

УДК 612.112.94:616.36-002

©Горецкая, Шейбак

## **МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА ИЗМЕНЯЮТ МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В ЛИМФОЦИТАХ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ ЭТАНОЛА**

*М.В. Горецкая\*, В.М. Шейбак*

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь, 230003,  
г. Гродно, ул. Горького 80; тел.: +375-152-74-31-84;  
эл. почта: m.v.haretskaya@rambler.ru

На крысах линии Вистар, потребляющих этанол в течение 10 недель (жидкая диета Либера - Де Карли), показаны дозозависимые эффекты инфликсимаба (моноклональные антитела к фактору некроза опухоли- $\alpha$  - TNF $\alpha$ ). Курсовое внутрибрюшинное введение инфликсимаба в течение 10 дней в дозах 1 мг/кг или 10 мг/кг массы на фоне хронического потребления этанола, вызывает изменения концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов, а также способствует развитию аминокислотного дисбаланса в лимфоцитах печени. Вероятно, одним из механизмов являются связанные с инактивацией TNF $\alpha$ , адаптивные изменения в системе транспорта аминокислот и других нутриентов в лимфоциты печени.

**Ключевые слова:** крысы, аминокислоты, лимфоциты, этанол, антитела к TNF $\alpha$ .

**ВВЕДЕНИЕ.** Инфильтрация печени полиморфноядерными лейкоцитами является одним из ранних ответов на повреждение органа токсическими веществами (в том числе этанолом) или паразитарными агентами. Активация нейтрофилов позволяет удалять обломки клеток и фагоцитировать чужеродные агенты, но может способствовать дополнительному повреждению гепатоцитов. Первым этапом воспалительного процесса является стимуляция притока нейтрофилов в печеночное сосудистое русло медиаторами воспаления, т.е. цитокинами, хемокинами или факторами системы комплемента. Наиболее критичным для паренхиматозных клеток является накопление иммунных клеток в синусоидах, которое не зависит от молекул клеточной адгезии. Следующим этапом является экстравазация в паренхиму. Этот процесс требует хемотаксического сигнала от гепатоцитов или вышедших из сосудистого русла нейтрофилов и зависит от молекул клеточной адгезии, локализованных на мембранах нейтрофилов ( $\beta$ 1 или  $\beta$ 2-интегрины) и на эндотелиальных клетках (внутриклеточные или сосудистые клеточные молекулы адгезии). Третьим этапом является прямой контакт с клетками мишенями (гепатоцитами), который включает  $\beta$ 2-интегрины и запускает полную активацию нейтрофила с долговременным окислительным стрессом и дегрануляцией [1].

---

\* - адресат для переписки

## ВЛИЯНИЕ ИНФЛИКСИМАБА НА МЕТАБОЛИЗМ ЛИМФОЦИТОВ

Одновременно, оксиданты диффундируют в гепатоциты и, запуская внутриклеточный окислительный стресс, провоцируют митохондриальную дисфункцию, постепенно приводящую к гибели клетки. Протеазы нейтрофилов облегчают экстравазацию и включаются в регуляцию продукции провоспалительных медиаторов лимфоцитами. Лимфоцитарное звено обеспечивает повышение локальных концентраций  $\text{TNF}\alpha$  [2]. Лиганд-рецепторные взаимодействия с участием  $\text{TNF}\alpha$  приводят к активации каспазы-8, что стимулирует развитие апоптоза, вследствие повышения проницаемости митохондриальной мембраны лимфоцитов [3]. Известно, что  $\text{TNF}\alpha$  подавляет метаболизм лекарственных веществ цитохромом P450, индуцирует экспрессию комплексных HLA-антигенов на поверхности клеток и усиливает гепатотоксический эффект этанола. Кроме того,  $\text{TNF}\alpha$  тормозит транспорт липопротеиновых комплексов из печени и провоцирует развитие стеатогепатита [4].

