

УДК 612.398.192:612.35]:577.112.37:615.032.33]-092.9

СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫМ ИНФЕЗОЛА40

V. M. Sheybak (vsheibak@gmail.com), Павлюковец А. Ю. , (anastasiayk@mail.ru),
В. Ю. Смирнов (vit_sm@mail.ru), Л. Н. Шейбак (lsheibak@gmail.com)
УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Широкое использование аминокислотных добавок в профилактической и спортивной медицине, их назначение при заболеваниях печени, лечении инсулинорезистентности и ожирения, предполагает их энтеральное введение.

Целью исследования явился анализ концентраций свободных аминокислот в ткани печени крыс в динамике после внутрижелудочного введения Инфезола40.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на крысах массой 120-140 г, которым внутрижелудочно вводили раствор Инфезол40 (№ серии 42005012 BERLIN-CHEMIE MENARI №1, 12489, Германия) в дозе 20 мл/кг массы, декапитацию животных осуществляли через 10 мин, 20 мин, 30 мин или 45 мин, соответственно. Определение свободных аминокислот в ткани печени производили методом обращеннофазной ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. В течение 45 мин после внутрижелудочного введения Инфезола40 в ткани печени общее количество протеиногенных аминокислот не изменяется, однако, на этом фоне статистически значимо увеличивался уровень аргинина и повышалось соотношение аргинин/цитруллин.

Выводы. Таким образом, поступающие в клетки тонкого кишечника аминокислоты в существенной степени влияют на метаболизм этих клеток, что модулирует количество и спектр аминокислот достигающей печени. В свою очередь их превращения в печени должно оказывать влияние на аминокислотный пул плазмы крови.

Ключевые слова: аминокислоты, Инфезол40, кишечник, печень

FREE AMINO ACIDS OF LIVER AFTER INTRAGASTRIC ADMINISTRATION OF INFEZOL40 TO ANIMALS

V. M. Sheybak, A. Y. Pauliukavets, V. Y. Smirnov, L. N. Sheybak
Educational Institution «Grodno State Medical University Grodno», Grodno, Belarus

Background. Widespread use of amino acid supplements in preventive and sports medicine, their appointment in liver diseases, treatment of insulin resistance and obesity, suggest their enteral administration.

The aim of the study was to analyze the concentrations of free amino acids in the liver tissue of rats in dynamics after intragastric administration of Infezol40.

Materials and methods. The experiment was carried out on rats weighing 120-140 g, which were administered intragastrically at a dose Infezol40 solution 20 ml / kg body weight, decapitation was performed over 10 min, 20 min, 30 min or 45 min, respectively. Determination of free amino acids in liver tissue was performed by reversed-phase HPLC.

Results and discussion. Intragastric administration of Infezol40 for 45 minutes does not change the total amount of proteinogenic amino acids in liver tissue, however, against this background, the level of arginine increased statistically and the arginine/citrulline ratio increased.

Conclusions. Thus, the amino acids entering the cells of the small intestine significantly affect the metabolism of these cells, which modulates the number and range of amino acids reaching the liver. In turn, their transformation in the liver should have an effect on the amino acid pool of the blood plasma.

Keywords: amino acids, Infezol40, intestines, liver.

Печень - основное место обмена аминокислот и синтеза белков плазмы крови. В печень свободные аминокислоты поступают по воротной вене из тонкого кишечника, а также по венозной сети из толстого кишечника. Одновременно, аминокислотный пул печени формируют аминокислоты, образующиеся при катаболизме эндогенных белков (в первую очередь скелетных мышц), а также собственных белков клеток печени (рис.1) [1].

Большая часть аминокислот внепеченочного происхождения подвергается окислительному метаболизму, продуцируя мочевины и использу-

ются в качестве субстратов цикла Кребса. Некоторые аминокислоты (например, аланин) в свободном виде поступают обратно в кровь. Часть аминокислот используется для синтеза внутриклеточных белков гепатоцитов, сывороточных белков и таких необходимых организму соединений, как глутатион, глутамин, таурин, карнозин и креатинин. Кроме того, печень обеспечивает стабилизацию пула свободных аминокислот в плазме крови путем синтеза заменимых аминокислот и, вместе с почками, перераспределения азота в результате реакций трансаминирования [2, 3].



