

УДК 577.112.37:612.112.94

DOI: 10.14427/jipai.2017.4.6

Свободные аминокислоты тимуса после внутрижелудочного введения животным инфезола40

В.М. Шейбак, А.Ю. Павлюковец, В.Ю. Смирнов, Л.Н. Шейбак

УО «Гродненский государственный медицинский университет» Гродно, Беларусь

Free amino acids of tymus after intragastric introduction infesol40 of animal

V.M. Sheibak, A.Yu. Pavlyukovets, V.Yu. Smirnov, L.N. Sheibak

Grodno State Medical University Grodno, Belarus

Аннотация

Питание является одним из основных факторов, определяющих функциональную активность компонентов иммунной системы и дефицит незаменимых факторов питания является наиболее распространенной причиной иммунодефицитов. Целью исследования явился анализ концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в ткани тимуса крыс в динамике после внутрижелудочного введения Инфезола40.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на 30 беспородных крысах, получавших внутрижелудочно Инфезол 40 в дозе 20 мл/кг массы (аминокислотный препарат для парентерального питания, содержащий заменимые аминокислоты: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, гистидин, глицин, аргинин, аланин, незаменимые аминокислоты: треонин, валин, метионин, триптофан, фенилаланин, изолейцин, лейцин и лизин 2,0, а так же вспомогательные вещества). Для анализа использовали ткань тимуса. Определение свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ. **Результаты и обсуждение.** Во все изучаемые сроки после введения смеси аминокислот в ткани тимуса снижалось соотношение аргинин/орнитин и фосфоэтанолламин/этанолламин (вследствие повышения концентрации этаноламина), увеличивались концентрации незаменимых аминокислот метионина и фенилаланина, а также орнитина. Таким образом, энтеральное поступление аминокислот оказывает выраженное воздействие на метаболизм аминокислот и сопряженные с ним процессы в ткани тимуса. Характер и выраженность наблюдаемых изменений позволяет предположить наличие стимуляции пролиферативных процессов в ткани тимуса, однако, нельзя исключить формирование аминокислотного дисбаланса в этом центральном органе иммунной системы, что может быть причиной последующего развития иммунодефицита или нарушения процессов дифференциации клеток иммунной системы.

Summary

Nutrition is one of the main factors that determine the functional activity of the components of the immune system and the deficiency of irreplaceable nutritional factors is the most common cause of immunodeficiency. The aim of the study was to analyze the concentrations of free amino acids and their nitrogen-containing metabolites after intragastric administration of Infezol40 in thymus tissues of rats.

Materials and methods. The experiment was carried out on 30 rats that received intragastric Infezol40 in a dose of 20 ml / kg of body weight. The thymus tissue was used for the analysis. Determination of free amino acids was performed by reversed-phase HPLC.

Results and discussion. In all the studied periods, after the introduction of a mixture of amino acids in the thymus tissue the arginine/ornithine ratio and phosphoethanolamine/ethanolamine ratio decreased (due to an increase in the ethanolamine concentration), also the concentrations of essential amino acids methionine, phenylalanine and ornithine increased.

Thus, enteral intake of amino acids has a pronounced effect on the metabolism of amino acids and the associated with it processes in the tissues of the thymus. The nature and severity of the observed changes suggest the presence of stimulation of proliferative processes in the thymus tissue, however, it is impossible to exclude the formation of an amino acid imbalance in this central organ of the immune system, which may be the cause of the subsequent development of immunodeficiency or disturbance of the processes of differentiation of cells of the immune system.

Ключевые слова

Тимус, свободные аминокислоты, инфезол40, крысы.

Keywords

Thymus, free amino acids, infezol40, rats.

Питание является одним из основных факторов, определяющих функциональную активность компонентов иммунной системы и дефицит незаменимых факторов питания является наиболее распространенной причиной иммунодефицитов. Недостаточное потребление белка, а значит незаменимых аминокислот, приводит к значительным нарушениям клеточного иммунного ответа, функции фагоцитов, системы комплемента, снижению уровня секреторного иммуноглобулина А и цитокинов [1]. В свою очередь, активация иммунитета приводит к увеличению катаболизма белков скелетных мышц, одновременно с повышением синтеза регуляторных белков и цитокинов клетками печени и селезенки. Очевидно, что величение потребности в аминокислотах и стимуляция процессов аутофагии повышает значимость обеспеченности организма незаменимыми аминокислотами [2]. Между тем, остается неизученным вопрос и влияния избыточного потребления аминокислотных добавок при физических нагрузках, поскольку это часто сопровождается снижением иммунитета [3]. Клинические и экспериментальные исследования доказали, иммуномодулирующие свойства отдельных аминокислот и их смесей. Например, хорошо известно, что доступность аргинина важна для нормальной пролиферации и функционирования Т-лимфоцитов, при недостаточности аргинина наблюдается прогрессивная редукция (около 25% от базального уровня) числа Т-клеточных рецепторов на клеточной мембране [4]. Лейцин - незаменимая аминокислота, которая также играет важную роль в развитии клеточного иммунного ответа, а именно в активации Т-лимфоцитов, что связано ролью лейцина в качестве активатора комплекса mTORC1, инициирующего синтез белка [5]. В свою очередь, глутамин является незаменимым субстратом для нормального функционирования иммунной системы кишечника, известно, что недостаток глутамина резко ограничивает способность лимфоцитов отвечать на митогенную стимуляцию [6].