$\text{TNF}\alpha$  участвует в формировании системного ответа на воспаление, в течение которого изменяется функциональная активность митохондрий и образование АТФ, повышается проницаемость капилляров и региональный кровоток, способствует лейкоцитарной инфильтрации ткани, что влияет на утилизацию нутриентов [5]. Известно, что провоспалительные цитокины регулируют дифференциальную экспрессию генов (активацию или репрессию), синтез белка и/или протеолиз, посттрансляционные модификации белков, включая фосфорилирование, миристилирование, карбонилирование и убиквитирование [6].

Активация лимфоцитов, необходимая для синтеза цитокинов, характеризуется как состояние высокой биохимической активности. Основными субстратами для лимфоцитов являются глюкоза и глутамин, использование которых заметно повышается в зависимости от степени активации. Они необходимы не только как предшественники образования компонентов ДНК и РНК, но и энергии для этих биосинтетических процессов. Одновременно, значительную часть энергетических потребностей лимфоциты удовлетворяют за счёт других аминокислот. При активации лимфоцитов увеличивается экспрессия транспортеров, обеспечивающих быстрое поступление в лимфоциты полного набора аминокислот. Гипераминоацидемии способствует активация протеолиза миофибрилл. Формируемый в плазме крови аминокислотный дисбаланс позволяет достигать положительного эффекта в синтезе иммуноглобулинов, медиаторов и других специфических соединений, образующихся в клетках иммунной системы и обладающих высокой биологической активностью [7].

Основываясь на этом механизме, вероятно, можно модулировать внутриклеточные механизмы защиты в гепатоцитах, путем изменения профиля синтезируемых лимфоцитами провоспалительных цитокинов, что может иметь потенциальное терапевтическое значение.

Инфликсимаб (Remicade) – химерное соединение, созданное на основе гибридных мышиных и человеческих  $\text{IgG}_1$  моноклональных антител, является селективным иммунодепрессантом, обладающее высоким аффинитетом к  $\text{TNF}\alpha$ . Антитела быстро связываются с  $\text{TNF}\alpha$  и тормозят прогрессирование воспалительного каскада [8]. Одним из ключевых медиаторов воспаления, вырабатываемых в раннем периоде развития заболевания, является  $\text{TNF}\alpha$ . В высокой концентрации он способен повреждать клетки эндотелия и увеличивать микроваскулярную проницаемость, вызывать активацию системы гемостаза и комплемента, за которыми следуют аккумуляция нейтрофилов и микрососудистое тромбообразование. В литературе имеются данные о тесной

связи его с другими провоспалительными цитокинами, в частности с фактором активации тромбоцитов, интерлейкинами (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 [2, 5, 6]. Очевидно, блокада данного цитокина в какой-то степени предотвратит запуск цитокинового каскада или, по крайней мере, уменьшит его. Известно, что блокада фактора некроза опухоли анти-TNF антителами или его растворимыми рецепторами в эксперименте положительно влияет на клиническое течение заболевания. Однако ингибиторы TNF $\alpha$  не получили достаточно широкого распространения в клинике. В связи с этим, представляется целесообразным исследовать механизмы воздействия инфликсимаба на метаболическую активность клеток иммунной системы при хронической алкогольной интоксикации – состоянии, характеризующимся вялотекущим воспалительным процессом в плане возможности снижения системного действия TNF $\alpha$ .

