

СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ТРИТАРГА

Шейбак В. М. (*vsheibak@gmail.com*), Павлюковец А. Ю. (*anastasiayk@mail.ru*),
Смирнов В. Ю. (*vit_sm@mail.ru*), Жмакин А. И. (*andrewzhmakin@gmail.com*)
УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Известно, что введение минизолей в организм вызывает специфические эффекты, во многом определяемые составом и дозами входящих в них компонентов. Аминозоль тритарг, содержащий аргинин, таурин, триптофан и цинка аспартат, оказывает комплексное воздействие на метаболические процессы вследствие сочетанных эффектов входящих в него соединений.

Целью работы стал сравнительный анализ динамики пула свободных аминокислот в ткани печени крыс после введения аминокзоля Тритарг.

Материал и методы. Эксперимент проведен на 30 белых беспородных крысах-самках массой 120-140 г, которым ежедневно внутрижелудочно вводили тритарг (таурин, аргинин, триптофан, цинка аспартат) в дозе 350 мг/кг массы. Декапитацию животных осуществляли через 24 ч после 3, 7 или 10-кратного введения тритарга. Для анализа использовали ткань печени. Определение свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ.

Результаты. Через сутки после 7-кратного введения тритарга (период его максимального эффекта) в ткани печени увеличивались общее количество протейногенных и заменимых аминокислот, сумма глутамат+глутамин (снижено соотношение глутамат/глутамин). Снижалось содержание азотсодержащих метаболитов аминокислот – α -аминоадипиновой кислоты (на 34%), β -аланина (на 31%), цитруллин (на 27%), 3-метилгистидина (на 30%) и α -аминомасляной кислоты (на 30%).

Выводы. Таким образом, регистрируемая общая направленность метаболических потоков после 3- и 7-кратного введения аминокзоля носит в большей степени анаболический характер, при этом 10-кратное введение аминокзоля приводит к насыщению транспортных потоков и формированию аминокислотного дисбаланса, стимулирующего катаболизм (окисление) избытка азотсодержащих метаболитов.

Ключевые слова: печень, аргинин, триптофан, таурин, цинка аспартат.

Известно, что введение минизолей в организм вызывает специфические эффекты, во многом определяемые составом и дозами входящих в них компонентов [1]. Аминозоль тритарг, содержащий L-аргинин, L-таурин, L-триптофан и цинка аспартат, оказывает комплексное воздействие на метаболические процессы вследствие аддитивных эффектов входящих в него соединений. Известно, что основные метаболические эффекты аргинина реализуются в форме стимуляции регенерации печени у крыс [2, 3]. В условиях ишемически-реперфузионного поражения печени показан протекторный эффект инфузии аминокзоля, содержащего аргинин и цитруллин [4]. Принято считать, что цитопротекторный эффект аргинина связан с синтезом вазодилатора и сигнальной молекулы оксида азота (NO) [5, 6].

Известно, что снижение концентрации таурина в печени повышает чувствительность органа к гепатотропным ядам, а его дополнительное введение снижает степень поражения печеночной ткани [7]. Так, даже однократное введение таурина уменьшает поражение печени, вызываемое ацетаминофеном [8].

Незаменимая аминокислота триптофан – предшественник ряда биологически активных соединений: никотиновой кислоты, кинуренинов, серотонина, некоторых алкалоидов [9]. Дефицит триптофана в рационе является причиной нарушения синтеза белков, снижения содержания серотонина в головном мозге и других тканях. Курсовое введение триптофана в дозе 100 мг/кг

на фоне хронической алкогольной интоксикации способно частично корригировать аминокислотный дисбаланс в плазме крови и печени [10].

Таким образом, в основу создания композиции был положен набор эндогенных метаболитов (аминокислот), дополненный одним из важнейших для организма млекопитающих микроэлементом (цинк), который входит в состав более чем 300 ферментов всех 6 классов и огромного числа факторов транскрипции и цинк-фингерных белков [11]. В настоящее время Zn^{2+} , наряду с Ca^{2+} , считается основной сигнальной молекулой межклеточной и внутриклеточной коммуникации. Дополнительное введение цинка или его дефицит оказывает разнонаправленное влияние на геном на уровне эпигенетической регуляции и воздействует на ключевые параметры быстро пролиферирующих клеток [12].

Ранее нами было показано, что в лимфоцитах, выделенных из крови, печени, тимуса, однократное введение тритарга вызывает однотипные эффекты. Одновременно в лимфоцитах селезенки после введения тритарга повышение фонда свободных аминокислот сохраняется более длительно, что, вероятно, обусловлено выполняемой ими специфической функцией синтеза иммуноглобулинов. Таким образом, вероятно, что аминокзоль обладает органоспецифическим действием [13].