Рисунок 1. – Обмен аминокислот между печенью и другими тканями после их абсорбции в кишечнике

Широкое использование аминокислотных добавок в профилактической и спортивной медицине, их назначение при заболеваниях печени, лечении инсулинорезистентности и ожирения, предполагают их энтеральное введение [4, 5]. Однако, в литературе отсутствуют сведения о динамике изменений аминокислотного профиля в печени после энтерального введения искусственной смеси аминокислот.

Целью исследования явился анализ концентраций свободных аминокислот в ткани печени крыс в динамике после внутрижелудочного введения Инфезола40.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на 30 беспородных крысах массой 120-140 г, при свободном доступе животных к пище и воде. Животные были разделены на 5 групп: 1- контрольной группе – внутрижелудочно вводили физраствор (0,9% раствор натрия хлорида), группам 2, 3, 4, 5 – внутрижелудочно Инфезол40 (№ серии 42005012 BERLIN-CHEMIE MENARI №1, 12489, Германия) в дозе 20 мл/кг массы, что соответствует 800 мг смеси аминокислот на кг массы животного (табл. 1). Декапитацию животных осуществляли через 10 мин, 20 мин, 30 мин или 45 мин, соответственно. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета. Для анализа использовали печень. Определение свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Определение ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) проводили методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм – для триптофана). Все определения осуществляли с помощью хроматографической

системы Agilent 1100, прием и обработка данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Математическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 6.0.

Таблица 1. - Содержание свободных аминокислот в растворе Инфезола40 г/л (мкмоль/л)

Заменяемые аминокислоты		Незаменяемые аминокислоты	
Аспарагиновая кислота	2,0 (15025)	Треонин	1,6 (13432)
Глутаминовая кислота	5,0 (33984)	Валин	2,25 (19206)
Гистидин	1,35 (8701)	Метионин	1,75 (11728)
Глицин	7,0 (93251)	Триптофан	0,5 (2448)
Аргинин	4,55 (26119)	Фенилаланин	3,15 (19069)
Аланин	4,0 (44898)	Изолейцин	2,1 (16010)
		Лейцин	2,75 (20965)
		Лизина	2,0 (13681)

Результаты и обсуждение

Инфезол40 – это сбалансированная смесь аминокислот с относительно низкой осмоляемостью, отвечающая современным стандартам, что позволяет использовать её для стимуляции синтеза белка в комплексном лечении больных широкого профиля и улучшения нутритивного статуса [6].

Следует отметить, что после внутрижелудочного введения Инфезола40 в течение 45 мин нами не обнаружено изменений в ткани печени общего количества протеиногенных аминокислот, однако, на этом фоне статистически значимо увеличивался уровень аргинина и повышалось соотношение аргинин/цитруллин (табл. 2 и 3, рис. 2 а-е, 3г).

Через 10 мин после введения аминокислотной смеси увеличивалось суммарное количество лейцина, изолейцина и валина (АРУЦ), ароматических аминокислот (тирозин+фенилаланин+триптофан) (табл. 3), уровней незаменимых аминокислот: фенилаланин, изолейцин и лейцин (рис. 3б), а также образующегося из фенилаланина тирозина, азотсодержащих производных аминокислот - орнитина, 3-метилгистидина и цистатионина. При этом снижались концентрации серина, треонина и цитруллина (табл.2).

После введения Инфезола40 через 20 мин сохранялось повышение общего содержания ароматических аминокислот и увеличивалось соотношение глутамат/глутамин (табл. 3), уровни глутамата, тирозина, фенилаланина, изолейцина и лейцина (рис. 3б), азотсодержащих метаболитов аминокислот цистатионина, и орнитина (рис. 3г), снижалась концентрация треонина (табл.2).

