

ВОПРОСЫ АЛКОГОЛИЗМА

ВЛИЯНИЕ ИНФЛИКСИМАБА НА СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ НА ФОНЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

М. В. Горецкая¹, В. М. Шейбак¹, Е. М. Дорошенко¹, П. Ч. Кирвель²

На крысах линии Вистар с алкогольной интоксикацией в течение 10 недель (жидкая диета Либера — Де Карли) изучены дозозависимые эффекты препаратов моноклональных антител к фактору некроза опухоли α (инфликсимаб). Показано, что курсовое внутривенное введение инфликсимаба в течение последних 10 дней интоксикации в дозе 1 или 10 мг/кг вызывает изменения отдельных показателей пула свободных аминокислот и аминокислотного баланса в лимфоцитах крови. Инфликсимаб на фоне алкогольной интоксикации дозозависимо повышает фонд свободных аминокислот и активирует их метаболизм в лимфоцитах крови, что, вероятно, связано с инактивацией TNF α и адаптивными изменениями в системе транспорта аминокислот.

Ключевые слова: крысы; лимфоциты; аминокислоты; антитела к TNF α ; алкогольная интоксикация

ВВЕДЕНИЕ

Лимфоциты могут существовать в разных состояниях активности — от покоящихся до находящихся на различных стадиях дифференцировки или активированных лимфоцитов. Последние являются наиболее метаболически активной и быстро пролиферирующей частью популяции иммунных клеток в организме. Наряду с активацией энергетического обмена в лимфоцитах экспрессируются транспортные белки для переноса нутриентов. Этот процесс регулируется сигнальными механизмами, которые координируют метаболизм макронутриентов в лимфоцитах и генерацию АТФ для обеспечения жизнеспособности пролиферирующих клеток [13, 17, 18, 21]. Так, лигирование Т-клеточного ко-стимулирующего рецептора CD28 или связывание антигена рецепторами В-клеток активирует фосфатидилинозитол-3-киназу, что запускает механизм потребления глюкозы и гликолиз [16, 18]. Известно, что в созревающих лимфоцитах гемопоэтические цитокины и трофические факторы, в частности IL-7, координируют весь процесс путем влияния на метаболизм клеток [21]. От потребления макронутриентов и генерации энергии зависит эффективность пролиферации и эффекторная функция лимфоцитов.

Известно, что аминокислоты относятся к соединениям, содержание и метаболизм которых в тканях существенно изменяется при алкогольной интоксикации. Развивающийся дисбаланс усиливает потребность в отдельных аминокислотах [9]. Метаболическая потребность отражает необходимое количество для поддержания положительного баланса в синтезе белка, обязательных количеств аминокислоты для полного окисления с целью получения энергии (обычно 10 – 15 %), синтеза непротеи-

ногенных продуктов, включая биогенные амины, полиамины и другие специфические соединения, обладающие высокой биологической активностью [14]. Свободные аминокислоты в лимфоцитах используются для синтеза полиаминов, оптимизирующих биосинтез нуклеиновых кислот, а также для синтеза регуляторных пептидов и белков. При хронической алкогольной интоксикации снижение числа лимфоцитов происходит за счет уменьшения популяции Т-лимфоцитов [3], сдвига соотношения Th1/Th2, снижения концентрации в крови интерферона- γ , IL-2, IL-4, в меньшей степени — IL-6, IL-10 [5, 7]. Повышение циркулирующего уровня фактора некроза опухоли альфа (TNF α) и других провоспалительных цитокинов является одним из факторов, способствующих развитию алкогольного гепатита, инициирует лейкоцитарную инфильтрацию печени и апоптоз гепатоцитов [4, 15]. Доказано, что концентрация TNF α в крови коррелирует с тяжестью поражения печени [2]. В свою очередь лиганд-рецепторные взаимодействия с участием TNF α приводят к активации каспазы-8, что стимулирует развитие апоптоза лимфоцитов вследствие повышения проницаемости митохондриальной мембраны [1].

Ранее нами показана модуляция аминокислотного спектра лимфоцитов крови при введении в организм ряда биологически активных соединений, для которых характерна различная выраженность иммунного ответа [11, 12]. Показано, что снижение воспалительной реакции можно получить, используя инфликсимаб — химерное соединение, созданное на основе гибридных мышинных и человеческих IgG₁ моноклональных антител, которое является селективным иммунодепрессантом, обладающим высоким аффинитетом к TNF α [22, 23].

Целью работы явилась оценка аминокислотного фонда в лимфоцитах крови при введении на фоне алкогольной интоксикации ингибитора TNF α .

