

# ИЗМЕНЕНИЯ ПУЛА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КРЫС ПРИ ПРЕРЫВИСТОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В.В. Лелевич, Ю.А. Тарасов, С.В. Лелевич, В.Ю. Смирнов

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Проведено исследование пула свободных аминокислот в плазме крови и скелетных мышцах крыс при различных режимах алкоголизации. Прерывистая алкогольная интоксикация характеризовалась снижением ряда аминокислот в плазме крови и их дисбалансом в скелетных мышцах. Показано наличие общих закономерностей развития метаболических нарушений при поступлении этанола в организм.*

**Ключевые слова:** крысы, прерывистая алкогольная интоксикация, плазма крови, скелетные мышцы, свободные аминокислоты.

Алкогольная интоксикация приводит к поражению различных органов и систем. Регистрируются нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, головного мозга и периферической нервной системы [7]. Анализ клинического материала свидетельствует о значительной вариабельности биохимических изменений при синдроме мышечной слабости у лиц, злоупотребляющих алкоголем. При этом выделяют две основные формы поражения мышц, вызванные алкогольной интоксикацией: острую и хроническую алкогольную миопатию.

Острая алкогольная миопатия развивается в результате токсического действия алкоголя у 1-5% лиц и проявляется слабостью (преимущественно проксимальных групп мышц с резкой болезненностью и отеком), значительным повышением в крови активности креатинфосфокиназы (КФК) и миоглобинурией. При морфологическом исследовании выявляется некроз различных типов волокон скелетных мышц (рабдомиолиз), ассоциирующийся с высоким риском развития острой почечной недостаточности [3].

Хроническая алкогольная миопатия – часто встречающаяся (до 60%) клиническая форма и проявляющаяся слабостью мышц тазовой области, иногда плечевого пояса, затруднениями при ходьбе и болезненными судорогами мышц. Учитывая выраженный полиморфизм поражения скелетных мышц при различных формах алкоголизации, предложен собирательный термин – алкоголь-индуцированное поражение мышц (АИПМ), включающий в себя все клинические формы алкогольной миопатии, развивающиеся на фоне различных видов алкогольной интоксикации [16].

Однократное или хроническое поступление этанола в организм приводит к изменениям практически всех обменных процессов, в том числе и метаболизма аминокислот [6, 12]. Аминокислоты, являясь исходным материалом для биосинтеза белков и высокоактивных биологических соединений, играют также роль посредников, связывающих основные метаболические пути: гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, глюконеогенез. В некоторых метаболических ситуациях использование аминокислот, как энергетического субстрата, более предпочтительно, т.к. они напрямую поступают в ЦТК и их биохимические пути превращения наиболее выгодны для организма [13]. Несмотря на большое количество экспериментального и клинического материала, сведения о характере аминокислотного пула скелетных мышц при прерывистой алкоголизации практически отсутствуют. Между тем, периодический способ употребления значительных количеств алкоголя наиболее распространен, что и предопределило цель данного исследования – изучение изме-

нений состояния аминокислотного пула в плазме крови и скелетных мышцах при различных режимах прерывистой алкоголизации.

## Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на белых крысах-самцах с исходной массой 180-220 г. Животные (по 8 особей в группах) находились на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. При проведении опытов соблюдали правила гуманного обращения с животными. Для выполнения в дальнейшем корректной статистической обработки результатов опытные группы имели свои контроли. Группу «контроль 1» использовали для сравнения с показателями опытной группы, животным которой в желудок вводили 25% водный раствор этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела 2 раза в день через 12 часов в течение 4 суток. Далее, в течение 3 суток, – эквивалентное количество воды. Такой цикл повторялся 4 раза – группа прерывистой алкогольной интоксикации «ПАИ, 4 сут.». Группу «контроль 2» использовали для сравнения с экспериментальной группой, особям которой аналогично вводили алкоголь, но уже в течение 7 суток. Затем 7 суток вводили эквивалентное количество воды. Данный цикл повторялся дважды – группа «ПАИ, 7 сут.». Контрольным животным вводили воду. Длительность эксперимента в первом и втором случаях составила 28 суток. Последние 12 часов перед декапитацией животные находились при пищевой депривации с доступом к воде. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки, полученную плазму использовали для дальнейших исследований. Ткани незамедлительно замораживали в жидком азоте. Определяли содержание свободных аминокислот и их производных (41 показатель) на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Agilent 1200» [2], спектр биохимических показателей в плазме – с помощью биохимического анализатора «Conelab30i», активность аланинаминотрансферазы – модифицированным кинетическим методом [17]. Содержание кортикостерона в плазме – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [11].

