

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-11-9-13

ПРОТЕИНОГЕННЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ ЦИНКА ДИАСПАРТАТА

В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец*, Е. М. Дорошенко¹

Одним из наиболее распространенных металлов в биологических системах является цинк. В настоящее время с целью профилактики и ликвидации дефицита цинка, а также использования его иммуностимулирующего эффекта используют различные соединения цинка. Целью исследования явился анализ свободных протеиногенных аминокислот в плазме крови, ткани печени и вилочковой железы, в пейеровых бляшках крыс при курсовом введении цинка диаспартата. Показано, что цинка диаспартат (25 мг/кг, внутривентрикулярно в течение 10 дней) приводит к гипоаминоацидемии (снижение в среднем на 34 %, $p < 0,05$), которая, вероятно, является следствием активного транспорта аминокислот в ткани и использования их в клетках. Одновременно после введения цинка диаспартата регистрировали уменьшение аминокислотного пула в тканях печени на 11 % ($p < 0,05$) и в вилочковой железе на 10 % ($p < 0,05$), что, возможно, обусловлено интенсификацией синтеза белка гепатоцитами и пролиферативных процессов в ткани вилочковой железы. Лимфоциты пейеровых бляшек в кишечнике в этих условиях перепрограммируют метаболизм, что сопровождается повышением уровня аспартата в 1,2 раза ($p < 0,05$), вероятно, с целью его дальнейшей утилизации в цикле Кребса. Среди выявленных эффектов длительного применения цинка диаспартата особый интерес представляет увеличение концентрации триптофана в плазме крови в 1,3 раза ($p < 0,05$), механизм которого требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: цинка диаспартат; свободные аминокислоты; печень; вилочковая железа; плазма крови; пейеровы бляшки; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Ионы металлов играют значительную роль в биохимических процессах и признаны жизненно важными микроэлементами [14]. Одним из наиболее распространенных металлов в биологических системах является цинк (второй после железа). Основная часть присутствующего в организме Zn^{2+} находится в связанном виде, а уровень свободного цинка чрезвычайно низкий. Показано, что внутриклеточная концентрация Zn^{2+} составляет примерно 0,4 нМ, внеклеточный уровень Zn^{2+} — 0,7 нМ, тогда как в плазме уровень Zn^{2+} — 0,2 нМ. Большая часть Zn^{2+} быстро элиминирована во внеклеточное пространство или депонируется путем секвестрации цинк-“пальцевыми” белками [17].

Известно более 3000 генов человека (15 % от общего числа генов), кодирующих цинк-связывающие белки. В образовании цинк-“пальцевых” структур белков чаще всего задействованы цистеин (примерно 33 %), гистидин (примерно 31 %) и аспартат или глутамат (примерно 18 %) [3].

Поскольку катионы цинка необходимы для функционирования ферментов всех 6 классов и являются компонентами факторов транскрипции и металлопротеинов, цинксодержащие белки в совокупности представляют 10 % протеома млекопитающих [8].

В клетках Zn^{2+} может играть роль структурного, функционального (каталитического) и сигнального катиона, регулирующего клеточную функцию. Ионы Zn^{2+} в гидролитических ферментах используются для поляризации и активации молекулы воды с целью повышения ее нуклеофильности при физиологических уровнях pH [19]. Ионы Zn^{2+} участвуют в межбелковых взаимодействиях посредством стабилизации конформации белков. Zn^{2+} присутствует в белках — факторах транскрипции, образуя специфические мотивы структуры — цинковые “пальцы” [11]. Кроме того, из-за изначально низкой концентрации свободного цинка он может служить вторичным внутриклеточным мессенджером. Показано, что временное увеличение концентрации Zn^{2+} до 10^{-9} М или выше изменяет функциональную активность многих белков и ферментов [18].

Цинксодержащие белки (металлопротеины) в ряде случаев являются быстрым источником свободных катионов Zn^{2+} и могут регулировать активность Zn^{2+} -за-

¹ УО “Гродненский государственный медицинский университет”, Республика Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80.

