

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ВЛИЯНИЕ ТРИТАРГА НА СПЕКТР ПРОТЕИНОГЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ЛИМФОЦИТАХ

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

Однократное введение тритарга в желудок приводит к разнонаправленному изменению концентраций свободных протеиногенных аминокислот в сыворотке крови и лимфоцитах, выделенных из крови и печени. Через 3 и 24 ч после введения препарата происходят изменения в аминокислотном фонде лимфоцитов, выделенных из крови и печени. Изменения индивидуальных концентраций свободных аминокислот более выражены в лимфоцитах печени по сравнению с лимфоцитами крови. Снижение содержания протеиногенных аминокислот в сыворотке крови отражает поступление этих соединений в клетки и свидетельствует о стимуляции синтеза полипептидов и белков.

Ключевые слова: протеиногенные аминокислоты, кровь, печень, лимфоциты, тритарг

ВВЕДЕНИЕ

Используемые в настоящее время специальные пищевые добавки, как правило, содержат отдельные аминокислоты или их комбинации, клиническое применение которых опирается на концепцию “иммунонутритивной поддержки”, направленной на уменьшение частоты инфекционных осложнений и сокращение времени пребывания пациентов в стационаре [4]. Такой подход переводит ряд нутриентов из разряда пищевых компонентов в группу лекарственных средств. Несомненно, что одной из основных мишеней должна являться иммунная система организма [5]. Недостаточная обеспеченность отдельными аминокислотами заставляет организм использовать собственные белки, что, в конечном итоге, повышает чувствительность к инфекции [6]. При многих патологических состояниях возрастает роль аминокислот как эндогенных биорегуляторов, определяющих эффективность синтеза цитокинов, образования антител и специфических иммуноглобулинов [8]. Одним из определяющих моментов является скорость поступления и, в конечном итоге, обеспеченность клеток иммунной системы протеиногенными аминокислотами, баланс которых определяет скорость биосинтеза протеинов [3].

В нашей лаборатории создана композиция, содержащая аминокислоты аргинин, таурин, микроэлемент цинк (в форме цинка аспарагината) и триптофан (10:6,25:1,75:1) — “тритарг”, использование которой стимулирует метаболизм в лимфоцитах [2].

Целью работы явилось изучение влияния тритарга на спектр протеиногенных аминокислот в сыворотке и лимфоцитах крови, а также лимфоцитах, выделенных из печени крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 18 белых крысах-самках массой 140 – 160 г. Тритарг вводили однократно в желудок в дозе 35 мг/100 г массы. Животных декапировали через 3 или 24 ч. После декапитации кровь отбирали в пробирки с гепарином (25 ЕД/мл), выделяли печень. Из гепаринизированной крови, разведенной в 2 раза физиологическим раствором, в градиенте плотности урографина (1,077 г/см³) выделяли лимфоциты. Дважды отмывали забуференным физраствором путем центрифугирования (10 мин при 1500 об/мин). Ткань печени измельчали ножницами, тщательно растирали в гомогенизаторе в 5 мл забуференного физраствора. Лимфоциты выделяли в градиенте плотности урографина (1,077 г/см³) [2], дважды отмывали забуференным физраствором путем центрифугирования (10 мин при 1500 об/мин). Определение свободных аминокислот в хлорнокислых экстрактах диализатов лимфоцитов проводили методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и определением 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, 280/340 нм — для триптофана). Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработку данных — с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. [1]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что через 3 ч после введения тритарга наблюдается уменьшение пула протеиногенных аминокислот в сыворотке крови (в 2 раза), которое сохраняется через сутки после введения препарата (табл. 1).

¹ ЦНИЛ (зав. — В. М. Шейбак) УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230015, Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80.

Таблица 1. Содержание протеиногенных аминокислот в сыворотке крови после введения тритарга, мкмоль/л, $M \pm m$