Целью работы явилась оценка аминокислотного фонда в лимфоцитах печени при введении моноклональных антител к TNF $\alpha$  на фоне хронического потребления этанола.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты проведены на крысах-самках линии Wistar массой 200-240 г. Контрольные животные (n=8) получали в течение 10 недель искусственный рацион на основе мальтодекстрина (жидкая диета Либера - Де Карли) [9]. В рационе опытных животных (n=8) мальтодекстрин изокалорийно заменяли этанолом. Группе опытных животных на фоне данного рациона в течение последних 10 дней ежедневно внутрибрюшинно вводили инфликсимаб (Remicade, “Shering-Plough”, США) в дозе 1 мг/кг (n=8) или 10 мг/кг (n=8). После декапитации крыс ткань печени измельчали, лимфоциты выделяли в градиенте плотности урографина (1,077 г/см<sup>3</sup>) [10]. Определение свободных аминокислот проводили в хлорнокислых экстрактах диализатов лимфоцитов методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм) [11]. 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 (США), приём и обработку данных проводили, используя программу Agilent ChemStation A10.01. Математическая обработка данных выполнена параметрическим методом, используя критерий-t Стьюдента, с помощью программы Statistica.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Известно, что курсовое введение крысам этанола приводит к изменениям концентраций свободных аминокислот в ткани печени [12]. Между тем, хроническое поступление в организм животных этанола влияет и на уровень свободных аминокислот в лимфоцитах печени (табл. 1). Регулятором экспрессии мРНК являются аминокислоты с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ), среди которых особое место занимает лейцин. Накопление в клетках АРУЦ способствует биосинтезу белка даже в отсутствии инсулина. При повреждении печени активность печёночной дегидрогеназы разветвленных кетокислот повышена и это приводит к снижению в плазме концентрации АРУЦ и их накоплению в ткани [13, 14]. Вероятно, этому способствует и синтез лимфоцитами провоспалительных цитокинов, поскольку введение крысам TNF $\alpha$  (25 или 50 мкг/кг массы) приводит к активации данного фермента [15] Показано, что уровень цитокинов повышается и при циррозе печени, вызванном CCl<sub>4</sub> [16].

## ВЛИЯНИЕ ИНФЛИКСИМАБА НА МЕТАБОЛИЗМ ЛИМФОЦИТОВ

Таблица 1. Изменение концентраций протеиногенных аминокислот в лимфоцитах печени после курсового введения инфликсимаба (нмоль/10<sup>6</sup> клеток) в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг на фоне алкогольной интоксикации (АИ).

Амино-кислоты	Контроль	АИ	АИ + ИФМ 1 мг/кг	АИ + ИФМ 10 мг/кг
Asp	4,99±1,17	4,74±0,81	4,15±0,29	18,98±3,69*
Glu	11,44±2,26	5,62±0,87*	5,48±0,45	18,15±2,36#&
Asn	1,33±0,28	0,95±0,14	1,17±0,16	4,31±0,89*#&
Ser	6,79±1,84	9,49±1,60	4,53±0,47#	27,81±1,63*#&
Gln	1,77±0,31	0,85±0,10	0,53±0,06*	2,25±0,47#&
His	2,62±0,58	1,49±0,22	0,93±0,10*	4,93±1,60*#&
Gly	3,06±0,76	3,15±0,42	1,72±0,13#	9,73±3,05&
Thr	1,70±0,49	2,07±0,32	2,39±0,35	8,98±1,78*#&
Arg	1,71±0,39	1,23±0,20	1,83±0,27	4,48±0,41*#&
Ala	4,71±1,40	4,67±0,59	4,65±0,64	17,50±3,90*#&
Tyr	0,93±0,11	1,30±0,21	1,58±0,27	5,84±1,14*#&
Val	2,35±0,72	1,55±0,25	2,75±0,42	7,56±1,16*#&
Met	0,51±0,13	0,41±0,03	0,94±0,19	2,54±0,13*#&
Cys	19,33±4,10	9,13±0,91*	2,14±0,14*#	13,08±2,97&
Trp	0,36±0,08	0,24±0,03	0,17±0,04*	0,83±0,20*#&
Phe	0,96±0,36	2,48±0,61	2,15±0,26*	7,04±0,98*#&
Ile	0,86±0,18	1,55±0,49	2,66±0,47*	7,40±0,84*#&
Leu	1,31±0,44	1,52±0,32	4,79±0,85*#	11,60±1,00*#&
Lys	25,44±4,98	19,56±2,26	4,23±0,36*#	22,20±5,62&
Pro	11,55±2,59	7,28±0,65	2,23±0,16*#	11,43±3,07&

Примечание. Здесь и в таблице 2 результаты представлены в виде средней ± ошибка средней; \* -  $p < 0,05$  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.