* e-mail: anastasiayk@mail.ru

висимых ферментов [10]. Хелатирование Zn^{2+} может снижать функциональную активность нейтрофилов и ингибировать их способность к дегрануляции, образованию активных форм кислорода или продукции цитокинов. Связывание цинка также ингибирует фагоцитарную активность макрофагов. Дефицит металлопротеинов в присутствии избыточного количества Zn^{2+} может повышать восприимчивость к некоторым патогенным микроорганизмам, например, *Clostridium difficile* [20].

В настоящее время с целью профилактики и ликвидации дефицита цинка, а также использования его иммуностимулирующего эффекта используют различные его соединения. Основные неорганические формы цинка представлены сульфатом, хлоридом и оксидом цинка. Органические формы цинка (аспарагинат, глицинат, лактат, аскорбат, никотинат), с одной стороны, менее токсичны, с другой – медленнее диссоциируют в организме [15]. Одним из наиболее распространенных лекарственных средств является цинка диаспартат, который по содержанию катионов цинка существенно не отличается от цинка сульфата.

Интегральным показателем, характеризующим направленность метаболических процессов в организме, является фонд свободных аминокислот в плазме крови. Характеристики этого фонда отражаются на содержании и индивидуальных концентрациях тканевых пулов свободных аминокислот. Определение уровней отдельных аминокислот в клетках позволяет в целом охарактеризовать метаболическую ситуацию, что входит в задачи метабомики [4].

Целью исследования явился анализ свободных протеиногенных аминокислот в плазме крови, ткани печени и вилочковой железы, в пейеровых бляшках крыс при курсовом введении цинка диаспартата.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали цинка диаспартат, синтезированный в Институте физико-органической химии

Таблица 1. Структура аминокислотного пула плазмы крови крыс, получавших цинка диаспартат (25 мг/кг внутривентриально в течение 10 дней), мкмоль/л, $M \pm m$

Показатель	Контроль	Цинка диаспартат
Общее количество протеиногенных аминокислот	8536 ± 292	6638 ± 194*
Общее количество заменимых аминокислот	4897 ± 159	3778 ± 89*
Общее количество незаменимых аминокислот	3640 ± 145	2860 ± 134*
Общее количество АРУЦ	878 ± 28	661 ± 25*
АРУЦ/ароматические аминокислоты	2,3 ± 0,08	1,7 ± 0,06*
Глутамат + глутамин	2046 ± 70	1566 ± 55*

* — статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

НАН Беларуси в рамках проекта государственной программы “Аминокислоты для разработки комбинированного препарата, содержащего таурин и цинк диаспартат (таурин)”. Эксперименты проведены на 20 крысах-самках массой 120 – 140 г, при свободном доступе животных к корму и воде. Животные были разделены на 2 группы: 1 — контрольная группа — внутривентриально в течение 10 дней вводили в эквивалентном количестве ($n = 10$); 2 группа — внутривентриально — цинка диаспартат в дозе 25 мг/кг (в пересчете на ионы цинка 4,9 мг/кг) в течение 10 дней ($n = 10$). Вывод животных из эксперимента осуществляли на 11 сутки. Все опыты проведены с учетом “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных”. Для анализа использовали плазму крови, ткань печени и вилочковой железы (ВЖ), а также пейеровы бляшки животных. Определение свободных аминокислот проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ с *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионово-й 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 обработку данных — с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Математическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 6.0.