Аминокислота	Контроль	3 ч	24 ч
Аспарагиновая кислота	41,4 ± 6,65	20,5 ± 2,86*	33,6 ± 4,67
Глутаминовая кислота	140 ± 11,1	72 ± 7,4*	131,1 ± 8,22
Аспарагин	95,5 ± 10,72	48,1 ± 6,42*	105,2 ± 7,64
Серин	359 ± 32,1	206,4 ± 27,61*	290,9 ± 21,05
Глутамин	594,5 ± 67,84	318 ± 36,4*	467,1 ± 39,19
Гистидин	150,2 ± 8,76	94 ± 7,3*	107,7 ± 5,73*
Глицин	685,2 ± 53,89	440,1 ± 36,53*	525,4 ± 55,22
Треонин	322,3 ± 50,43	182,5 ± 27,62*	202,9 ± 11,73*
Аргинин	250,7 ± 28,85	202,8 ± 24,31	189,1 ± 13,16
Аланин	753,1 ± 76,83	295,7 ± 53,09*	559,9 ± 45,18
Тирозин	90,4 ± 11,19	30 ± 6,6*	41,3 ± 4,03*
Валин	204,5 ± 26,31	101,8 ± 9,95*	113,2 ± 11,39*
Метионин	66,5 ± 8,94	36,5 ± 4,96*	42,2 ± 3,01*
Триптофан	56,1 ± 6,60	42,4 ± 7,29	41,8 ± 6,43
Изолейцин	105 ± 15,6	56,9 ± 5,84*	57,9 ± 5,72*
Фенилаланин	48,4 ± 6,14	32,4 ± 4,43	44,6 ± 4,54
Лейцин	157,7 ± 27,70	85,6 ± 7,50*	77,9 ± 5,89*
Лизин	372,4 ± 81,38	407,7 ± 102,24	488,4 ± 83,56
Пролин	240,4 ± 57,38	25,5 ± 3,10*	67,6 ± 11,35*
Сумма протеиногенных аминокислот	5335 ± 532	2665 ± 322*	3581 ± 249*

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: * — достоверно относительно контрольной группы животных ($p < 0,05$).

При этом примерно в равной степени изменяются концентрации заменимых и незаменимых аминокислот, что позволяет утверждать о сохранении аминокислотного баланса и увеличении скорости биосинтеза белка. После однократного введения тритарга в сыворотке крови снижались концентрации заменимых аминокислот — аспартата (на 50 %), глутамата (на 49 %), аспарагина (на 50 %), глутамина (на 47 %), серина (на 43 %), глицина (на 36 %), гистидина (на 38 %), пролина (на 89 %), аланина (на 60 %). Среди незаменимых аминокислот обнаружено достоверное уменьшение содержания треонина (на 43 %), валина (на 50 %), изолейцина (на 46 %), лейцина (на 46 %), тирозина (на 67 %), метионина (на 45 %). Большинство указанных показателей аминокислотного пула через 24 ч возвращались к уровню контрольных значений (см. табл. 1). Продолжали оставаться сниженными концентрации треонина, тирозина, валина, изолейцина, лейцина и метионина, а также пролина и гистидина. Степень падения уровней этих аминокислот существенно не отличалась от таковой через 3 ч после введения тритарга. Концентрации аргинина и триптофана, аминокислот, входящих в состав препарата, в анализируемые сроки эксперимента существенно не изменялись.

В отличие от данных, полученных для сыворотки крови, в лимфоцитах крови после введения тритарга общий уровень протеиногенных аминокислот увели-

Таблица 2. Содержание протеиногенных аминокислот в лимфоцитах крови после введения тритарга, нмоль/ 10^6 клеток, $M \pm m$

Аминокислота	Контроль	3 ч	24 ч
Аспарагиновая кислота	6,3 ± 0,99	7,5 ± 0,82	9 ± 1
Глутаминовая кислота	3,6 ± 0,65	7,9 ± 1,07*	5,8 ± 0,62*
Аспарагин	1,2 ± 0,23	2,7 ± 0,45*	1,2 ± 0,31
Серин	5,4 ± 0,37	12,3 ± 1,57*	20,7 ± 4,22*
Глутамин	1,1 ± 0,24	8,9 ± 2,73*	3,2 ± 0,86*
Гистидин	1 ± 0,22	2,8 ± 0,49*	2 ± 0,4°
Глицин	10,4 ± 0,57	22,4 ± 2,94*	15,4 ± 2,14
Треонин	2 ± 0,4	7,1 ± 1,72*	5,1 ± 0,88*
Аргинин	1,4 ± 0,16	5 ± 1,1*	1,8 ± 0,4
Аланин	4,1 ± 0,73	11,3 ± 1,96*	7,8 ± 1,26*
Тирозин	0,7 ± 0,14	1,6 ± 0,36*	0,8 ± 0,2
Валин	2,9 ± 0,33	8,2 ± 1,36*	2,5 ± 0,42
Метионин	0,5 ± 0,09	1,4 ± 0,33*	0,4 ± 0,07
Триптофан	0,4 ± 0,19	0,95 ± 0,28	0,3 ± 0,05
Изолейцин	1,4 ± 0,31	3,1 ± 0,55*	0,9 ± 0,16
Фенилаланин	0,6 ± 0,15	1,4 ± 0,31*	0,8 ± 0,14
Лейцин	1,1 ± 0,25	3,3 ± 0,73*	1,4 ± 0,2
Пролин	16,4 ± 0,98	22,2 ± 2,33*	17,5 ± 2,81
Лизин	8 ± 1,5	10,9 ± 1,91	4,9 ± 0,9
Сумма протеиногенных аминокислот	78 ± 6,3	152 ± 20,3*	98 ± 14,8