Таблица 2. – Концентрации свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в печени крыс, получавших Инфезол40 (20 мл/кг внутривенно), нмоль/г, М±m

Исследуемый показатель	контроль	Инфезол 10 мин	Инфезол 20 мин	Инфезол 30 мин	Инфезол 45 мин
Глутамат	4964±385	5834±277	6570±274*	5101±299	6053±407
Аспарагин	256±7,5	219±6,5*	242±12	221±10*	251±14
Серин	2271±334	2170±283*	2083±358	2834±325	2381±375
Глутамин	8247±583	7850±641	8343±937	5885±382*	6617±348*
3-метилгистидин	638±96	1042±111*	934±248	610±130	835±185
Глицин	4816±455	4336±217	5363±222	5612±323	6476±548*
Треонин	1448±170	915±88*	790±194*	2062±261	1917±399
Цитруллин	93±5,6	72±2,5*	85±8,1	82±3,1	96±4,5
Аргинин	66±1,5	125±17*	150±8,3*	121±5,8*	100±2,8*
Тирозин	148±8,6	201±13*	205±17*	158±10	227±60
Метионин	92±8	91±7,3	99±8,1	70±5*	88±4,8
Цистатионин	59±7,3	96±7*	106±18*	138±12*	105±26
Фенилаланин	154±11	200±18*	205±12*	162±3,7	182±6,6
Изолейцин	252±21	332±21*	321±18*	269±23	272±12
Лейцин	426±31	556±38*	543±42*	458±33	481±26
Орнитин	288±30	496±39*	514±80*	551±55*	435±74

Примечание: здесь и в таблице 3 * – статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Таблица 3. – Структура пула свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в печени крыс, получавших Инфезол40 (20 мл/кг внутривенно), М±m

Исследуемый показатель	контроль	Инфезол40 10 мин	Инфезол 20 мин	Инфезол 30 мин	Инфезол 45 мин
Общее количество незаменимых аминокислот, нмоль/г	3643±299	3498±212	3292±390	4902±438*	4213±548
Заменимые/незаменимые аминокислоты	7,27±0,98	7,26±0,48	8,85±1,00	4,94±0,38*	6,85±1,06
Общее количество аминокислот с разветвленной углеродной цепью, нмоль/г	1107±82	1379±90*	1357±91	1181±98	1217±63
Общее количество ароматических аминокислот, нмоль/г	397±30	501±35*	515±35*	429±9	509±58
Аргинин/цитруллин	0,72±0,03	1,78±0,28*	1,84±0,17*	1,48±0,07*	1,05±0,03*
Глутамат/глутамин	0,61±0,04	0,77±0,07	0,83±0,09*	0,88±0,07*	0,92±0,06*

Через 30 мин после введения аминозоля сохраняется увеличение соотношения глутамат/глутамин (табл.3), были повышены концентрации цистатионина и орнитина (рис. 3г). Одновремен-

но, выше контрольных значений было общее количество незаменимых аминокислот (рис. 3а), что привело к снижению соотношения заменимые/незаменимые аминокислоты (табл. 3), а также уровни амидов – аспарагина, глутамин (рис. 3в) и метионина (табл. 2), являющихся лимитирующими субстратами в биосинтезе азотистых оснований и процессов метилирования.

Через 45 мин после введения Инфезола40 повышение соотношения глутамат/глутамин (табл. 3), было обусловлено снижением содержания глутамин. Одновременно регистрировали увеличение концентрации глицина (табл. 2).

Общий анализ изменений концентраций аминокислот, поступающих в кишечник в составе смеси аминокислот (Инфезол40), показал, что во все сроки эксперимента статистически значимо изменяется процентный вклад треонина (4% в смеси аминокислот) в фонд свободных аминокислот ткани печени. Эта незаменимая аминокислота наиболее востребована для синтеза муцинов в клетках кишечника [7]. Интересно, что уровень поступающего в наибольшем количестве глицина (27,6% от всех входящих в состав раствора аминокислот) повышался в печени только через 45 мин – в 1,3 раза. Глицин является активным участником метаболизма одноуглеродных радикалов и совместно с серином способствует процессам метилирования ДНК и пролиферации [8]. Существенно в печени после энтерального введения Инфезола40 изменялись концентрации аргинина, составляющего 7,7% от количества входящих в раствор аминокислот, фенилаланина (5,6%) лейцина (4%) и изолейцина (6,1%) (рис. 2 а-е). Эти незаменимые аминокислоты являются лимитирующими в биосинтезе мышечных белков (АРУЦ и фенилаланин), а также в синтезе полиаминов и оксида азота (аргинин) [4, 9].