При статистической обработке данных нормальность распределения оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Установлена нормальность распределения выборки. В этой связи межгрупповые различия оценивали методами параметрической статистики.

## Результаты и обсуждение

После прерывистой алкогольной интоксикации в плазме крови животных (табл. 1) группы «ПАИ, 4 сут.», из всего исследованного пула свободных аминокислот и их производных снизились уровни карнозина, оксипроли-

на, цистеиновой кислоты и повысилось содержание  $\square$ -аланина. В плазме крыс группы «ПАИ, 7 сут.» снизились уровни аспарагина, глутамина, этаноламина, оксипролина и 1-метилгистидина. В этой же группе, при сравнении с показателями группы «ПАИ, 4 сут.», в плазме снизилось содержание аспарагина,  $\square$ -аланина, валина, этаноламина и повысилось – цистеиновой кислоты. Из индексов структуры аминокислотного фонда плазмы (табл. 2) снизился коэффициент соотношения аминокислот с разветвленной углеродной цепью / ароматические аминокислоты (АРУЦ/ААК) в группе животных «ПАИ, 7 сут.», возможно, за счет низкого (59,2% от контроля) содержания валина (табл. 1). Ранее аналогичное снижение концентрации АРУЦ в плазме крыс выявлено при синдроме отмены этанола [8]. В свою очередь, снижение содержания аминокислот с разветвленной углеродной цепью в плазме, подтверждаемое более низким коэффициентом соотношения АРУЦ/ААК (антитоксический индекс печени, индекс Фишера), является косвенным свидетельством нарушения функции печени [1].

Из других биохимических показателей в плазме (табл. 3), выше контрольных значений оказался уровень глюкозы в группе животных «ПАИ, 7 сут.». Рост уровня мочевины («ПАИ, 4 сут.» – 82,5%, «ПАИ, 7 сут.» – 112%) в плазме, интерпретируемый как степень интенсификации катаболизма белков [6, 9], предполагает использование аминокислот в синтезе глюкозы через глюкозо-аланиновый шунт [13]. К тому же отмечено, что при алкогольном абстинентном синдроме появляется тенденция к развитию гипергликемии [10]. В свою очередь, рост активнос-

**Таблица 1** – Содержание свободных аминокислот и их производных в плазме (мкмоль/л) крыс при прерывистой интоксикации алкоголем (в желудок 25% раствор этанола, 3,5 г/кг, 2 раза в сутки; 4 цикла / 4 дня – «ПАИ, 4 сут.» и 2 цикла / 7 дней – «ПАИ, 7 сут.»)

Показатели	Контроль 1 к ПАИ, 4 сут.	ПАИ, 4 сут.	Контроль 2 к ПАИ, 7 сут.	ПАИ, 7 сут.
Аспарагин	50,3 ± 1,6	50,8 ± 1,7	56,1 ± 2,1	47,0 ± 2,3*#
Валин	162,0 ± 12,0	167,4 ± 10,6	186,6 ± 11,1	110,4 ± 34,0#
Глутамин	259,0 ± 8,3	265,4 ± 8,2	313,1 ± 11,7	267,0 ± 17,4*
Карнозин	32,1 ± 8,8	10,3 ± 2,6*	66,2 ± 23,3	29,3 ± 7,9
Оксипролин	18,2 ± 0,5	15,7 ± 1,1*	19,7 ± 0,9	15,7 ± 1,3*
Цистеиновая кислота	0,501 ± 0,068	0,330 ± 0,030*	0,482 ± 0,022	0,567 ± 0,081#
Этаноламин	18,9 ± 1,1	19,5 ± 2,2	22,0 ± 1,8	16,2 ± 1,0*#
$\square$ -аланин	4,51 ± 0,25	5,68 ± 0,40*	6,07 ± 0,63	5,15 ± 0,28#
1-метилгистидин	1,96 ± 0,16	1,68 ± 0,33	2,26 ± 0,34	1,69 ± 0,10*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к соответствующему по сроку контролю. # –  $p < 0,05$  по отношению к показателю группы «ПАИ, 4 сут.», оцениваемая методом 2-факторного дисперсионного анализа. Приведены только показатели со статистически значимыми различиями

**Таблица 2** – Индексы структуры аминокислотного фонда плазмы крови крыс при прерывистой интоксикации алкоголем (в желудок 25% раствор этанола, 3,5 г/кг, 2 раза в сутки; 4 цикла / 4 дня – «ПАИ, 4 сут.» и 2 цикла / 7 дней – «ПАИ, 7 сут.»)