¹ Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80.

² Гродненский филиал, “Государственное научное учреждение Институт биоорганической химии НАНБ”, Беларусь, Гродно.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах-самках линии Вистар массой 200–240 г. Контрольные животные ($n = 8$) получали в течение 10 недель искусственный рацион на основе мальтодекстрина (жидкая диета Либера — Де Карли) [20]. В рационе опытных животных ($n = 8$) мальтодекстрин изокалорийно заменяли этанолом. Группе опытных животных на фоне данного рациона в течение последних 10 дней ежедневно внутривенно вводили инфликсимаб (gemicade, “Shering-Plough”, США) в дозе 1 мг/кг ($n = 8$) или 10 мг/кг ($n = 8$). После декапитации кровь отбирали в пробирки с гепарином (25 ЕД/мл), в градиенте плотности урографина (1,077 г/см³) выделяли лимфоциты крови, в диализатах которых методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определяли свободные аминокислоты и их производные 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 измерения осуществляли с помощью хроматографической системы Agilent 1100. Прием и обработку данных проводили, используя программу Agilent ChemStation A10.01. Математическая обработка данных выполнена параметрическим методом, используя критерий Стьюдента, с помощью программы Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение концентрации свободных аминокислот в лимфоцитах крови при хронической алкогольной интоксикации показало увеличение аминокислотного фонда протеиногенных аминокислот, что было обусловлено повышением, главным образом, фракции незаменимых аминокислот (НА). Среди НА в большей степени возрастали концентрации лейцина и лизина (табл. 1). Содержание нутриентов в лимфоцитах возрастает в условиях их активации, что во многом предопределяет интенсивность и качество иммунного ответа [6, 10].

Некоторое повышение в лимфоцитах содержания протеиногенных аминокислот (особенно лейцина, регулирующего синтез белка на уровне транскрипции), а также одновременное снижение уровней анализируемых нами азотсодержащих метаболитов (соотношение “протеиногенные аминокислоты/производные аминокислот” возрастало), позволяет предполагать повышенный транспорт аминокислот в лимфоциты, что стимулирует их биосинтетическую активность. Повышение содержания орнитина (табл. 3), вероятно, необходимо для синтеза полиаминов и пролиферации Т-лимфоцитов [8, 19].

Одновременно у животных, получавших этанол, отмечали снижение количества таурина в лимфоцитах, который является конечным продуктом метаболизма метионина и цистеина. При этом содержание цистатионина возрастало практически в 2 раза (табл. 2). Цистатионин является промежуточным соединением на пути превращения метионина в цистеин, тогда как таурин — основ-

Таблица 1. Изменение пула протеиногенных аминокислот в лимфоцитах крови после курсового введения инфликсимаба (Р) в дозах 1 и 10 мг/кг на фоне алкогольной интоксикации (АИ), ($M \pm m$)

Аминокислота	Контроль, нмоль/10 ⁶ кл	АИ, нмоль/10 ⁶ кл	АИ+Р-1 мг/кг, нмоль/10 ⁶ кл	АИ+Р-10 мг/кг, нмоль/10 ⁶ кл
Аспаргат	7,95 ± 2,03	7,26 ± 0,58	7,08 ± 0,95	11,76 ± 1,43 [#]
Глутамат	9,66 ± 2,43	9,41 ± 1,74	8,45 ± 1,09	11,46 ± 1,64
Аспарагин	1,10 ± 0,38	1,23 ± 0,18	1,3 ± 0,17	2,57 ± 0,41 ^{*#§}
Серин	9,24 ± 2,62	11,09 ± 1,05	9,96 ± 1,10	13,85 ± 2,73
Глутамин	1,24 ± 0,26	1,81 ± 0,41	1,29 ± 0,18	1,70 ± 0,30
Гистидин	1,75 ± 0,53	2,25 ± 0,11	2,15 ± 0,21	4,20 ± 0,92 ^{*#§}
Глицин	3,66 ± 1,10	4,27 ± 0,41	3,69 ± 0,37	6,90 ± 1,32 ^{*§}
Треонин	3,11 ± 1,04	3,30 ± 0,35	3,20 ± 0,31	9,40 ± 2,80 ^{*#§}
Аргинин	1,23 ± 0,48	1,13 ± 0,16	1,10 ± 0,12	1,65 ± 0,29
Аланин	5,70 ± 1,81	6,51 ± 0,83	4,75 ± 0,50 [#]	6,88 ± 0,91
Тирозин	1,75 ± 0,50	1,63 ± 0,11	1,42 ± 0,15	1,95 ± 0,17
Валин	2,71 ± 0,95	2,66 ± 0,23	1,80 ± 0,18	3,21 ± 0,44 [§]
Метионин	0,42 ± 0,10	0,33 ± 0,06	0,28 ± 0,04 [*]	0,49 ± 0,10 [§]
Цистеин	3,40 ± 0,88	4,82 ± 0,60	5,98 ± 0,46	5,25 ± 0,65
Триптофан	0,37 ± 0,16	0,43 ± 0,02	0,54 ± 0,09	0,80 ± 0,15 ^{*#}
Фенилаланин	2,02 ± 0,64	1,88 ± 0,25	2,20 ± 0,20	3,28 ± 0,63 [#]
Изолейцин	0,58 ± 0,20	0,78 ± 0,15	2,60 ± 0,17 [#]	3,78 ± 0,68 ^{*#}
Лейцин	0,92 ± 0,26	2,42 ± 0,30 [*]	2,46 ± 0,33 [*]	6,47 ± 1,04 ^{*#§}
Лизин	8,75 ± 2,05	14,70 ± 2,89 [*]	14,48 ± 0,94 [*]	19,45 ± 2,78 [*]
Пролин	5,79 ± 1,40	7,64 ± 1,01	4,44 ± 0,30 [#]	7,39 ± 1,08 [§]