Таблица 2. Концентрации свободных аминокислот в плазме крови крыс, получавших цинка диаспартат (25 мг/кг внутривентриально в течение 10 дней), мкмоль/л, $M \pm m$

Показатель	Контроль	Цинка диаспартат
Аспартат	167 ± 9,3	110 ± 3,7*
Глутамат	570 ± 35,4	383 ± 15,9*
Аспарагин	132 ± 4,2	97 ± 2,8*
Серин	539 ± 28,2	378 ± 11,7*
Глутамин	1476 ± 47	1183 ± 46,7*
Гистидин	69 ± 1,6	55 ± 1,9*
Глицин	521 ± 15,2	411 ± 21,4*
Треонин	600 ± 31	442 ± 27*
Аргинин	316 ± 12	272 ± 9*
Аланин	1026 ± 49	812 ± 19*
Валин	349 ± 11	278 ± 11*
Триптофан	176 ± 10	222 ± 12*
Фенилаланин	134 ± 5	101 ± 2*
Изолейцин	200 ± 6	148 ± 5*
Лейцин	328 ± 12	235 ± 10*
Лизин	1765 ± 97	1356 ± 84*

* — статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

Таблица 3. Структура аминокислотного фонда ткани печени крыс, получавших цинка диаспартат (25 мг/кг внутрижелудочно в течение 10 дней), мкмоль/г, $M \pm m$

Показатель	Контроль	Цинка диаспартат
Общее количество протеиногенных аминокислот	16301 ± 339	14606 ± 342*
Общее количество заменимых аминокислот	14622 ± 362	12995 ± 341*
Общее количество АРУЦ	620 ± 27	526 ± 25*
АРУЦ/ароматические аминокислоты	2,8 ± 0,05	2,6 ± 0,06*

Примечание: АРУЦ – аминокислоты с разветвленной углеродной цепью; * – статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

Таблица 4. Концентрации свободных аминокислот в ткани печени крыс, получавших цинка диаспартат (25 мг/кг внутрижелудочно в течение 10 дней), мкмоль/г, $M \pm m$

Показатель	Контроль	Цинка диаспартат
Глутамин	6805 ± 293,5	5920 ± 223,6*
Гистидин	250 ± 11,7	350 ± 13,8*
Глицин	2841 ± 101,5	1863 ± 23,4*
Аланин	1957 ± 79,1	2228 ± 70,8*
Метионин	71 ± 8,2	45 ± 2,8*
Триптофан	23 ± 1,1	29 ± 1*
Изолейцин	143 ± 5,3	111 ± 5,7*
Лейцин	287 ± 13,7	245 ± 11,3*
Лизин	546 ± 25,6	572 ± 30,9*

* – статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Курсовое внутрижелудочное введение цинка диаспартата приводило в плазме крови к развитию гипоаминоацидемии (общее количество протеиногенных аминокислот снижалось с 8536 ± 292 до 6638 ± 194 мкмоль/л; $p < 0,05$), при снижении уровня как заменимых (с 4897 ± 159 до 3778 ± 89 мкмоль/л; $p < 0,05$), так и незаменимых аминокислот (с 3640 ± 145 до 2860 ± 134 мкмоль/л; $p < 0,05$), но к сохранению соотношения заменимые/незаменимые аминокислоты (табл. 1), что свидетельствует об отсутствии аминокислотного дисбаланса в плазме крови.

Аминокислоты с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ — валин, изолейцин, лейцин) активно участвуют в синтезе белков миоцитами, оказывают инсулиногенное действие. Введение комплекса АРУЦ интенсифицирует биосинтез белка [16]. В данной экспериментальной модели после курсового введения цинка диаспартата в плазме крови животных снижалось общее количество АРУЦ (с 878 ± 28 до 661 ± 25 мкмоль/л; $p < 0,05$) (табл. 1).

Известно, что ряд аминокислот могут синтезироваться в организме (заменимые аминокислоты), их уровни в плазме крови и тканях поддерживаются реакциями гликолиза, функционированием цикла трикарбоновых кислот, а также межорганным метаболизмом азота [13]. Среди индивидуальных показателей свободных заменимых аминокислот в плазме крови при введении цинка диаспартата снижались концентрации аспартата (на 34,1 %), глутамата (на 32,8 %), аспарагина (на 26,5 %), серина (на 29,9 %), глутамина (на 19,9 %), гистидина (на 20,3 %), глицина (на 21,1 %), аргинина (на 13,9 %) и аланина (на 20,9 %) (табл. 2).

