 ± 6,62	81,97 ± 4,47
Лейцин	136,20 ± 5,69	117,33 ± 6,68	132,0 ± 10,2	143,34 ± 5,86†
Тирозин	65,38 ± 2,28	53,87 ± 3,41*	65,27 ± 5,48	64,54 ± 4,90
Фенилаланин	55,21 ± 4,65	43,37 ± 4,42	59,51 ± 3,58†	61,55 ± 4,98†
Этанолламин	6,873 ± 0,943	9,68 ± 1,60	11,04 ± 4,62	7,652 ± 0,794
Орнитин	49,24 ± 5,83	52,9 ± 12,6	48,29 ± 3,59	69,5 ± 16,4
Лизин	381,2 ± 14,4	319,5 ± 17,8*	341,5 ± 29,3	341,7 ± 12,0
Гистидин	70,09 ± 1,95	69,83 ± 3,96	69,7 ± 11,0	75,40 ± 3,80

Примечание: p < 0,05 по отношению к * - Контроль, † - Парацетамол

снижения концентрации глицина может быть усиленное использование его в процессах детоксикации в печени [9, 15]. Уменьшение уровня метионина является, вероятно, причиной снижения концентрации его метаболита – таурина на 24% (таблица 1) и, возможно, связано усилением его утилизации в реакциях конъюгации желчных кислот [3, 12]. У животных одновременно получавших ацетаминофен и лейцин (таблица 1), обнаруживалось снижение уровней только двух аминокислот – глицина и таурина. Одновременно в плазме крови увеличивалось содержание основной глюконеогенной аминокислоты, аланина. Введение композиции, содержащей лейцин и цинка сульфат на фоне интоксикации ацетаминофеном фактически нивелировало биохимические изменения, вызываемые введением ацетаминофена (таблица 1). Отмечалось снижение концентрации только таурина.

Несмотря на в целом положительное действие лейцина и исследуемой композиции, следует отметить, что анализ характера взаимосвязей аминокислот с разветвленной углеводородной цепью показал, что положительная корреляционная связь между лейцином, с одной стороны, и валином и изолейцином – с другой, отсутствовала при введении композиции из лейцина и сульфата цинка и не изменялась при введении одного лейцина. Это может свидетельствовать о различном характере механизма действия поступающего экзогенно лейцина и модулирующем действии сульфата цинка.

Для интегральной оценки влияния вводимых соединений композиций на фонд свободных аминокислот в плазме крови был проведен дискриминантный анализ. По значению показателя лямбды Вилкса (0,0445) можно судить о достаточно хорошей дискриминации, а на основании классификационной матрицы можно сделать вывод о 100% корректности обучающих выборок для всех групп. Из проекции на пространстве показателей на плоскость двух главных компонент выявлено, что положение изучаемых показателей при интоксикации ацетаминофеном, а также при введении крысам на этом фоне как лейцина, так и композиции значи-

тельно отличался от положения показателей контрольных животных, причем расстояние между центрами контрольной и «опытной» групп было больше, чем между центрами контрольной группы и группами с введением испытуемых соединений. Относительно первого главного компонента группы, получавшие лейцин или композицию не отличались друг от друга, а относительно второго компонента наблюдалось различие между этими группами. Расчеты доказывают на-

личие нормализующего эффекта в случае введения лейцина и, особенно, при его сочетании с цинка сульфатом, однако механизм данного гепатопротекторного эффекта различен.

Таким образом, на фоне интоксикации ацетаминофеном композиция лейцина и цинка сульфата обладает гепатопротекторным действием, препятствуя нарушениям ультраструктуры ткани печени и аминокислотному дисбалансу в плазме крови.

Литература

1. Р.И. Кравчук, М.В.Горещкая, В.М. Шейбак, М.И. Бушма. Изменения ультраструктуры печени при интоксикации парацетамолом. // Журнал ГМУ.- 2005, №1. - С. 48-52.
2. Л.И. Нефёдов. Результаты и перспективы применения аминокислот и их производных в качестве универсальных природных регуляторов обмена веществ и новых лекарственных препаратов. // Мед. Новости. – 2000, № 7. – С. 9-13.
3. В.М. Шейбак. Обмен свободных аминокислот и КоА при алкогольной интоксикации. - Гродно. - 1998.
4. В.М. Шейбак. Регуляция и патофизиологическое значение метаболизма аминокислот с разветвленной углеводородной цепью // Здоровоохранение.- 1999, № 6. – С. 27-29.
5. В.М. Шейбак, М.В. Горещкая, В.Ю. Смирнов, Р.Е. Лис. Композиция для коррекции нарушений функции печени. //Заявка на патент РБ № а 20050524. - 2005.
6. Е.А. Ушкалова. Безопасность анальгетиков у детей// Педиатрия. -2004, №5. - С. 88-93.
7. F. Burdan, Z. Siezienievska, Z. Urbanowicz. Combined effects of acetaminophen, isopropylantipyrene and caffeine on pregnant and nonpregnant liver // Hum-Exp-Toxicol. Nov. - 2001, V 20. - №11. – P. 569-575.
8. J.G. Bessems, N.P. Vermeulen. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. // Crit-Rev-Toxicol. Jan. – 2001, V 31. - №1. - P. 55-138.
9. H. Jaeschke, G.J. Gores., A.I. Cederbaum and all. Mechanisms of hepatotoxicity. // Toxicol-SciFeb. – 2002, V 65. - № 2. – P. 166-176.
10. L.P. James, E. Wells, R.H. Beard, H.C. Farrar. Predictors of outcome after acetaminophen poisoning in children and adolescents. //J-Pediatr, May. – 2002, V 140. - № 5. - P. 522-526.
11. B.H. Lauterburg. Analgesics and glutathione. // Am-J-Ther, May-Jun. – 2002, V 9. - № 3. - P. 225-233.
12. R. Lourenco, M. Camili, Taurine: conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. // Nutr. Hosp. – 2002, V.17. - № 6. - P. 262-270.
13. B.H. Rumack, Acetaminophen hepatotoxicity: the first 35 years. // J-Toxicol-Clin-Toxicol. 2002, V 40. - № 1. - P. 3-20.
14. F.N. Shiota, E.G. DeMaster, D.W. Shoeman, H.T. Nagasawa. Acetaminophen-induced suppression of hepatic AdoMet synthetase activity is attenuated by prodrugs of L-cysteine. // Toxicol-Lett. Jun 7. 2002, V 132. - № 1. - P. 1-8.
15. S. Vitols, Paracetamol hepatotoxicity at therapeutic doses. // J-Intern-Med. Feb. 2003, V 253. - № 2. - P. 95-98.

Поступила 31.01.06