Целью работы стал сравнительный анализ динамики пула свободных аминокислот в ткани печени крыс после введения аминокзоля тритарг.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 30 белых беспородных крысах-самках массой 120-140 г при свободном доступе животных к корму и воде. Животных разделили на 4 группы: 1 – контрольная группа – внутривенно вводили физраствор, животным в группах 2, 3, 4 ежедневно внутривенно вводили тритарг в дозе 350 мг/кг массы. Декапитацию животных осуществляли через 24 ч после 3, 7 или 10-кратного введения тритарга. Для анализа использовали ткань печени. Все манипуляции проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета. Определение содержания свободных аминокислот в ткани печени производили методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Определение концентраций ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) производили методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм – для триптофана). Все определения вели с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработку данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Математическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 6.0. Характеристика изучаемых показателей выполнялась с помощью параметрической статистики (t-критерий Стьюдента для независимых выборок). Правомомерность использования t-теста Стьюдента проверялась с помощью критериев применения параметрической статистики с использованием теста Холмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса для выборок с заранее неизвестными дисперсиями при условии нормальности распределения. Для интегральной оценки метаболических эффектов вводимых соединений на фонд аминокислот выполнен дискриминантный анализ, вычислены лямбда Вилкса и уровень статистической значимости значения, построен график проекции показателей на плоскость двух главных компонент.

Результаты и обсуждение

Для комплексной оценки и анализа особенностей формирования пула свободных аминокислот в ткани печени нами проведен дискриминантный анализ. В результате проведенного дискриминантного анализа с пошаговым включением переменных выявлено, что максимальный вклад в разделение групп вносят следующие аминокислоты: β -аланин ($F=4,02$), фосфоэтанолламин ($F=4,76$), аланин ($F=5,31$), аспарат ($F=5,32$), глутамин ($F=5,84$), аспарагин ($F=5,87$), гистидин ($F=7,02$), фенилаланин ($F=10,11$), таурин ($F=12,18$) и глицин ($F=14,89$). По значению показателя лямбды Уилкса (0,0009264), значению $F=3,94$ и уровню $p<0,0001$ можно судить о

хорошей дискриминации, а на основании классификационной матрицы можно сделать вывод о 100% корректности обучающих выборок для всех групп. Средние значения квадратов расстояния Махаланобиса между опытными группами и контролем составляют: через 24 ч после 3-кратного введения тритарга – 102, 7-кратного – 158, и 10-кратного – 119. Таким образом, проведенные расчеты указывают на то, что введение аминокислот влияет на формирование внутрипеченочного пула свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов. При этом наиболее выраженные изменения пула азотсодержащих метаболитов наблюдаются после 7-кратного применения тритарга.

Изучение характеристик аминокислотного фонда и спектра отдельных аминокислот показывает, что через 24 ч после 3-кратного введения тритарга увеличивалось общее содержание протеиногенных аминокислот в ткани печени (табл. 1). Концентрации глутамина, незаменимых аминокислот гистидина и лизина повышались в 1,2 раза, так же как азотсодержащих метаболитов – фосфоэтанолламина (в 1,5 раза), этаноламина (в 1,3 раза), но одновременно снижались уровни α -аминоадипиновой кислоты (на 34%), β -аланина (на 26%) и 3-метилгистидина (на 36%) (табл. 2).

Через сутки после 7-кратного введения тритарга (период его максимального эффекта) в ткани печени увеличивалось общее количество протеиногенных и заменимых аминокислот, сумма глутамат+глутамин (снижено соотношение глутамат/глутамин) (табл. 1). Снижалось содержание азотсодержащих метаболитов аминокислот – α -аминоадипиновой кислоты (на 34%), β -аланина (на 31%), цитруллин (на 27%), 3-метилгистидина (на 30%) и α -аминомасляной кислоты (на 30%) (табл. 2).

Через 24 ч после 10-кратного введения тритарга в ткани печени регистрировали увеличение общего количества аминокислот и их азотсодержащих производных. Существенно увеличивалось как общее количество протеиногенных аминокислот, так сумма азотсодержащих производных аминокислот (табл. 1), что указывает на активацию их окисления. В ткани печени повышалось содержание заменимых аминокислот: глутамина (в 1,4 раза), глицина (в 1,2 раза), аргинина (в 1,6 раза), незаменимых – триптофана (в 2 раза), фенилаланина (в 1,3 раза), изолейцина (в 1,2 раза), концентрации азотсодержащих метаболитов аминокислот: цистеиновой кислоты (в 1,3 раза), таурина (в 1,4 раза) и этаноламина (в 1,6 раза) (табл. 1).