В этой связи представляется актуальным исследование влияния однократного энтерального введения смеси аминокислот на профиль свободных аминокислот и их производных в центральном органе иммунной системы тимусе. Однако,

в литературе отсутствуют сведения о динамике изменений аминокислотного профиля в тимусе после энтерального введения смеси аминокислот.

Целью исследования явился анализ концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в ткани тимуса крыс в динамике после внутрижелудочного введения Инфезола40.

Материалы и методы

Эксперимент проводился 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, группам 2, 3, 4, 5 – внутрижелудочно Инфезол 40 в дозе 20 мл/кг массы, что соответствует 800 мг смеси аминокислот на кг массы животного. Инфезол40 аминокислотный препарат для парентерального питания, содержащий заменимые аминокислоты: аспарагиновая кислота 2,0 г/л, глутаминовая кислота 5,0 г/л, гистидин 1,35 г/л, глицин 7,0 г/л, аргинин 4,55 г/л, аланин 4,0 г/л, незаменимые аминокислоты: треонин 1,6 г/л, валин 2,25 г/л, метионин 1,75 г/л, триптофан 0,5 г/л, фенилаланин 3,15 г/л, изолейцин 2,1 г/л, лейцин 2,75 г/л и лизин 2,0 г/л, а так же вспомогательные вещества: ксилит 50 г/л, натрия ацетат 3,4 г/л, калия хлорид 1,86 г/л, магния хлорид 0,51 г/л, натрия гидроксид 0,6 г/л, натрия дисульфит, максимум 0,02 г/л и вода для инъекций до 1000 мл. Декапитация животных осуществлялась 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 ткань тимуса. 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

проводили 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.

Результаты и обсуждение

Во все изучаемые сроки после введения смеси аминокислот в ткани тимуса снижалось соотношение аргинин/орнитин и фосфоэтанолламин/этанолламин (вследствие повышения concentra-

ции этаноламина), увеличивались концентрации незаменимых аминокислот метионина и фенилаланина, а также орнитина (табл. 1 и 2, рис. 1г). Повышение уровня орнитина, вероятно, можно рассматривать как маркер стимуляции процессов пролиферации в тимусе. Известно, что орнитин при участии орнитиндекарбоксилазы превращается в путресцин, на основе которого затем образуются спермидин и спермин. Они входят в состав хроматина и участвуют в репликации ДНК и их концентрация значительно увеличива-

Таблица 1. Концентрации свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в ткани тимуса 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
Цистеиновая кислота	40±3	35±1	32±1*	30±1*	35±2
Глутамин	2018±128	2545±89*	2546±268	1590±76*	2007±180
Гистидин	156±7	147±5	128±9*	124±8*	140±20
3-метилгистидин	71±6	72±4	56±4	45±2*	64±7
Глицин	3690±197	4014±188	3814±304	4174±332	4603±291*
Треонин	1804±145	1211±54*	1038±150*	1554±134	1568±259
Цитруллин	151±8	144±9	162±21	151±10	180±9*
Аргинин	402±26	482±14*	527±37*	448±23	469±11*
β-аланин	178±13	158±3	160±15	115±6*	145±12
γ-аминомасляная кислота	149±8	172±14	189±17	201±16*	215±11*
Этанолламин	63±7	90±6*	82±6*	86±5*	111±12*
Метионин	116±4	143±7*	161±10*	146±8*	141±7*
Фенилаланин	129±4	173±7*	184±17*	159±8*	167±4*
Изолейцин	230±9	303±16*	307±26*	264±17	263±10*
Гидроксизин	84±5	93±2	112±12*	109±6*	114±15*
Лейцин	389±12	471±25	481±39*	420±30	398±12
Орнитин	40±2	62±7*	77±8*	83±4*	80±8*

Таблица 2. Структура пула свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в ткани тимуса крыс, получавших Инфезол40 (20 мл/кг внутривенно), М±m