Рисунок 2а. — Относительное количество свободных аминокислот в ткани печени входящих в состав Инфезол40 (контроль)



Рисунок 2г. — Относительное количество свободных аминокислот в ткани печени входящих в состав Инфезол40



Рисунок 2б. — Относительное количество свободных аминокислот в ткани печени входящих в состав Инфезол40, через 10 мин после его введения

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

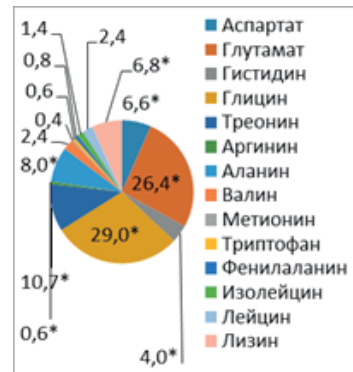


Рисунок 2д. — Относительное количество свободных аминокислот в ткани печени входящих в состав Инфезол40, через 30 мин после его введения

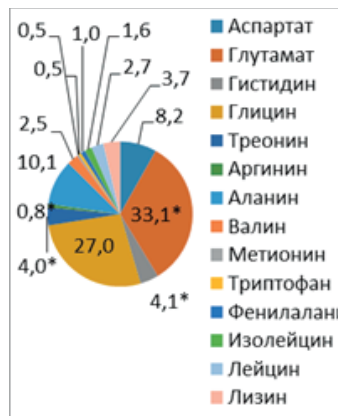


Рисунок 2в. — Относительное количество свободных аминокислот в ткани печени входящих в состав Инфезол40, через 20 мин после его введения



Рисунок 2е. — Относительное количество свободных аминокислот в ткани печени входящих в состав Инфезол40, через 45 мин после его введения

Сравнительный анализ изменений концентраций свободных аминокислот в микробно-тканевом комплексе (МТК) тонкого кишечника [10] и в ткани печени, проведенный с целью выявления степени экстракции клетками кишечника

отдельных аминокислот, показал, что представленный в наибольшем количестве в аминокислотной смеси глицин увеличивался в МТК тонкого кишечника через 10 мин в 4,7 раза, через 20 мин - 3,3 раза, через 30 мин - 2,4 раза, через 45 мин - 2,3 раза, тогда как его уровень в печени возрастал только через 45 мин. Содержание аргинина как в МТК тонкого кишечника, так и в ткани печени увеличивалось во все изучаемые сроки, тогда как концентрации фенилаланина, изолейцина и лейцина выше контрольных значе-

ний в ткани печени в течение первых 20 мин, а в МТК тонкого кишечника в течение 45 мин. Особо следует отметить снижение уровня глутамина в ткани печени через 30 и 45 мин после введения Инфезола40, при этом в МТК тонкого кишечника уровень глутамина в эти же сроки увеличивается. Данное различие в концентрациях, возможно, обусловлено более энергичной экстракцией глутамина клетками кишечника, который использует его не только в качестве энергетического субстрата, но для синтеза азотистых оснований [11]. Это подтверждает наше предположение о стимуляции аминозолом процессов пролиферации в тонком кишечнике, что приводит к усилению потока нутриентов в печень. С другой стороны, усиление окислительного метаболизма избыточного количества аминокислот клетками кишечника повышает концентрации аммиака в портальной крови, что стимулирует печеночную глутаминазу и снижает концентрацию глутамина [12].

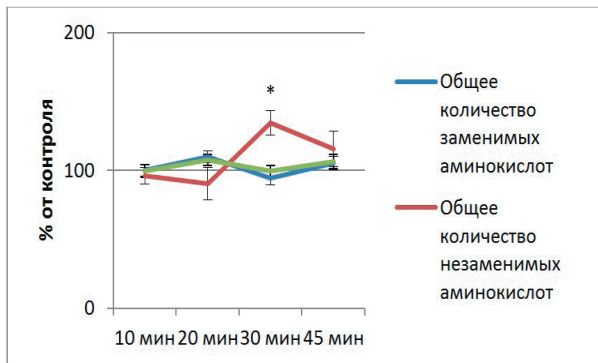


Рисунок 3а. — Изменение общего количества свободных протеиногенных аминокислот в печени крыс после введения Инфезол40. Примечание: здесь и рисунках 3б-3д * – статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