Важным элементом анализа состояния аминокислотного баланса является определение соотношения АРУЦ к ароматическим аминокислотам (ААК), поскольку ААК обладают прямым токсическим действием на клетки [12]. При хроническом потреблении этанола соотношение АРУЦ/ААК в лимфоцитах печени существенно уменьшалось (1,1±0,21 против 2,01±0,16). Поскольку АРУЦ и ААК переносятся в клетки общей транспортной системой, вероятно, это могло быть обусловлено увеличением концентраций ароматических аминокислот в плазме, что, в свою очередь, проявлялось тенденцией к повышению в лимфоцитах концентраций Phe и Tyr (табл. 1).

В лимфоцитах печени регистрировали двукратное снижение глутамата, являющегося, в том числе, субстратом для синтеза  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (GABA). В результате уровень GABA также снизился более чем в 2 раза, что, учитывая его ингибиторный эффект на процессы пролиферации, может иметь важное значение для развития иммунного ответа с участием

Т-лимфоцитов [17, 18] (табл. 2). Среди азотсодержащих метаболитов аминокислот следует отметить существенное падение содержания  $\beta$ -аминомасляной кислоты ( $\beta$ -АВА) и тенденцию к снижению  $\beta$ -аланина ( $\beta$ -Ala).

Таблица 2. Изменение концентраций непротеиногенных аминокислот и азотсодержащих метаболитов в лимфоцитах печени после курсового введения инфликсимаба (нмоль/ $10^6$  клеток) в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг на фоне алкогольной интоксикации.

Показатели	Контроль	АИ	АИ + ИФМ 1мг/кг	АИ + ИФМ 10мг/кг
PEA	1,36 $\pm$ 0,30	1,17 $\pm$ 0,18	2,24 $\pm$ 0,24	7,36 $\pm$ 0,93*#&
1MHis	0,38 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,07	0,09 $\pm$ 0,01*#	0,35 $\pm$ 0,09&
Ctr	1,01 $\pm$ 0,23	1,23 $\pm$ 0,22	0,32 $\pm$ 0,04*#	1,53 $\pm$ 0,31&
$\beta$ Ala	0,96 $\pm$ 0,21	0,59 $\pm$ 0,09	0,25 $\pm$ 0,05*#	1,31 $\pm$ 0,19#&
Tau	5,73 $\pm$ 1,30	1,81 $\pm$ 0,15*	3,49 $\pm$ 0,17*	13,95 $\pm$ 1,26*#&
$\beta$ ABA	7,88 $\pm$ 2,18	0,41 $\pm$ 0,12*	0,18 $\pm$ 0,07*#	1,10 $\pm$ 0,23*#&
GABA	1,24 $\pm$ 0,32	0,53 $\pm$ 0,09*	0,18 $\pm$ 0,05*#	0,88 $\pm$ 0,21&
$\alpha$ ABA	0,55 $\pm$ 0,08	0,51 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,02*#	0,66 $\pm$ 0,17&
EA	1,56 $\pm$ 0,25	1,04 $\pm$ 0,16	1,02 $\pm$ 0,36	2,48 $\pm$ 0,46#&
Ctn	1,75 $\pm$ 0,60	0,80 $\pm$ 0,11*	0,29 $\pm$ 0,03*#	1,13 $\pm$ 0,33&
HPro	1,11 $\pm$ 0,27	0,56 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,02*#	1,16 $\pm$ 0,40#&
Orn	48,10 $\pm$ 9,38	27,85 $\pm$ 3,04	5,99 $\pm$ 0,40*#	33,20 $\pm$ 7,58&

Примечание: \* -  $p < 0,05$  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. PEA - фосфозаноамин, 1MHis - 1 метил-гистидин, Ctr - цитрулин,  $\beta$ Ala -  $\beta$ -аланин, Tau - таурин,  $\beta$ ABA -  $\beta$ -аминомасляная кислота, GABA -  $\gamma$ -аминомасляная кислота,  $\alpha$ ABA -  $\alpha$ -аминомасляная кислота, EA - этаноламин, Ctn - цистатионин, HPro - гидроксипролин, Orn - орнитин.