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: * — $p < 0,05$ по отношению к контролю; # — $p < 0,05$ по отношению к группе с алкогольной интоксикацией; § — $p < 0,05$ по отношению к инфликсимабу в дозе 1 мг/кг.

Таблица 2. Изменение пула серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крови после курсового введения инфликсимаба (P) в дозах 1 и 10 мг/кг на фоне алкогольной интоксикации (АИ), ($M \pm m$)

Аминокислота	Контроль, нмоль/10 ⁶ кл	АИ, нмоль/10 ⁶ кл	АИ+P-1 мг/кг, нмоль/10 ⁶ кл	АИ+P-10 мг/кг, нмоль/10 ⁶ кл
Метионин	0,42 ± 0,10	0,33 ± 0,06	0,28 ± 0,04*	0,49 ± 0,10 [§]
Цистеин	3,40 ± 0,88	4,82 ± 0,60	5,98 ± 0,46*	5,25 ± 0,65
Цистатионин	0,77 ± 0,19	1,66 ± 0,29*	1,18 ± 0,10	1,97 ± 0,47*
Таурин	51,18 ± 12,23	29,03 ± 4,28*	32,15 ± 7,64	39,53 ± 8,04

ное внутриклеточное соединение, отвечающее за осморегуляцию. Уровень таурина в клетках иммунной системы предопределяет их осморезистентность и антиоксидантный статус [10]. В целом, сумма серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крови несколько снижалась, однако, при этом индекс транссульфирования (цистеин/таурин, Cys/Tau) увеличился в 2,5 раза ($0,17 \pm 0,051$ против $0,067 \pm 0,004$).

При введении инфликсимаба в дозе 1 мг/кг в лимфоцитах крови возрастало общее содержание НА, в основном за счет роста концентрации изолейцина (в 4,5 раза). Введение инфликсимаба стимулировало накопление лимфоцитами лейцина (Leu), уровень которого повышался более чем в 2 раза относительно лимфоцитов контрольных животных (табл. 1). Аналогичная ситуация прослеживалась и в отношении лизина. При сравнении с группой, находившейся на алкогольной диете, регистрировали активное потребление пролина, являющегося энергетическим субстратом, предшественником глутамина в иммунных клетках и регулирующего клеточное редокс-состояние. Парентеральное введение инфликсимаба в дозе 1 мг/кг увеличивало содержание цистеина и цистатионина (табл. 2). При этом уровень метионина снижался почти в 2 раза относительно контрольных значений. Положительный эффект инфликсимаба реализовался возрастанием содержания фосфозаноламина (в 2,5 раза относительно показателей в группе, получавшей этанол). Вероятно, еще более активно нарабатываются полиамины, поскольку уровень орнитина (Orn) в лимфоцитах увеличивался более чем в 2 раза по сравнению с контрольными значениями (см. табл. 3). Преимущественное

использование аминокислот для биосинтетических реакций подтверждает и снижение количества в лимфоцитах гидроксипролина (HPro), α - и β -аминомасляных кислот (α -АВА и β -АВА), а также 1-метилгистидина (1MHis).