Показатели	Контроль 1 к ПАИ, 4 сут.	ПАИ, 4 сут.	Контроль 2 к ПАИ, 7 сут.	ПАИ, 7 сут.
Сумма протеиногенных аминокислот	4663 ± 160	4727 ± 248	5381 ± 196	4864 ± 287
АРУЦ / ААК	2,61 ± 0,08	2,51 ± 0,09	2,89 ± 0,17	2,32 ± 0,12*
Заменимые / незаменимые аминокислоты	0,787 ± 0,0259	0,803 ± 0,0407	0,823 ± 0,0320	0,839 ± 0,0401
Гликогенные / кетогенные аминокислоты	1,54 ± 0,05	1,59 ± 0,08	1,63 ± 0,08	1,76 ± 0,10

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к соответствующему по сроку контролю

ти АЛАТ в крови крыс (в % от соответствующего контроля: «ПАИ, 4 сут.» – 88,5%, «ПАИ, 7 сут.» – 107%) как показатель повреждения мембран гепатоцитов, возможен через усиление синтеза фермента под действием глюкокортикоидов и может означать не что иное, как готовность биологических систем трансминировать аланин в пируват [10], для синтеза глюкозы (глюконеогенез). В группе «ПАИ, 7 сут.» это подтверждает высокая концентрация глюкозы в крови (табл. 3). Кроме того, известно, что нагрузка этанолом активизирует аденокортикальную систему [5], а в данном случае содержание кортикостерона в крови крыс этой группы, по сравнению с соответствующим контролем, спустя 7 суток от последней алкогольной нагрузки продолжает оставаться на уровне 137,3% (табл. 3).

Известно [14, 15], что этанол и ацетальдегид оказывают прямое повреждающее действие на скелетную мускулатуру за счет активации процессов перекисного окисления липидов. Показано, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождается снижением содержания белков в скелетных мышцах [3] за счет уменьшения биосинтеза и усиления деградации [14]. Следствием этих двух процессов становится повышение фонда свободных аминокислот в ткани. В данном исследовании, после прерывистой алкогольной интоксикации крыс группы «ПАИ, 4 сут.», в мышцах возрастает содержание цистатионина и цистеинсульфоновой кислоты, а в группе «ПАИ, 7 сут.» – фосфоэтаноламина и 1-метилгистидина (табл. 4). При сравнении пула аминокислот опытных групп (табл. 4), в мышцах крыс группы «ПАИ, 7 сут.» более высокой оказалась концентрация оксализина. Рост концентрации 1-метилгистидина и оксализина свидетельствует об усилении процессов протеолиза белков, что происходит обычно при миопатиях критических состояний [3]. Индексы структуры аминокислотного фонда в мышцах исследованных групп крыс не различались (табл. 5).

Выявленные изменения пула свободных аминокислот плазмы крови и мышц, некоторых биохимических показателей плазмы свидетельствуют об этанол-индуцированных начальных этапах развития патологических процессов в миоцитах. Это позволяет полагать, что продолжение циклов алкоголизации может вести к дальнейшей деградации мышечных белков, усилению метаболического дисбаланса и изменению основных гомеостатических параметров организма.

Таким образом, анализируя данные, полученные в экспериментах с прерывистой алкоголизацией крыс, которая рассматривается как чередование различных по длительности периодов алкогольной интоксикации и абстиненции [4], можно сделать следующие **выводы**. 1. По индексам структуры фонда аминокислот плазмы более негативное влияние алкогольная интоксикация оказала в группе «ПАИ, 7 сут.», т.к. здесь произошло снижение ко-

**Таблица 3** – Некоторые биохимические показатели плазмы крови при прерывистой интоксикации алкоголем (в желудок 25% раствор этанола, 3,5 г/кг, 2 раза в сутки; 4 цикла / 4 дня – «ПАИ, 4 сут.» и 2 цикла / 7 дней – «ПАИ, 7 сут.»)