В лимфоцитах печени животных потреблявших этанол уменьшалось содержание серосодержащих аминокислот (12,2 $\pm$ 0,95 против 27,3 $\pm$ 3,06 нмоль/ $10^6$  кл). Известно, что Cys, изменяя редокс-потенциал, оказывает влияние на состояние плазматической мембраны Т-лимфоцитов, скорость пролиферации, а также на их взаимодействие с антиген-презентирующими клетками [19-21]. В свою очередь, цистеинсульфиновая кислота участвует в процессах фосфорилирования регуляторных белков, перераспределения катионов кальция, регуляции роста и пролиферации нативных CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток [22, 23]. Продукция TNF $\alpha$  также коррелирует с уровнем в лимфоцитах цистеинсульфиновой кислоты [17, 24]. Таким образом, Cys является важным регуляторным соединением, модулирующим сигнальную, пролиферативную и др. функции CD8<sup>+</sup> Т-клеток [22]. В свою очередь, Tau является конечным продуктом метаболизма Met и Cys,



а также одной из наиболее распространённых непротеиногенных аминокислот в лимфоцитах [17]. Снижение его уровня может провоцировать повреждение ДНК, увеличивать число мутаций, снижать скорость пролиферации лимфоцитов. Следовательно, пул серосодержащих аминокислот представляют собой группу соединений, чрезвычайно необходимых для функционирования лимфоцитов, активно участвующих в поддержании антиоксидантного статуса клеток (Cys, Tau), поскольку и их концентрация может быть лимитирующим фактором синтеза глутатиона.

В лимфоцитах печени при хронической алкогольной интоксикации соотношение Cys/Tau увеличивается, несмотря на абсолютное снижение концентраций этих метаболитов Met. Следует отметить, что и концентрация Ctn (предшественника Tau) уменьшалась в 2 раза.

Курсовое введение инфликсимаба в дозе 1 мг/кг на фоне потребления животными этанола вызывало двукратное снижение (относительно контрольных значений) количества протеиногенных аминокислот, обусловленное уменьшением уровней заменимых (ЗА) и незаменимых аминокислот (НА). Концентрации Cys, Lys, Pro снижались как при сравнении с контрольными значениями, так и относительно животных получавших только этанол. Существенно изменялись уровни Lys (в 6 раз), Pro (в 5 раз), Gln (более чем в 3 раза), His (в 3 раза), Trp (в 2 раза) относительно контрольных значений. Одновременно отмечали двукратное повышение содержания Phe. Количество АРУЦ, которые лимфоциты используют, главным образом, для биосинтеза белков, увеличивалось в 2 раза ( $10,2 \pm 0,87$  против  $4,5 \pm 0,57$  нмоль/ $10^6$  кл). По сравнению с группой, получавшей этанол, отмечали достоверное снижение содержания протеиногенных аминокислот: Ser, Gly, Cys и Pro при одновременном повышении Leu (табл. 1).

Важно отметить, что в лимфоцитах животных, получавших антитела, в 4 раза уменьшалось общее количество серосодержащих аминокислот. Так, содержание Cys в лимфоцитах снизилось в 9 раз, а Ctn – в 6,7 раз. Несмотря на то, что концентрация Met, предшественника всех серосодержащих аминокислот, увеличилась, соотношение Cys/Tau было достоверно снижено. Накопление Met и, одновременно, торможение реакций транссульфирования, может быть механизмом использования аминокислоты для инициации синтеза пептидов и белков, а также метилирования нуклеиновых кислот [17, 25].

Аналогично данным, полученным в лимфоцитах печени животных получавших только этанол, резко уменьшалась сумма производных аминокислот (табл. 2). Это проявлялось снижением более чем в 40 раз – в-АВА, в 8 раз – Orn, в 5 раз –  $\beta$ -АВА, более чем в 4 раза HPro, 1MHis,  $\beta$ -Ala, в 3 раза – Ctr.