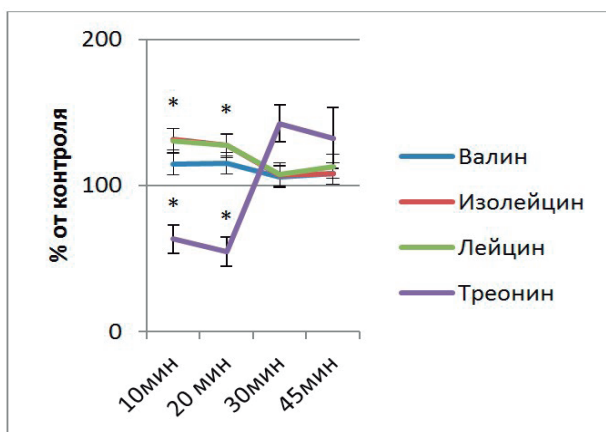


Рисунок 3б. — Изменение концентраций треонина, валина, изолейцина и лейцина в печени крыс после введения Инфезол40.

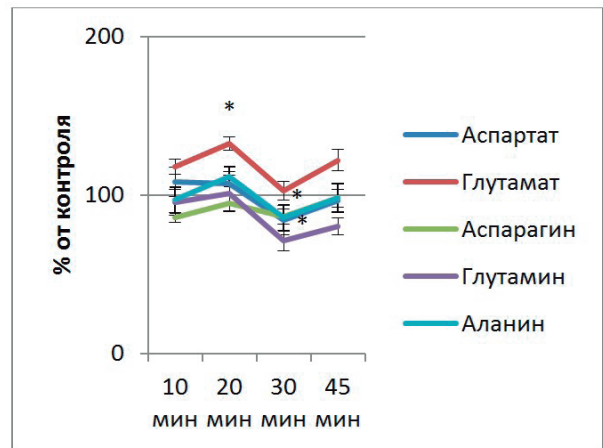


Рисунок 3в. — Изменение концентраций аспартата, глутамата, аспарагина, глутамина и аланина в печени крыс после введения Инфезол40

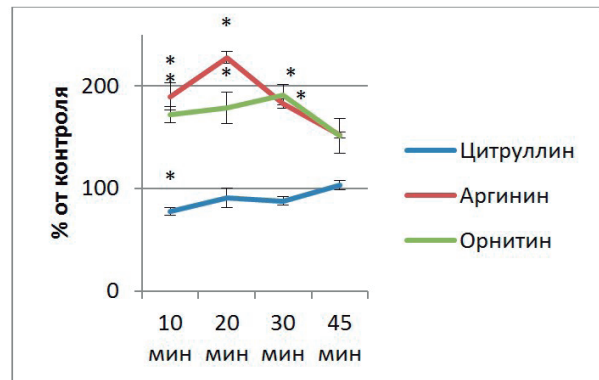


Рисунок 3г. — Изменение концентраций аргинина, цитруллина и орнитана в печени крыс после введения Инфезол40

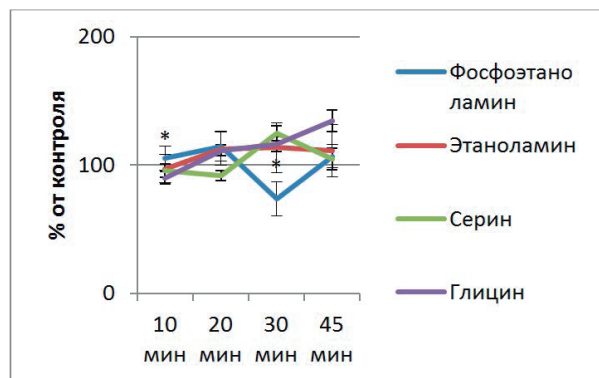


Рисунок 3д. —Изменение концентраций серина, глицина, фосфоэтанолламина и этаноламина в печени крыс после введения Инфезол40

Выводы

Таким образом, очевидно, что поступающие в клетки тонкого кишечника аминокислоты в существенной степени влияют на метаболизм этих клеток, что модулирует количество и спектр аминокислот достигающий печени. В свою очередь

их превращения в печени должно оказывать влияние на аминокислотный пул плазмы крови. Таким образом, количество и спектр аминокислот, поступающих энтеральным путем, должен