Выводы

Таким образом, анализ структуры пула свободных аминокислот в ткани печени через 24 ч после 3, 7 и 10-кратного введения тритарга свидетельствует о нижеследующем:

- регистрируемая общая направленность метаболических потоков после 3- и 7-кратного введения аминокислот носит в большей степени анаболический характер, о чем свидетельствуют специфические изменения аминокислотно-

Таблица 1. – Структура и индексы аминокислотного пула ткани печени после внутрижелудочного введения тритарга (350 мг/кг массы), нмоль/г, М±m

Исследуемый показатель	Контроль	Тритарг 3д 24	Тритарг 7д 24	Тритарг 10д 24
Общее количество аминокислот и их производных	19178±1079	21744±798	20464±1471	23864±641*
Общее количество протеиногенных аминокислот	12738±637	14477±328*	15195±719*	15287±286*
Общее количество заменимых аминокислот	10913±592	12356±240*	13220±665*	13098±277*
Общее количество незаменимых аминокислот	1825±69	2121±110*	1975±146	2189±198
Общее количество производных аминокислот	6440±740	7267±707	5270±1121	8577±574*
Протеиногенные/производные аминокислот	2,64±0,43	2,12±0,24	3,98±0,89	1,83±0,12
Заменимые/незаменимые аминокислоты	6,00±0,25	5,90±0,24	6,88±0,56	6,22±0,44
Общее количество аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ)	601±29	665±50	587±41	752±60
Общее количество серосодержащих аминокислот	5344±797	6017±724	4109±1109	7184±592
Глутамат+глутамин	6589±431	7911±175*	8660±510*	8432±370*
Глутамат/глутамин	0,27±0,018	0,25±0,033	0,22±0,011*	0,2±0,018*

Примечание: здесь и в таблице 2 * – статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Таблица 2. – Концентрации свободных аминокислот ткани печени после внутрижелудочного введения тритарга (350 мг/кг массы), нмоль/г, М±m

Исследуемый показатель	контроль	Тритарг 3д 24 ч	Тритарг 7д 24 ч	Тритарг 10д 24 ч
Цистеиновая кислота	10,8±0,69	14,3±1,95	11,9±0,15	13,8±0,65*
α -аминоадипиновая кислота	26,6±2,84	17,5±2,86*	17,3±2,21*	22,0±2,34
Глутамин	5212±381	6335±242*	7084±407*	7080±370*
Гистидин	374±15	456±19*	435±23	427±24
3-метилгистидин	80±7,8	51,2±4,35*	55,9±5,66*	65,3±6,20
Глицин	1189±32	1269±110	1112±59	1445±106*
Фосфоэтаноламин	223±23	334±35*	222±30	289±46
Цитруллин	12,8±0,74	14,4±2,98	9,4±0,87*	14,9±2,46
Аргинин	6,1±0,32	6,8±0,09	4,8±0,56	9,5±0,68*
β -аланин	150±8	111±4*	104±7*	165±27
Таурин	5071±658	5812±379	4024±1111	7092±595*
α -аминомасляная кислота	45,3±4,47	35,0±2,07	31,6±3,55*	43,1±6,69
Этаноламин	120±15	157±6*	161±23	196±28*
Триптофан	90±11,3	100±24	96,4±7,75	179±18*
Фенилаланин	67,1±4,05	80,9±6,20	69,2±5,20	84,1±3,41*
Изолейцин	160±5,7	179±10	162±10	194±12*
Лизин	676±38	788±30*	757,9±64,80	848,2±81,44

го фонда – увеличение суммарного количества протеиногенных аминокислот и одновременное снижение концентраций азотсодержащих метаболитов;

- анаболическую направленность метаболиз-

ма в печени подтверждает увеличение уровня глутаминна во все изучаемые сроки после введения тритарга, который является источником углерода и азота для синтеза различных субстратов и биорегуляторов, включая образование

аминосахаров, пуринов и пиримидинов (известно, что накопление глутамина гепатоцитами и миоцитами повышает их гидратацию и рассматривается как анаболический стимул пролиферации [14]);

- 10-кратное введение аминозоля, вероятно, приводит к насыщению транспортных потоков и формированию аминокислотного дисбаланса, стимулирующего катаболизм (окисление) избытка азотсодержащих метаболитов;

- уровни вводимых в составе тритарга аминокислот аргинина, таурина и триптофана статистически значимо повышались только через 10 дней после введения аминозоля, и это уве-

личение концентраций является следствием их избытка, вызванного ежедневным внутривенным введением;

- изменение направленности формирования структуры пула аминокислот ткани печени при 10-кратном введении тритарга очевидно при графическом представлении разделения изучаемых групп в пространстве первых двух канонических линейных дискриминантных функций - группы животных после 3- и 7-кратного введения существенно отличаются по своему метаболическому статусу;

- вопрос о целесообразности возможного применения тритарга более 10 дней остается открытым.