Показатели	Контроль 1 к ПАИ, 4 сут.	ПАИ, 4 сут.	Контроль 2 к ПАИ, 7 сут.	ПАИ, 7 сут.
Глюкоза, ммоль/л	7,28 ± 0,11	7,21 ± 0,17	7,84 ± 0,24	8,71 ± 0,29*
Мочевина, ммоль/л	5,68 ± 0,38	4,69 ± 0,31	4,76 ± 0,37	5,33 ± 0,23
АЛАТ, Ед/л	62,7 ± 3,94	55,5 ± 5,75	69,4 ± 5,24	74,0 ± 2,30
Кортикостерон, нмоль/л	1660,9 ± 258,3	1685,9 ± 189,1	1452,2 ± 294,9	1998,3 ± 197,1

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по отношению к соответствующему по сроку контролю

**Таблица 4** – Содержание свободных аминокислот и их производных в скелетных мышцах (нмоль/г) крыс при прерывистой интоксикации алкоголем (в желудок 2,5% раствор этанола, 3,5 г/кг, 2 раза в сутки; 4 цикла / 4 дня – «ПАИ, 4 сут.» и 2 цикла / 7 дней – «ПАИ, 7 сут.»)

Показатели	Контроль 1 к ПАИ, 4 сут.	ПАИ, 4 сут.	Контроль 2 к ПАИ, 7 сут.	ПАИ, 7 сут.
Фосфозаноламин	101,6 ± 10,0	134 ± 26,9	77,1 ± 13,7	122,9 ± 13*
Цистатионин	88,5 ± 12,4	151,9 ± 26,2*	233,0 ± 66,9	330,8 ± 181
Цистеиновая кислота	3,01 ± 0,16	4,35 ± 0,54*	5,20 ± 0,48	7,99 ± 2,77
1-метилгистидин	3,84 ± 0,77	4,21 ± 0,88	3,28 ± 1,1	6,50 ± 1,1*
Оксилизин	64,5 ± 17,1	18,5 ± 7,1*	50,3 ± 6,5	53,9 ± 0,6#

*Примечание:* \* –  $p < 0,05$  по отношению к соответствующему по сроку контролю. # –  $p < 0,05$  по отношению к показателю группы «ПАИ 4 сут.», оцениваемая методом 2-факторного дисперсионного анализа. Приведены только показатели со статистически значимыми различиями.

**Таблица 5** – Индексы структуры аминокислотного фонда скелетных мышц крыс при прерывистой интоксикации алкоголем (в желудок 25% раствор этанола, 3,5 г/кг массы, 2 раза в сутки; 4 цикла / 4 дня – «ПАИ, 4сут.» и 2 цикла / 7 дней «ПАИ, 7 сут.»)

Показатель	Контроль 1 К ПАИ 4 сут.	ПАИ 3 сут.	Контроль 2 К ПАИ 7 сут.	ПАИ 7 сут.
Сумма протеиногенных аминокислот	14716 ± 1168	15142 ± 1728	18851 ± 1132	18351 ± 2137
АРУЦ/ААК	2,88 ± 0,13	2,86 ± 0,12	2,76 ± 0,09	2,72 ± 0,17
Заменимые/незаменимые аминокислоты	6,34 ± 0,36	6,33 ± 0,36	7,38 ± 0,46	7,09 ± 0,49
Гликогенные/кетогенные аминокислоты	16,0 ± 1,4	14,9 ± 1,0	18,6 ± 1,4	19,8 ± 2,3

эффицента соотношения АРУЦ/ААК, свидетельствующее о нарушении функции печени. 2. Более выраженный дисбаланс аминокислотного пула плазмы произошел также в группе «ПАИ, 7 сут.». 3. В скелетных мышцах, на фоне стабильных индексов структуры фонда аминокислот, в группе «ПАИ, 7 сут.» произошло повышение уровня 1-метилгистидина и концентрации оксилизина (28,7% от контроля – «ПАИ, 4 сут.», 102,7% – «ПАИ, 7 сут.»), что можно рассматривать как свидетельство активизации протеолиза белков в миоцитах.

#### Список использованной литературы

1. Адаменко, Е.И. Характеристика спектра свободных аминокислот сыворотки крови у больных циррозом печени / Е.И. Адаменко, Н.Н. Силивончик, О.И. Попова и др. // Вестн НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2005. – № 2 – С. 63-68.
2. Дорошенко, Е.М. Методологические аспекты и трудности анализа свободных (физиологических) аминокислот и родственных соединений в биологических жидкостях и тканях / Е.М. До-

рошенко [и др.] // Сборник тезисов Республиканской научной конференции по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ-2010» – Минск, 2010. – С. 126.