Введение инфликсимаба в дозе 10 мг/кг вызывало практически двукратное увеличение суммы протеиногенных аминокислот в лимфоцитах печени, в основном, за счёт повышения количества заменимых аминокислот (в 2 раза). Важно отметить восстановление концентрации Gln в лимфоцитах. Показано, что 89% Gln в лимфоцитах превращается в Glu, Asp, Asn, Ala и лактат, остальные 11% окисляются через ацетил-KoA в цикле трикарбоновых кислот [26]. Известно, что стимуляция лимфоцитов конканавалином А (ConA) ещё больше увеличивает скорость окисления глутамина [27, 28]. При этом повышается цитозольная концентрация  $Ca^{2+}$ , что увеличивает скорость транспорта  $Ca^{2+}$  в митохондрии, что повышает активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы и приводит к снижению концентраций оксоглутарата и глутамата [29-31]. Это, в свою очередь, вызывает увеличение активности глутаминазы, а также способствует транспорту

Gln через митохондриальную мембрану [32]. Поскольку фермент фосфоенолпируваткарбоксикиназа является частью метаболического пути утилизации Gln в лимфоцитах, следует ожидать, что его активность будет повышаться в той же степени, что и оксоглутаратдегидрогеназы при стимуляции ConA. Приток Gln может быть важен для синтеза пуринов и пиримидинов [33].

При введении более высокой дозы антител в лимфоцитах печени возрастала в 6 раз концентрация Tyr, в 4 раза – Asp, Ser, Ala, более чем в 3 раза – Asn, Gly, Arg, в 2 раза – His (табл. 1). Увеличивалось также содержание отдельных незаменимых аминокислот – в 9 раз Leu и Ile, в 7 раз Phe, в 5 раз – Thr и Met, в 3 раза – Val, в 2 раза – Trp. Тем не менее, соотношение ЗА/НА повышалось. Отдельно следует отметить значительное увеличение содержания АРУЦ ( $25,6 \pm 0,48$  против  $4,5 \pm 0,57$  нмоль/ $10^6$  кл, в целом в 5,7 раз). Это привело к нормализации как индекса АРУЦ/ААК, так и общей суммы производных аминокислот в лимфоцитах. Как следствие этого наблюдали двукратное увеличение индекса отношения суммы протеиногенных аминокислот к сумме производных аминокислот ( $3,16 \pm 0,29$  против  $1,44 \pm 0,181$ ). В результате введения антител уровень РЕА повышается более чем в 5 раз (табл. 2) и, одновременно, снижается концентрация  $\beta$ -АВА (в 7 раз).

Введение высокой дозы инфликсимаба восстанавливало общее количество серосодержащих аминокислот, однако при этом в ещё большей степени снижалось соотношение Cys/Tau ( $0,94 \pm 0,11$  против  $3,37 \pm 0,42$ ). Так, в лимфоцитах печени в 2 раза увеличивалось содержание таурина и в 5 раз метионина по сравнению с контрольными значениями. Заметим, что по сравнению с лимфоцитами, выделенными из печени животных получавших только этанол, концентрация Tau повышалась в 7,7 раз и Met – в 6,2 раза.

Следует отметить четкое различие эффектов при анализе воздействия различных доз инфликсимаба практически по всем изучаемым параметрам. Увеличение количества вводимых антител привело к двукратному повышению АРУЦ, в 4,6 раз – общей суммы серосодержащих аминокислот ( $30,7 \pm 5,01$  против  $6,7 \pm 0,75$  нмоль/ $10^6$  кл), в 4 раза суммы протеиногенных аминокислот ( $206,6 \pm 21,95$  против  $51,1 \pm 6,11$  нмоль/ $10^6$  кл) и количества заменимых аминокислот ( $119,6 \pm 12,38$  против  $27,2 \pm 3,77$  нмоль/ $10^6$  кл), в 3,6 раз – незаменимых аминокислот ( $87,0 \pm 7,71$  против  $23,9 \pm 3,51$  нмоль/ $10^6$  кл), и в 4,5 общего содержания азотсодержащих метаболитов и непротеиногенных аминокислот ( $65,3 \pm 5,11$  против  $14,4 \pm 0,96$  нмоль/ $10^6$  кл).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Курсовое внутрибрюшинное введение инфликсимаба в течение 10 дней в дозах 1 мг/кг или 10 мг/кг массы на фоне хронического потребления этанола, вызывает в лимфоцитах печени изменения концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов, а также способствует развитию специфического аминокислотного дисбаланса направленного на стимуляцию синтеза белка. Введение инфликсимаба на фоне хронического потребления животными этанола, дозозависимо влияет на содержание свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в лимфоцитах печени. Наиболее значимые эффекты в пуле протеиногенных аминокислот отмечены при курсовом введении антител в дозе 10 мг/кг массы, тогда как изменения концентраций азотсодержащих метаболитов были более выражены при использовании дозы 1 мг/кг. Возможно, введение антител к TNF $\alpha$  на фоне хронического потребления этанола повышает насыщение