Литература

1. Appropriate protein and specific amino acid delivery can improve patient outcome: fact or fantasy? / C. M. Lawson [et al.] // *Curr. Gastroenterol. Rep.* – 2011. – Vol. 13, iss. 4. – P. 380-387. – doi: 10.1007/s11894-011-0201-0.
2. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu [et al.] // *Amino Acids.* – 2009. – Vol. 37, iss. 1. – P.153-168. – doi: 10.1007/s00726-008-0210-y.
3. Nitric oxide stimulates growth hormone secretion from human fetal pituitaries and cultured pituitary adenomas / T. Rubinek [et al.] // *Endocrine.* – 2005. – Vol. 28, iss. 2. – P. 209-216. – doi: 10.1385/ENDO:28:2:209.
4. The role of L-arginine in toxic liver failure: Interrelation of arginase, polyamine catabolic enzymes and nitric oxide synthase / R. Nikolic [et al.] // *Amino Acids.* – 2007. – Vol. 32, iss. 1. – P.127-131. – doi: 10.1007/s00726-006-0309-y.
5. Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity / J. D. Laskin [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2001. – Vol. 3, iss. 1. – P. 261-271. – doi: 10.1089/152308601300185214.
6. Шейбак, В. М. Аргинин и иммунная система – возможные механизмы взаимодействия / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // *Вестник Витебского государственного медицинского университета.* – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 6-13.
7. Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis / T. Miyazaki [et al.] // *J. Hepatol.* – 2005. – Vol. 43, iss. 1. – P. 117-125. – doi: 10.1016/j.jhep.2005.01.033.
8. Горещкая, М. В. Гепатопротекторные свойства таурина при интоксикации парацетамолом / М. В. Горещкая, В. М. Шейбак // *Вестні Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук.* – 2013. – № 3. – С. 97-103.
9. Sandyk, R. L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review / R. Sandyk // *Int. J. Neurosci.* – 1992. – Vol. 67, iss. 1-4. – P. 127-144.
10. Влияние смеси аминокислот с разветвленной углеводородной цепью, таурина и триптофана на структуру печени и фонд свободных аминокислот у крыс при субхронической алкогольной интоксикации и синдроме отмены этанола / Е. М. Дорошенко [и др.] // *Новости науки и техники. Серия: Медицина. Алкогольная болезнь.* – 2001. – № 12. – С. 4-10.
11. Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes / H. Haase [et al.] // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, iss. 9. – P. 6491-6502.

12. King, J. C. Zinc: An essential but elusive nutrient / J. C. King // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2011. – Vol. 94, iss. 2. – P. 679-684. – doi: 10.3945/ajcn.110.005744.

13. Шейбак, В. М. Некоторые итоги изучения биологической активности композиции тритарг / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // *Актуальные проблемы медицины : материалы ежегодной итоговой науч.-практ. конф., (25-26 января 2018 г.) / отв. ред. В. А. Снежицкий.* – Гродно : ГрГМУ, 2018. – С. 841-845.

14. Furst, P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition / P. Furst, K. Pogan, P. Stehle // *Nutrition.* – 1997. – Vol. 13, iss. 7-8. – P. 731-737.

References

1. Lawson CM, Miller KR, Smith VL, McClave SA. Appropriate protein and specific amino acid delivery can improve patient outcome: fact or fantasy? *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2011;13(4):380-387. doi: 10.1007/s11894-011-0201-0.
2. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.* 2009;37(1):153-168. doi: 10.1007/s00726-008-0210-y.
3. Rubinek T, Rubinfeld H, Hadani M, Barkai G, Shimon I. Nitric oxide stimulates growth hormone secretion from human fetal pituitaries and cultured pituitary adenomas. *Endocrine.* 2005;28(2):209-216. doi: 10.1385/ENDO:28:2:209.
4. Nikolic J, Stojanovic I, Pavlovic R, Sokolovic D, Bjelakovic G, Beninati S. The role of L-arginine in toxic liver failure: Interrelation of arginase, polyamine catabolic enzymes and nitric oxide synthase. *Amino Acids.* 2007;32(1):127-131. doi: 10.1007/s00726-006-0309-y.
5. Laskin JD, Heck DE, Gardner CR, Laskin DL. Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity. *Antioxid. Redox Signal.* 2001;3(2):261-271. doi: 10.1089/152308601300185214.
6. Sheibak VM, Pavliukovets AYU. Arginin i immunnaja sistema – vozmozhnye mehanizmy vzaimodejstvija. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Vestnik of Vitebsk State Medical University]. 2013;12(1):6-13. (Russian).
7. Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, Ikegami T, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B. Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J. Hepatol.* 2005;43(1):117-125. doi: 10.1016/j.jhep.2005.01.033.