	Контроль	Инфезол 10 мин	Инфезол 20 мин	Инфезол 30 мин	Инфезол 45 мин
Общее количество заменимых аминокислот	24191±693	26513±1020	25339±1538	23142±1050	26490±750*
Заменимые/незаменимые аминокислоты	5,98±0,24	7,10±0,26*	7,26±0,59	5,76±0,30	6,91±0,59
АРУЦ	1085±37	1270±65*	1311±108	1221±86	1145±36
Аргинин/орнитин	10,16±0,49	8,12±0,58*	7,01±0,39*	5,45±0,20*	6,08±0,49*
Аргинин/цитруллин	2,70±0,20	3,38±0,12*	3,46±0,40	3,00±0,16	2,64±0,18
Фосфоэтанолламин/этанолламин	339±26	266±16*	264±9*	231±13*	210±18*
Глутамат+глутамин	12866±417	14478±586*	13571±870	11777±657	13676±494

ется в период активного деления клеток и роста тканей [7].

Уже через 10 мин после введения Инфезола40 в ткани тимуса регистрировали увеличение общего количества аминокислот с разветвленной углеродной цепью (изолейцин, лейцин, валин), относительного количества заменимых аминокислот, о чем свидетельствовало снижение соотношения заменимые/незаменимые аминокислоты, а также снижается соотношение аргинин/цитруллин (табл. 2). Одновременно повышались концентрации глутамина (рис. 1в), изолейцина (рис. 1б) и аргинина (рис. 1г), но уровень незаменимой аминокислоты треонин (рис. 1б) снижался (табл. 1).

В ткани тимуса через 20 мин были повышены уровни изолейцина, лейцина и гидроксилизина, но снижались концентрации треонина (рис. 1б), гистидина и цистеиновой кислоты (табл. 1).

Через 30 мин после введения Инфезола40 в тимусе обнаруживалось снижение concentra-

ций 3-метилгистидина, гистидина и цистеиновой кислоты (табл. 1).

Введения смеси аминокислот через 45 мин характеризовалось увеличением общего количества заменимых аминокислот (табл. 2, рис 1а), концентраций аргинина, глицина, а также азотсодержащих метаболитов аминокислот - гидроксилизина и γ -аминомасляной кислоты (табл.1).

Анализ характера изменений концентраций аминокислот, входящих в состав Инфезол40, показал, что во все сроки эксперимента статистически значимо в ткани тимуса изменялось содержание метионина и фенилаланина (3,5% и 5,6% от всех входящих в состав смеси аминокислот, соответственно). Следует отметить, что концентрация содержащегося в наибольшем количестве глицина (27,6% от всех входящих в состав раствора аминокислот) повышался в ткани тимуса только через 45 мин – в 1,3 раза. Существенно в ткани тимуса после энтерального введения Инфезола40 изменялось содержание

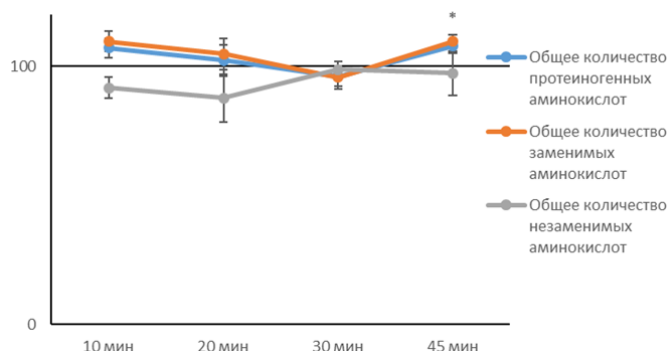


Рисунок 1а. Изменение общего количества свободных протеиногенных аминокислот в тимусе крыс после введения Инфезола40. Примечание: здесь и рисунках 3б-3д * – статистически значимые различия относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

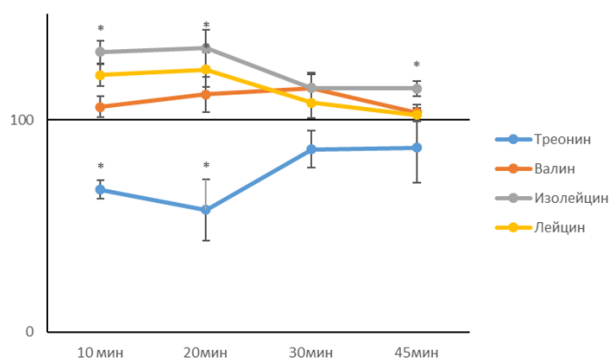


Рисунок 1б. Изменение концентраций треонина, валина, изолейцина и лейцина в тимусе крыс после введения Инфезола40.