чивался почти в 2 раза и составил $152 \pm 20,3$ нмоль/ 10^6 клеток против $78 \pm 6,3$ нмоль/ 10^6 клеток в контрольной группе. Через 3 ч после введения тритарга в лимфоцитах крови повышались уровни большинства протеиногенных аминокислот: заменимых — глутамата (в 2,2 раз), аспарагина (в 2,3 раз), серина (в 2,3 раз), глутамина (в 8 раз), гистидина (в 2,8 раз), глицина (в 2,2 раз), аргинина (в 3,6 раз), пролина (в 1,4 раз); незаменимых — треонина (в 3,6 раз), тирозина (в 2,3 раз), валина (в 2,8 раз), метионина (в 2,8 раз), изолейцина (в 2,2 раз), фенилаланина (в 2,3 раз), лейцина (в 3 раза). Оставались также повышенными через 24 ч после введения препарата глутамат, серин, глутамин, аланин, треонин (табл. 2).

Изменения концентраций протеиногенных аминокислот в лимфоцитах, выделенных из печени, после введения тритарга отличаются от содержания этих соединений в сыворотке крови и лимфоцитах крови. Так, если общее количество протеиногенных аминокислот в лимфоцитах печени в контрольной группе составляло $75 \pm 11,3$ нмоль/ 10^6 клеток, то через 3 ч после введения тритарга оно увеличивалось до $341 \pm 60,1$ нмоль/ 10^6 клеток. Через 3 ч после введения препарата происходило увеличение фонда заменимых аминокислот с $60 \pm 9,9$ нмоль/ 10^6 клеток до $279 \pm 45,9$ нмоль/ 10^6 клеток и повышение концентраций незаменимых аминокислот с $15 \pm 1,3$ нмоль/ 10^6 клеток до $62 \pm 14,8$ нмоль/ 10^6 клеток. Однако через 24 ч происходило снижение содержания незаменимых аминокис-

Таблица 3. Содержание протеиногенных аминокислот в лимфоцитах, выделенных из печени крыс, после введения тритарга, нмоль/10⁶ клеток, M ± m

Аминокислота	Контроль	3 ч	24 ч
Аспарагиновая кислота	8,8 ± 1,60	30,1 ± 8,77*	4,7 ± 0,41*
Глутаминовая кислота	5,6 ± 0,86	40,8 ± 9,38*	3,4 ± 0,36*
Аспарагин	1,1 ± 0,22	6,5 ± 1,26*	0,5 ± 0,09*
Серин	6,5 ± 1,67	23,6 ± 6,82*	3,8 ± 0,99
Глутамин	1,7 ± 0,31	35 ± 5,5*	1,8 ± 0,37
Гистидин	1,3 ± 0,32	9,5 ± 2,21*	0,9 ± 0,21
Глицин	11,8 ± 1,89	76,1 ± 13,68*	8,2 ± 1,73
Треонин	2,5 ± 0,45	11,7 ± 3,04*	1,3 ± 0,35
Аргинин	1,5 ± 0,25	3,9 ± 1,41	0,5 ± 0,06*
Аланин	6,6 ± 1,23	34,9 ± 5,33*	4,1 ± 0,87
Тирозин	1 ± 0,2	4 ± 1,1*	0,5 ± 0,06*
Валин	2,6 ± 0,54	9,1 ± 1,85*	1,5 ± 0,36
Метионин	0,4 ± 0,03	3 ± 0,95*	0,18 ± 0,02*
Триптофан	0,3 ± 0,06	0,9 ± 0,11*	0,1 ± 0,01*
Изолейцин	1,3 ± 0,27	4,98 ± 0,97*	0,7 ± 0,15
Фенилаланин	1 ± 0,2	4,1 ± 1,03*	0,4 ± 0,09*
Лейцин	1,8 ± 0,25	8,3 ± 1,89*	1,7 ± 0,89
Лизин	3,8 ± 0,85	20 ± 5,3*	2,7 ± 0,53
Пролин	13,4 ± 4,13	18,7 ± 5,03	12,7 ± 3,36
Сумма протеиногенных аминокислот	75 ± 11,3	341 ± 60,1*	53 ± 9,1

кислот с $15 \pm 1,3$ нмоль/10⁶ клеток до $9 \pm 1,5$ нмоль/10⁶ клеток. Соотношение количеств заменимых и незаменимых аминокислот в лимфоцитах печени существенно не изменяется.