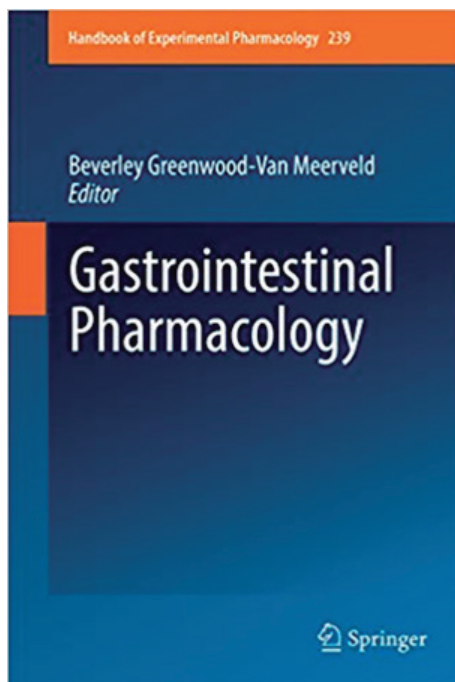
влиять на печеночные уровни свободных аминокислот, но при этом, вероятно, функциональное состояние клеток тонкого кишечника будет иметь решающее значение.

References

1. Hanigan MD, Crompton LA, Reynolds CK, Wray-Cahen D, Lomax MA, France J. An integrative model of amino acid metabolism in the liver of the lactating dairy cow. *J. Theor. Biol.* 2004;228(2):271-289.
2. Tietge UJ, Bahr MJ, Manns MP, Böker KH. Hepatic amino-acid metabolism in liver cirrhosis and in the long-term course after liver transplantation. *Trans Int.* 2003;16(1):1-8. doi: 10.1007/s00147-002-0484-z.
3. Dejong CH, van de Poll MC, Soeters PB, Jalan R, Olde Damink SW. Aromatic amino acid metabolism during liver failure. *J. Nutr.* 2007;137(6 Suppl 1):1579S-585S.
4. Sheibak VM. Lejcin, izolejcin, valin: bihimicheskie osnovy razrabotki novyh lekarstvennyh sredstv [Leucine, isoleucine, valine: biochemical basis for the development of new drugs: monograph]. Grodno: GrGMU; 2014. 242 p. (Russian).
5. Beck KL, Thomson JS, Swift RJ, von Hurst PR. Role of nutrition in performance enhancement and postexercise recovery. *Open Access J. Sports Med.* 2015;(6):259-267. doi: 10.2147/OAJSM.S33605.
6. Schricker T, Lattermann R. Strategies to attenuate the catabolic response to surgery and improve perioperative outcomes. *Can. J. Anesth.* 2007;54(6):414-419. doi: 10.1007/BF03022026.
7. Faure M, Chone F, Mettraux C, Godin JP, Bechereau F, Vuichoud J, Papet I, Breuille D, Obléd C. Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. *J. Nutr.* 2007;137(7):1802-1807.
8. Locasale JW. Serine, glycine and the one-carbon cycle: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer.* 2013;13(8):572-583. doi: 10.1038/nrc3557.
9. 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.
10. Sheibak VM, Pauliukavets AY, Smirnov VYu, Nikolayeva IV, Sheibak LN, Olekhovich EV. Dinamika izmenenij koncentracij svobodnyh aminokislot v mikrobnno-tkanevom komplekse posle vvedeniya zhivotnym inefezola40 [Dynamics of changes in the concentrations of free amino acids in the microbial-tissue complex after administration to animals of Infezol 40]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2017;15(4):386-391. doi: 10.25298/2221-8785-2017-15-4-386-391. (Russian).
11. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. Intestinal glutamate metabolism. *J. Nutr.* 2000;130(4 Suppl):978S-982S.
12. Gebhardt R, Coffey PJ. Hepatic autophagy is differentially regulated in periportal and pericentral zones - a general mechanism relevant for other tissues? *Cell Commun. Signal.* 2013;11(1):1-5. doi: 10.1186/1478-811X-11-21.

Поступила: 05.11.2017

Принята к печати: 14.11.2017



Gastrointestinal Pharmacology / ed. : B. Greenwood-Van Meerveld. – New York : Springer, 2017. – 444 p. – (Handbook of Experimental Pharmacology ; 239). – ISBN 978-3-319-56359-6.

This volume aims to connect current ideas and concepts about GI disorders with the search for novel therapeutics. Towards this goal, authors provide a timely state-of-the-art overview of the GI tract in health and disease, current treatment approaches and ongoing developments in drug discovery, and their potential for the better treatment of patients with GI disorders.