## ВЛИЯНИЕ ИНФЛИКСИМАБА НА МЕТАБОЛИЗМ ЛИМФОЦИТОВ

лимфоцитов печени аминокислотами и, следовательно, их метаболическую активность. Одним из вероятных механизмов являются адаптивные изменения в системе переноса аминокислот и других нутриентов в лимфоциты печени, обусловленные инактивацией TNF $\alpha$ .

Таким образом, можно заключить, что инфликсимаб способен влиять на системный уровень TNF $\alpha$ , оказывая неспецифическое антицитокиновое действие. Учитывая все выше сказанное, можно предположить, что антицитокиновое действие данного препарата при хронической алкогольной интоксикации положительно влияет на метаболический статус клеток иммунной системы, что является еще одной предпосылкой в его дальнейшей разработке как перспективного препарата для лечения последствий алкогольной интоксикации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Greenfield V., Cheung O., Sanyal A.J.* (2008) Curr. Opin. Gastroenterol., **24**, 320-327.
2. *Шерлок Ш.* (1999) Заболевания печени и желчных путей (пер. с англ), Гэотар, Медицина, М.
3. *Биктасова А.К.* (2010) Роль белков-регуляторов программированной клеточной гибели в реализации проапоптотического эффекта фактора некроза опухолей альфа на лимфоциты крови. Автореф. дисс. канд. наук, Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск.
4. *Choi S., Diehl A.M.* (2005) Curr. Opin. Gastroenterol., **21**, 702-707.
5. *Pober J.S., Min W.* (2006) Handb. Exp. Pharmacol., **176**, 135-156.
6. *Горецкая М.В., Шейбак В.М.* (2010) Иммуногепатология: роль печени в иммунной системе, Пальмир, Москва.
7. *Benevenga N., Blemings K.P.* (2007) J. Nutr., **137**, 1610-1615.
8. *Tilg H., Jalan R., Kaser A., Davies N.A., Offner F.A., Hodges S.J., Ludwiczek O., Shawcross D., Zoller H., Alisa A., Mookerjee R.P., Graziadei I., Datz C., Trauner M., Schuppan D., Obrist P., Vogel W., Williams R.* (2003) Hepatol., **38**, 419-425.
9. *Lieber C.S., DeCarli L.M.* (1994) Methods Enzymol., **233**, 585-594.
10. *Boyum A.* (1968) Scand. J. Clin. Lab. Investig., **21**(97), 1-9.
11. *Дорошенко Е.М.* (2010) в: Аналитика РБ-2010: Методологические аспекты и трудности анализа свободных (физиологических) аминокислот и родственных соединениях в биологических жидкостях и тканях, Минск, сс. 126.
12. *Шейбак В.М.* (1998) Обмен свободных аминокислот и КоА при алкогольной интоксикации, ГГМИ, Гродно.
13. *Морозов, С.Ю.* (2009) Русс. мед. журнал, **11**(1), 25-27.
14. *Олейник С.А., Горчаков Н.А., Коваль И.В., Футорный С.М.* (2005) Спортивная медицина, №1, 114-143.
15. *Shiraki M., Shimotsuma Y., Miwa Y., Fukushima H., Murakami T., Tamura T., Tamura N., Moriwaki H.* (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., **328**, 973-978.
16. *Orfila C., Lepert J.C., Alric L., Carrera G., Beraud M., Vinel J.P., Pipy B.* (1999) Histochem. J., **31**, 677-685.
17. *Шейбак В.М., Горецкая М.В.* (2010) Аминокислоты и иммунная система, Пальмир, М.