Через 3 ч после введения тритарга в лимфоцитах печени увеличиваются концентрации всех протеиногенных аминокислот, кроме аргинина (табл. 3). Через сутки после введения тритарга наблюдается снижение уровней протеиногенных аминокислот в лимфоцитах печени, а именно, заменимых — аспартата, глутамата, аспарагина, аргинина, незаменимых — тирозина, метионина, триптофана, фенилаланина (см. табл. 3).

Поскольку одновременно со снижением протеиногенных аминокислот в сыворотке крови концентрации этих аминокислот повышаются в лимфоцитах печени и крови, можно предположить, что происходит активный транспорт этих аминокислот в клетки иммунной системы [6]. Уровни незаменимых аминокислот, как в

лимфоцитах крови, так и в лимфоцитах печени снижаются через 24 ч после введения тритарга, что может свидетельствовать об их включении в синтез полипептидов, а также участии их в процессе глюконеогенеза либо окислении их в пероксисомах [7].

Из полученных результатов очевидно, что содержание протеиногенных аминокислот в лимфоцитах печени и лимфоцитах крови в контрольной группе отличаются незначительно (табл. 2 и 3), но после введения тритарга повышение уровней аминокислот в лимфоцитах, выделенных из печени, и лимфоцитах, выделенных из крови, происходит в различной степени. Увеличение содержания протеиногенных аминокислот гораздо значительнее в лимфоцитах печени по сравнению с лимфоцитами крови. Это можно объяснить тем, что до 70 % крови поступает через воротную вену, собирающую кровь от пищеварительного тракта, где происходит всасывание соединений, поступающих энтеральным путем.

ВЫВОДЫ

1. После введения тритарга происходят разнонаправленные изменения концентраций свободных протеиногенных аминокислот в сыворотке крови и лимфоцитах, выделенных из крови и печени.

2. Внутрижелудочное введение тритарга через 3 и 24 ч изменяет аминокислотный фонд лимфоцитов крови и печени. Изменения индивидуальных концентраций свободных аминокислот более выражены в лимфоцитах печени по сравнению с лимфоцитами крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. М. Дорошенко, *Республиканская научная конференция по аналитической химии с международным участием "Аналитика РБ — 2010" сборник тезисов докладов*, Минск (2010).
2. А. Ю. Капитурко, *Актуальные теоретические и практические аспекты патофизиологии материалы республиканской конференции с международным участием*, Гродно (2010), сс. 291 – 295.
3. М. В. Робинсон, Л. Б. Топоркова, В. А. Труфакин, *Морфология и метаболизм лимфоцитов*, Наука (1986).
4. А. Davidson, *Nutr Times*, № 3, 4 – 10 (2004).
5. L. O'Flaherty, DJ. Bouchier-Hayes, *Proc Nutr Soc.*, № 7, 58 (1999).
6. R. Robert, R. Wolfe, *J. Clin. Nutr.*, № 7, 72 (2000).
7. M. Tamopolsky, *Nutrition*, № 5, 662 – 668 (2004).
8. G.Wu, *J. Amino Acids*, № 3, 22 (2009).

Поступила 04.11.10

EFFECT OF TRITARG ON PROTEINOGENIC AMINO ACID SPECTRUM IN BLOOD SERUM AND LYMPHOCYTES

V. M. Sheibak, A. Y. Pauliukavets, M. V. Goretskaya, and E. M. Doroshenko

Central research Laboratory, Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, Grodno, 230015, Belarus

Single intragastric injection of tritarg leads to different multidirectional changes in the concentration of free proteinogenic amino acids in the blood serum and lymphocytes isolated from the blood and liver. Changes in the amino acid stock of blood and liver lymphocytes were observed 3 and 24 hours after the drug injection. The changes in concentrations of individual free amino acids are more pronounced in liver lymphocytes than in blood lymphocytes. There is a decrease in the content of proteinogenic amino acids in blood serum, which may reflect the supply of these compounds to cells and is indicative of the stimulation of polypeptide and protein synthesis.

Key words: Proteinogenic amino acids, blood, liver, lymphocytes, tritarg