Курсовое введение инфликсимаба в дозе 10 мг/кг в еще большей степени увеличивало количество протеиногенных аминокислот в лимфоцитах крови ($122,9 \pm 15,65$ против $71,5 \pm 8,28$ нмоль/10⁶кл). Существенно изменялась структура аминокислотного фонда. Так, уровень аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ) повышался практически в 3 раза ($13,5 \pm 2,85$ нмоль/10⁶кл против $4,2 \pm 0,95$ нмоль/10⁶кл). Следует отметить и увеличение относительного содержания АРУЦ (с 5,9 % до 10,9 %) в общей сумме свободных аминокислот, а также в пуле незаменимых аминокислот. Регистрировали повышение общего содержания как НА, так и заменимых аминокислот, а также соотношения суммы протеиногенных аминокислот к их производным. Инфликсимаб активировал потребление лимфоцитами крови аспарагина (Asn), гистидина (His), глицина (Gly), триптофана (Trp) и лизина, в 3 раза треонина (Thr), в 6,5 раз изолейцина (Ile), в 7 раз Leu относительно контрольного уровня (см. табл. 1). В тоже время относительно группы, получавшей только этанол, регистрировали увеличение содержания Ile в 5 раз, Thr и Leu в 3 раза, Asn, His и Trp в 2 раза, а также фенилаланина и аспарагиновой кислоты (Asp).

Концентрация цистатионина возрастала в 2,6 раза (см. табл. 2). Одновременно регистрировали увеличение содержания производных аминокислот — β -Ala и Orn в 2 раза, а также α АВА (относительно контрольного уровня),

Таблица 3. Изменение пула производных аминокислот в лимфоцитах крови после курсового введения инфликсимаба (P) в дозах 1 и 10 мг/кг на фоне алкогольной интоксикации (АИ), ($M \pm m$)

Производные аминокислот	Контроль, нмоль/10 ⁶ кл	АИ, нмоль/10 ⁶ кл	АИ+P-1 мг/кг, нмоль/10 ⁶ кл	АИ+P-10 мг/кг, нмоль/10 ⁶ кл
Фосфозаноламин	3,77 ± 1,08	2,17 ± 0,30	5,29 ± 0,75 [#]	5,63 ± 0,74 [#]
1-метилгистидин	0,72 ± 0,37	0,49 ± 0,09	0,30 ± 0,03*	0,51 ± 0,10
Цитруллин	1,11 ± 0,34	0,75 ± 0,06	0,96 ± 0,09	1,77 ± 0,39 [#]
β -Аланин	0,59 ± 0,09	0,61 ± 0,07	0,90 ± 0,10	1,14 ± 0,12*
Таурин	0,58 ± 0,10	0,74 ± 0,15	0,40 ± 0,08 [#]	0,55 ± 0,13
α -Аминомасляная кислота	0,84 ± 0,23	0,82 ± 0,14	1,11 ± 0,14	0,95 ± 0,08
β -Аминомасляная кислота	0,75 ± 0,33	0,67 ± 0,11	0,45 ± 0,07*	0,46 ± 0,03*
γ -Аминомасляная кислота	1,63 ± 0,51	2,04 ± 0,30	1,77 ± 0,16	2,29 ± 0,30
Этанолламин	0,77 ± 0,19	1,66 ± 0,29	1,18 ± 0,10	1,97 ± 0,47*
Цистатионин	0,71 ± 0,14	0,90 ± 0,16	0,51 ± 0,03 [#]	0,62 ± 0,08
Гидроксипролин	5,41 ± 1,15	10,45 ± 2,10*	12,05 ± 0,87*	9,64 ± 1,29*

тогда как содержание фосфоэтаноламина и цитрулина повышалось относительно группы, получавшей только этанол (см. табл. 3).

Таким образом, использование инфликсимаба в дозе 10 мг/кг на фоне продолжающейся алкогольной интоксикации вызывало более значительные изменения аминокислотного спектра в лимфоцитах крови, чем это имело место после курсового введения антител к TNF α в дозе 1 мг/кг. Наблюдаются более существенные изменения уровней отдельных аминокислот — Thr в 3 раза, Asp, His, Gly, Leu, концентрации которых увеличились в 2 раза, а также достоверные повышения пролина, метионина и валина.

ВЫВОДЫ

1. Содержание свободных аминокислот в лимфоцитах крови крыс существенно не изменяется при хроническом поступлении этанола.

2. Курсовое в течение 10 дней внутрибрюшинное введение инфликсимаба в дозах 1 или 10 мг/кг вызывает дозозависимые изменения отдельных показателей пула свободных аминокислот и существенно влияет на аминокислотный баланс в лимфоцитах крови.