3. Зиновьева, О.Е. Алкогольная миопатия / О.Е. Зиновьева, Б.С. Шенкман // Неврологический журнал. – 2007. – № 5. – С. 4-8.
4. Лелевич, В.В. Новые подходы в моделировании алкогольной интоксикации / В.В. Лелевич, А.Н. Бородинский, О.В. Артемова и др. // Современные аспекты изучения алкогольной и наркотической зависимости. Материалы международного симпозиума. Научн. ред. В.В. Лелевич. – Гродно, 2004. – С. 86-90.
5. Михайлов, В.И. Влияние острой и хронической алкогольной интоксикации на секрецию гормонов и регуляцию углеводного обмена / В.И. Михайлов, В.И. Ревенко, Г.Ф. Ракицкий и др. // Вестник неврол., психиатр. и нейрохирургии. – 2009. – № 4. – С. 61-64.
6. Островский, Ю.М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю.М. Островский, С.Ю. Островский. – Минск, 1995.
7. Пауков, В.С. Алкоголизм и алкогольная болезнь / В.С. Пауков, Н.Ю. Беляева, Т.М. Веронина // Терапевтический архив. – 2001. – Т. 73, № 2. – С. 65-67.
8. Разводовский, Ю.Е. Влияние тамина и гепатита на фонд свободных аминокислот плазмы крови при синдроме отмены этанола / Ю.Е. Разводовский, В.Ю. Смирнов, Е.М. Дорошенко, В.М. Шейбак // Вестн НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2006. – № 1. – С. 49-52
9. Рослый, И.М. Биохимия и алкоголизм (III): длительная алкоголизация как механизм развития белковой дистрофии / И.М. Рослый, С.В. Абрамов, В.Р. Агаронов и др. // Вопросы наркологии. – 2004. – № 4. – С. 70-80.
10. Рослый, И.М. Биохимия и алкоголизм (IV): типовые клинико-биохимические синдромы при хронической алкогольной интоксикации / И.М. Рослый, С.В. Абрамов, В.Р. Агаронов и др. // Вопросы наркологии. – 2004. – №5. – С. 46-56.
11. Чумаченко, С.С. Функциональная активность адренкортикальной системы и связывающая способность транскортина на плазме крови крыс при развитии толерантности к наркотическому действию этанола / С.С. Чумаченко, Ю.А. Тарасов, Л.И. Надольник // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2000. – № 3. – С. 14-17.
12. Шейбак, В.М. Обмен свободных аминокислот и КоА при алкогольной интоксикации / В.М. Шейбак. – Гродно: ГрГМУ, 1998.
13. Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – Москва, 1999.
14. Lang, C. Alcohol impairs leucine-mediated phosphorylation of 4E-BP1, S6KI, eIF4G and mTOR in skeletal muscle / C. Lang, R. Frost, N. Deshpande et al. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 285. – P. E1205-E1215.
15. Mantle, D. Effect of ethanol and acetaldehyde on intracellular protease activities in human liver, brain and muscle tissues in vitro / D. Mantle, G. Falkous, T. Peters, V. Preedy // Clin. Chim. Acta. – 1999. – Vol. 281. – P. 101-108.
16. Preedy, V.R. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definition, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis / V.R. Preedy, J. Addachi, Y. Ueno et al. // Eur. J. Neurol. – 2001. – Vol. 8. – P. 677-687.
17. Schumann, G. New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentrations of five enzymes in serum: preliminary upper reference limits obtained in hospitalized subjects / G. Schumann, R. Klauke // Clin. Chem. Acta. – 2003. – Vol. 327, N 1-2. – P. 69-79.

## Alteration of free amino acids pool in blood plasma and skeletal muscles of rats at interrupted alcohol intoxication

V.V. Lelevich, Yu.A. Tarasov, S.V. Lelevich, V.Yu. Smirnov

EE «Grodno State Medical University»

*The investigation of the contents of free amino acids pool in blood plasma and skeletal muscles of rats at different types of alcohol administration has been performed. Interrupted alcohol intoxication was characterized by the diminishing of some amino acids in plasma and changes in their contents in muscles. The general patterns in the development of metabolic disturbances caused by ethanol intake have been shown.*

**Key words:** rats, interrupted alcohol intoxication, blood plasma, skeletal muscles, free amino acids.

Поступила 09.02.2012