18. *Mendu S.K., Akesson L., Jin Z., Edlund A., Cilio C., Lernmark A., Birnir B.* (2011) *Mol. Immunol.*, **48**(4), 399-407.
19. *Yan Z., Garg S.K., Kipnis J., Banerjee R.* (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **5**(10), 721-723.
20. *Rose S., Melnyk S., Trusty T.A., Pavliv O., Seidel L., Li J., Nick T., James S.J.* (2012) *Autism. Res. Treat.*, **2012**, 986519.
21. *Garg S.K., Yan Z., Vitvitsky V., Banerjee R.* (2011) *Antioxid. Redox. Signal.* **15**(1), 39-47.
22. *Michalek R.D., Nelson K.J., Holbrook B.C., Yi J.S., Stridiron D., Daniel L.W., Fetrow J.S., King S.B., Poole L.B., Grayson J.M.* (2007) *J. Immunol.* **179**(10), 6456-6467.
23. *Levring T.B., Hansen A.K., Nielsen B.L., Kongsbak M., von Essen M.R., Woetmann A., Odum N., Bonefeld C.M., Geisler C.* (2012) *Sci. Rep.*, **2**, 266.
24. *Kakazu E., Ueno Y., Kondo Y., Inoue J., Ninomiya M., Kimura O., Wakui Y., Fukushima K., Tamai K., Shimosegawa T.* (2011) *Plos. One.*, **6**(8), 23402.
25. *Sanchez-Roman I., Gomez A., Gomez J., Suarez H., Sanchez C., Naudi A., Ayala V., Portero-Otin M., Lopez-Torres M., Pamplona R., Barja G.* (2011) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **43**, 699-708.
26. *Brand K.* (1985) *Biochem. J.*, **228**, 353-361.
27. *Liu C.T., Chen K.M., Chang P.L., Lii C.K.* (2001) *J. Surg. Res.*, **96**(2), 246-254.
28. *Kew S., Wells S.M., Yaqoob P., Wallace F.A., Miles E.A., Calder P.C.* (1999) *J. Nutr.*, **129**(8), 1524-1531.
29. *Gukovskaya A.S., Zinchenko V.P., Petrunka V.V., Khodorov B.I., Evtodienko Y.V.* (1986) *Eur. J. Biochem.*, **161**(1), 249-256.
30. *Curi R., Newsholme E.A.* (1986) *Mol. Cell. Biochem.*, **86**(1), 71-76.
31. *Tylicki A., Bunik V.I., Strumiiio S.* (2011) *Postepy Biochem.*, **57**(3), 304-313.
32. *Ye Y., Zhang Y., Lu X., Huang X., Zeng X., Lai X., Zeng Y.* (2011) *Immunobiology*, **216**(9), 1044-1053.
33. *Sacks G.S.* (1999) *Ann. Pharmacother.*, **33**, 348-354.

Поступила: 04. 10. 2012.

**A MONOCLONAL ANTIBODY TO TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA  
MODIFY METABOLIC ACTIVITY IN LYMPHOCYTES FROM RAT'S  
EXPOSED CHRONIC ETHANOL CONSUMPTION**

***M.V. Haretskaya, V.M. Sheibak***

Grodno State Medical University, ul. Gorkogo, 80, Grodno, 230009, Belarus;  
tel.: 375-152-74-31-84, e-mail: m.v.haretskaya@rambler.ru

Administration of infliximab (a monoclonal antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$  1-10 mg/kg for 10 days) to Wistar rats consuming ethanol for 10 weeks significantly changed levels of free amino acids and their nitrogenous metabolites in liver lymphocytes.

**Key words:** rat, amino acids, lymphocytes, alcoholic liver disease, antibodies to TNF $\alpha$ .