3. Введение инфликсимаба на фоне алкогольной интоксикации повышает фонд свободных аминокислот и активизирует их метаболизм в лимфоцитах крови, что, вероятно, связано с инактивацией TNF α и адаптивными изменениями в системе транспорта аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. К. Биктасова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Новосибирск (2010).
2. М. В. Горещкая, В. М. Шейбак, *Иммуногепатология: роль печени в иммунной системе*, Пальмир, Москва (2010).
3. В. А. Гришин, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Саратов (2011).
4. С. М. Дроговоз, Е. Г. Щекина, *Провизор*, № 18, 13 – 16 (2008).
5. В. Г. Лим, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Саратов (2006).
6. А. П. Парахонский, *Фундаментальные исследования*, № 5, 80 – 81 (2005).

7. А. А. Свистунов, П. Ф. Забродский, В. Г. Лим, В. А. Гришин, *Саратовский научно-медицинский журнал*, № 2(6), 307 – 309 (2010).
8. Л. А. Северьянова, И. И. Бобынцев, *Курский научно-практический вестник “Человек и его здоровье”*, № 3, 60 – 75 (2006).
9. В. М. Шейбак, *Обмен свободных аминокислот и КоА при алкогольной интоксикации*, Гродно (1998).
10. В. М. Шейбак, М. В. Горещкая, *Аминокислоты и иммунная система*, Пальмир, Москва (2010).
11. В. М. Шейбак, М. В. Горещкая, А. Ю. Капитурко, Е. М. Дорошенко, *Вестні НАН Беларусі. Сер. мед. навук*, № 1, 45 – 51 (2011).
12. В. М. Шейбак, М. В. Горещкая, Е. М. Дорошенко, А. А. Чиркин, *Вестні НАН Беларусі. Сер. біял. навук*, № 3, 84 – 88 (2011).
13. D. E. Bauer, M. H. Harris, D. R. Plas, et al., *FASEB J.*, **18**, 1303 – 1305 (2004).
14. N. Benevenga, K. P. Blemings, *J. Nutr.*, **137**, 1610S – 1615S (2007).
15. V. U. Buko, P. Kirvel, O. Lukivskaya, et al., *Liver under constant attack-from fat to viruses: abstracts of Invited Lectures Poster Abstracts*, Mainz (2008), p. 14.
16. C. A. Doughty, B. F. Bleiman, D. J. Wagner, et al., *Blood*, **107**, 4458 – 4465 (2006).
17. C. J. Fox, P. S. Hammerman, C. B. Thompson, *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 844 – 852 (2005).
18. K. A. Frauwirth, J. L. Riley, M. H. Harris, et al., *Immunity*, **16**, 769 – 777 (2002).
19. D. Kepka-Lenhart, S. K. Mistry, G. Wu, S. M. Morris, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279**(6), 2237 – 2242 (2000).
20. C. S. Lieber, L. M. DeCarli, *Methods in enzymology*, **233**, 585 – 594 (1994).
21. J. C. Rathmell, E. A. Farkash, W. Gao, C. B. Thompson, *J. Immunol.*, **167**, 6869 – 6876 (2001).
22. L. Spahr, I. Rubbia-Brandt, J. L. Frossard, et al., *Hepatology*, **37**, 448 – 455 (2002).
23. H. Tilg, R. Jalan, A. Kaser, et al., *Hepatology*, **38**, 419 – 425 (2003).

Поступила 02.04.12

EFFECT OF INFLIXIMAB ON AMINO ACID CONTENT IN BLOOD LYMPHOCYTES OF ALCOHOLIZED RATS

M. V. Goretskaya¹, V. M. Sheibak¹, E. M. Doroshenko¹, and P. Ch. Kirvel²

¹ Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, Grodno, 230009, Belarus;

² Institute of Bioorganic Chemistry (Grodno branch), National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, 230017, Belarus

Dose-dependent effects of monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α (TNF α) in the form of infliximab preparation have been studied in Wistar rats upon with alcohol intoxication for 10 weeks (Lieber – De Carli liquid diet). It is established that the intraperitoneal administration of infliximab within the last 10 days of alcoholization in doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg leads to dose-dependent changes in individual indices of the free amino acids pool and the amino acid balance in blood lymphocytes. Infliximab administered on the background of alcohol intoxication increases the pool of free amino acids and activates their metabolism in rat blood lymphocytes, which is probably due to inactivation of TNF α and adaptive changes in the amino acid transport system.

Key words: Infliximab; anti-TNF α antibodies; lymphocytes; amino acids; rats; alcohol intoxication