Незаменимые аминокислоты (валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин) не синтезируются в организме, и их источником являются белки пищи, а также продукты внутриклеточного протеолиза. Уровни незаменимых аминокислот в тканях определяют интенсивность биосинте-

за белка (ответ по принципу “всё или ничего”) [6]. Относительный дефицит одной или нескольких незаменимых аминокислот препятствует полноценному биосинтезу белка в клетках и может являться причиной аминокислотного дисбаланса [12]. Введение цинка диаспартата снижало уровни незаменимых аминокислот треонина (на 26,3 %), валина (на 20,3 %), фенилаланина (на 24,6 %), изолейцина (на 26 %), лейцина (на 28,4 %) и лизина (на 23,2 %). Одновременно наблюдали увеличение концентрации триптофана (в 1,3 раза) (табл. 2). Поскольку некоторые представители микробиома кишечника способны синтезировать триптофан [1], а катионы цинка являются ростовым фактором для микроорганизмов, входящих в состав микробиома кишечника [5], увеличение триптофана в плазме крови после введения цинка диаспартата позволяет увеличить его доступность для катаболизирующих ферментов. Ряд эффектов, наблюдаемых после введения солей цинка, может быть обусловлен повышенным образованием метаболитов триптофана в тканях (серотонина, кинуренинов, а также воздействием производных индола на арил-углеводородный рецептор).

Таблица 5. Структура аминокислотного фонда ткани вилочковой железы крыс, получавших цинка диаспартат (25 мг/кг внутрижелудочно в течение 10 дней), мкмоль/г, $M \pm m$

Показатель	Контроль	Цинка аспартат
Общее количество протеиногенных аминокислот	16406 ± 267	14580 ± 455*
Общее количество заменимых аминокислот	13745 ± 228	12287 ± 418*
Общее количество незаменимых аминокислот	2539 ± 61	2192 ± 81*
Общее количество АРУЦ	795 ± 24	658 ± 35*
Общее количество ароматических аминокислот	338 ± 16,5	275 ± 17,4*
Глутамат+глутамин	5475 ± 159	4815 ± 239*

Таблица 6. Концентрации свободных аминокислот в ткани вилочковой железы крыс, получавших цинка диаспартат (25 мг/кг внутрижелудочно в течение 10 дней), мкмоль/г, $M \pm m$

Показатель	Контроль	Цинка диаспартат
Серин	606 ± 18	479 ± 16*
Гистидин	137 ± 3,6	117 ± 4,3*
Глицин	3353 ± 91,4	2814 ± 137,7*
Треонин	751 ± 20,4	627 ± 28,3*
Валин	259 ± 6,8	219 ± 10,9*
Фенилаланин	176 ± 7,9	139 ± 9,6*
Изолейцин	174 ± 4,8	143 ± 7,6*
Лейцин	362 ± 13,3	296 ± 17,2*

* — статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

В ткани печени при курсовом введении цинка диаспартата снижалось общее количество протеиногенных аминокислот (с 16301 ± 339 до 14606 ± 342 нмоль/г; $p < 0,05$), заменимых аминокислот (с 14622 ± 362 до 12995 ± 341 нмоль/г; $p < 0,05$), АРУЦ (с 620 ± 27 до 526 ± 25 нмоль/г; $p < 0,05$) (табл. 3). Снижалась концентрация протеиногенных аминокислот: глутамина (на 13 %), метионина (на 36,6 %), изолейцина (на 22,4 %), лейцина (на 14,6 %) и глицина (на 34,4 %). Повышался уровень гистидина (в 1,4 раза), аланина (в 1,2 раза) и триптофана (в 1,2 раза) (табл. 4).

Цинк имеет важное значение для нормального развития и функционирования клеток иммунной системы. Тимулин — гормон, секретируемый эпителиальными клетками вилочковой железы (ВЖ), является цинк-зависимым соединением и находится в плазме крови в двух формах: активной, связанной с цинком, и в неактивной форме, не содержащей цинка. Он необходим для дифференцировки и функции Т-лимфоцитов. Недостаточность цинка приводит к дефициту тимулина и атрофии ВЖ [9].