8. Haretskaya MV, Sheibak VM. Hepatoprotekturnye svojstva taurina pri intoksikacii paracetamolom [Hepatoprotective properties of taurine during paracetamol intoxication]. *Vesci Nacyjanalnaj akademii navuk Belarusi. Seryja medycynskih navuk*. 2013;3:97-103. (Russian).
9. Sandyk R. L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review. *Int. J. Neurosci*. 1992;67(1-4):127-144.
10. Doroshenko EM, Nefedov LI, Smirnov VYu, Prokopchik NI, Razvodovsky YuE, Ostrovsky SYu. Vlijanie smesi aminokislot s razvetvlennoj uglevodorodnoj cepju, taurina i triptofana na strukturu pečeni i fond svobodnyh aminokislot u krysa pri subhronicheskoj alkoholnoj intoksikacii i sindrome otmeny jetanola. *Novosti nauki i tehniki. Serija: Medicina. Alkogolnaja bolezni*. 2001;12:4-10. (Russian).
11. Haase H, Ober-Blübaum JL, Engelhardt G, Hebel S, Heit A, Heine H, Rink L. Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J. Immunol*. 2008;181(9):6491-6502.
12. King JC. Zinc: An essential but elusive nutrient. *Am. J. Clin. Nutr*. 2011;94(2): 679-684. doi: 10.3945/ajcn.110.005744.
13. Sheibak VM, Pauliukavets AJu. Nekotorye itogi izucheniya biologicheskoj aktivnosti kompozicii tritarg. In: Snezhitskiy VA, executive editor. *Aktualnye problemy mediciny*. Materialy ezhegodnoj itogovoj nauchno-prakticheskoj konferencii; 2018 Jan. 25-26; Grodno. Grodno: GrGMU; 2018. p. 841-845. (Russian).
14. Furst P, Pogan K, Stehle P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. *Nutrition*. 1997;13(7-8):731-737.

FREE AMINO ACIDS IN LIVER TISSUE OF RATS AFTER ADMINISTRATION OF THE AMINOZOLE TRITARG

Sheybak V. M., Pauliukavets A. Yu., Smirnov V. Yu., Zhmakin A. I.
Educational Institution "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

It is known that the introduction of minizoles into the body causes specific effects that are largely determined by the composition and doses of their constituent components. The aminozole tritarg, containing arginine, taurine, tryptophan and zinc aspartate, has a complex effect on metabolic processes, due to the combined effects of its compounds.

The aim of the work was to perform a comparative analysis of the dynamics of the free amino acid pool in the liver tissue of rats after administration of the aminozole tritarg.

Material and methods. The experiment was carried out on white female rats weighing 120-140 g. Tritarg was administered intragastrically daily at a dose of 350 mg/kg of body mass. The animals were decapitated 24 hours after 3, 7 or 10-fold administration of tritarg. Liver tissue was used for the analysis. Free amino acids were determined by reversed-phase HPLC.

Results. One day after a 7-fold administration of tritarg (the period of its maximum effect), the total amount of proteinogenic and interchangeable amino acids, the amount of glutamate + glutamine (decreased ratio of glutamate/glutamine) in the liver tissue increased. The content of nitrogen-containing amino acid metabolites decreased: that of α -aminoadipic acid – by 34%, β -alanine – by 31%, citrulline – by 27%, 3-methylhistidine – by 30% and α -aminobutyric acid – by 30%.

Conclusions. Thus, the recorded common direction of metabolic fluxes after a 3 and 7-fold administration of aminozole is mostly of anabolic nature, while a 10-fold administration of the aminozole probably leads to the saturation of transport fluxes and formation of amino acid imbalance stimulating catabolism (oxidation) of the excess of nitrogen-containing metabolites.

Keywords: liver, arginine, tryptophan, taurine, zinc aspartate.

Поступила: 19.04.2018

Отрецензирована: 31.08.2018