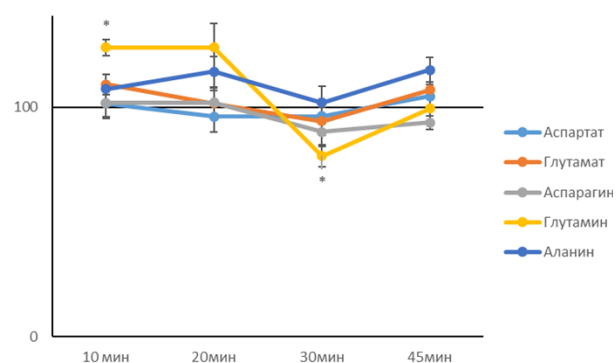


Рисунок 1в. Изменение концентраций аспартата, глутамата, аспарагина, глутамина и аланина в тимусе крыс после введения Инфезола40

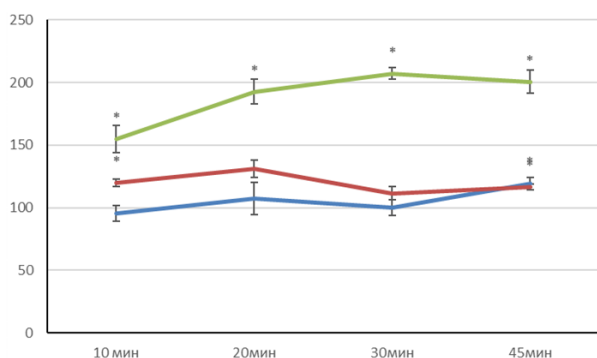


Рисунок 1г. Изменение концентраций аргинина, цитруллина и орнитана в тимусе крыс после введения Инфезол40

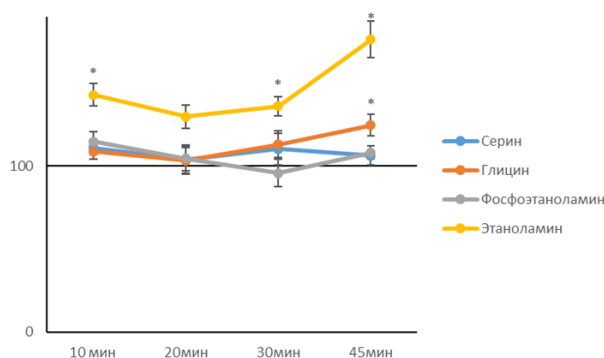


Рисунок 1д. Изменение концентраций серина, глицина, фосфоэтанолламина и этаноламина в тимусе крыс после введения Инфезол40

аргинина, составляющего 7,7% от количества входящих в раствор аминокислот, лейцина (4%) и изолейцина (6,1%).

Таким образом, энтеральное поступление аминокислот оказывает выраженное воздействие на метаболизм аминокислот и сопряженные с ним процессы в ткани тимуса. Характер и выраженность наблюдаемых изменений позволяет

предположить наличие стимуляции пролиферативных процессов в ткани тимуса, однако, нельзя исключить формирование аминокислотного дисбаланса в этом центральном органе иммунной системы, что может быть причиной последующего развития иммунодефицита или нарушения процессов дифференциации клеток иммунной системы.

Литература

1. Cunningham-Rundles S., McNeeley D.F., Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; Vol. 115; №6: 1119-11128.
2. Humphrey, B.D., Stephensen, C.B., Calvert C.C. et al. Glucose and cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2004; Vol.138: 515-525.
3. Brolinson P.G., Elliott D. Exercise and the immune system. *Clin Sports Med.* 2007; Vol.26; №3: 311-319.
4. Ochoa J.B., Strange J., Kearney P. et al. Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte

subpopulations. *J Parenter Enteral Nutr.* 2001; Vol. 25; №1: 23-29.

5. Ananieva E.A., Powell J.D., Hutson S.M. Leucine Metabolism in T Cell Activation: mTOR Signaling and Beyond. *Adv Nutr.* 2016; Vol.7; №4: 798-805
6. Fan J., Wu L., Li G., Tao S. et al Effects of enteral nutrition with parenteral glutamine supplementation on the immunological function in septic rats. *Br J Nutr.* 2015; Vol.113; №11: 1712-1722.
7. Sivashanmugam M., Jaideva J., Umashankar V. Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomed Pharmacother.* 2017; Vol. 86: 185-194.

Сведения об авторах:

Шейбак В.М. – профессор кафедры биологической химии, УО ГрГМУ.

Павлюковец А.Ю. – доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, УО ГрГМУ.

Смирнов В.Ю. – старший научный сотрудник НИЛ, УО ГрГМУ.

Шейбак Л.Н. – профессор 2-ой кафедры детских болезней, УО ГрГМУ.

Поступила 18.10.2017 г.