В ткани ВЖ крыс при курсовом введении цинка диаспартата снижалось общее количество протеиногенных аминокислот (с 16406 ± 267 до 14580 ± 455 нмоль/г; $p < 0,05$), заменимых аминокислот (с 13745 ± 228 до 12287 ± 418 нмоль/г; $p < 0,05$), незаменимых аминокислот (с 2539 ± 61 до 2192 ± 81 нмоль/г; $p < 0,05$), АРУЦ (с 795 ± 24 до 658 ± 35 нмоль/г; $p < 0,05$) (табл. 5). Снижался уровень серина (на 21 %), гистидина (на 14,6 %), глицина (на 16,1 %), треонина (на 16,5 %), валина (на 15,4 %), фенилаланина (на 21 %), изолейцина (на 17,8 %), лейцина (на 18,2 %) (табл. 6). Снижение внутриклеточных концентраций свободных аминокислот свидетельствует об их активной утилизации для биосинтетических процессов и является важной предпосылкой пролиферации клеток ВЖ [7].

Интересно, что в пейеровых бляшках крыс при курсовом введении цинка диаспартата структура пула

свободных протеиногенных аминокислот не изменялась, за исключением повышения концентрации аспартата (в 1,2 раза). Аспартат является анаплеротическим субстратом для цикла трикарбоновых кислот и способен стимулировать образование сукцината и энергии [2], что является положительным эффектом для клеток иммунной системы.

ВЫВОДЫ

1. Введение цинка диаспартата (25 мг/кг внутрижелудочно в течение 10 дней) приводит к гипоаминоацидемии (снижение в среднем на 34 %, $p < 0,05$), что, вероятно, является следствием активного транспорта аминокислот в ткани и использования их в клетках.

2. После введения цинка диаспартата регистрировали уменьшение аминокислотного пула в тканях печени (на 11 %, $p < 0,05$) и вилочковой железы (в среднем на 10 %, $p < 0,05$), что, возможно, обусловлено интенсификацией биосинтеза белка гепатоцитами и пролиферативных процессов в ткани вилочковой железы.

3. Лимфоциты пейеровых бляшек в кишечнике в этих условиях перепрограммируют метаболизм, что сопровождается повышением уровня аспартата (в 1,2 раза, $p < 0,05$), вероятно, с целью его дальнейшей утилизации в цикле Кребса.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Agus, J. Planchais, H. Sokol, *Cell Host Microbe*, **23**(6), 716 – 724 (2018); doi: 10.1016 / j.chom.2018.05.003.
2. H. F. Alkan, J. G. Bogner-Strauss, *Mol. Cell. Oncol.*, **6**(5), 1 – 6 (2019); doi: 10.1080 / 23723556.2018.1536843.
3. C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, et al., *J. Proteome Res.*, **5**(1), 196 – 201 (2006); doi: 10.1021 / pr050361j. PMID: 16396512.
4. S. Bröer, A. Bröer, *Biochem. J.*, **474**(12), 1935 – 1963 (2017); doi: 10.1042 / BCJ20160822.
5. L. Chen, Z. Wang, P. Wang, et al., *Microbiol. Spectr.*, **9**(3), 1 – 18 (2021); doi: 10.1128 / Spectrum.00483-21.
6. D. D. Church, K. R. Hirsch, S. Park, et al., *Nutrients*, **12**(12), 1 – 14 (2020); doi: 10.3390 / nu12123717.
7. G. Gauthier-Coles, J. Vennitti, Z. Zhang, et al., *Nat. Commun.*, **12**, 52 – 82 (2021); doi: 10.1038 / s41467-021-25563-x.
8. K. Grüngreif, D. Reinhold, H. Wedemeyer, *Annals of Hepatol.*, **15**(1), 7 – 16 (2016); doi: 10.5604 / 16652681.1184191.
9. H. Haase, L. Rink, *Immun. Ageing*, **6**(9), 1 – 17 (2009); doi: 10.1186 / 1742-4933-6-9.
10. A. Krężel, W. Maret, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(6), 12 – 37 (2017); doi: 10.3390 / ijms18061237.
11. S. S. Krishna, I. Majumdar, N. V. Grishin, *Nucl. Acids Res.*, **31**, 532 – 550 (2003); doi: 10.1093 / nar / gkg161.
12. A. V. Kurpad, *J. Nutr.*, **148**(10), 1647 – 1649 (2018); doi: 10.1093 / jn / nxy195.
13. A. J. Meijer, *J. Nutr.*, **133**(6), 2057 – 2062 (2003); doi: 10.1093 / jn / 133.6.2057S.
14. M. Moustakas, *Materials (Basel)*, **14**(3), 54 – 59 (2021); doi: 10.3390 / ma14030549.
15. D. Nagalakshmi, K. Sridhar, S. Parashuramulu, *Vet. World*, **8**(9), 1156 – 1162 (2015); doi: 10.14202 / vetworld.2015.1156-1162.
16. M. Neinast, D. Murashige, Z. Arany, *Annu. Rev. Physiol.*, **81**, 139 – 164 (2019); doi: 10.1146 / annurev-physiol-020518-114455.
17. M. W. Thompson, *Biometals*, **35**(2), 187 – 213 (2022); doi: 10.1007 / s10534-022-00373-w.

18. S. Yamasaki, K. Sakata-Sogawa, A. Hasegawa, et al., *J. Cell Biol.*, **177**, 637 – 645 (2007); doi: 10.1083 / jcb.200702081.
19. Y. Yang, C. Liu, Y. L. Lin, et al., *J. Biol. Chem.*, **288**(35), 25638 – 25645 (2013); doi: 10.1074 / jbc. M113.494955.
20. J. P. Zackular, R. J. Knippel, C. A. Lopez, et al., *mSphere*, **5**(2), 1 – 20 (2020); doi: 10.1128 / mSphere.00061-20.

Поступила 02.05.22

PROTEINOGENIC AMINO ACIDS IN RAT TISSUES AFTER COURSE ADMINISTRATION OF ZINC DIASPARTATE

V. M. Sheybak, A. Yu. Pauliukavets*, and E. M. Doroshenko

Grodno State Medical University, Grodno, ul. Gorkogo, 80, Grodno, 230009, Republic of Belarus

* e-mail: anastasiayk@mail.ru

Zinc is one of the most common metals present in biological systems. Various zinc-base compounds are used now to prevent and eliminate zinc deficiency, as well as to make use of its immunostimulating effect. The aim of the study was to analyze the effect of a course of administration of zinc diaspertate on free proteinogenic amino acids in blood plasma, liver tissue and thymus, and in Peyer's patches of rats. It is shown that zinc diaspertate (25 mg/kg intragastrically for 10 days) leads to hypoaminoacidemia (34% decrease on average $p < 0.05$), probably due to the active transport of amino acids into tissues and their subsequent use by cells. At the same time, after the administration of zinc diaspertate, depletion of the amino acid pool in the tissues of the liver (by 11%, $p < 0.05$) and thymus (by 10%, $p < 0.05$) probably attributed to the intensification of protein synthesis by hepatocytes and proliferative processes in thymus tissue was observed. Peyer's patch lymphocytes in the intestine under these conditions reprogram metabolism, which results in an increase in aspartate level (by 1.2 times, $p < 0.05$), probably for further utilization in the Krebs cycle. Among the revealed effects of course administration of zinc diaspertate, an increase in the tryptophan concentration in the blood plasma by 1.3 times ($p < 0.05$), is of particular interest, and requires further study of the mechanism of this effect.

Keywords: zinc diaspertate; free amino acids; liver; thymus; blood plasma; Peyer's patches, rats.