

УДК 547.015+615.212.7.015.156.015.4

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ АЛКОГОЛЬНОЙ АБСТИНЕНЦИИ

В.В. Лелевич, А.Г. Виницкая, С.В. Лелевич, Е.М. Дорошенко*

“Гродненский государственный медицинский университет”,
Беларусь, 230009 г. Гродно, ул. Горького, 80; эл. почта: vinitskaya@tut.by

Исследовали состояние катаболизма ГАМК и содержание некоторых аминокислот в печени крыс при разных режимах отмены алкоголя после его систематического введения. Активность ферментов катаболизма ГАМК возрастает в печени в модели прерывистой алкогольной интоксикации с наименьшей алкогольной нагрузкой. В то же время, введение этанола в высоких дозах и увеличение длительности прерывистого введения алкоголя приводит к угнетению катаболизма ГАМК. Предполагается, что наблюдаемые метаболические сдвиги являются следствием неспецифической адаптации гепатоцитов к интенсивной алкогольной нагрузке и отмене этанола.

Ключевые слова: γ -аминомасляная кислота (ГАМК), катаболизм ГАМК, аминокислоты, печень, этанол.

ВВЕДЕНИЕ

Прерывистый приём алкогольных напитков является одной из реально встречающихся ситуаций в человеческой популяции, когда происходит чередование более или менее длительных периодов приёма алкоголя и периодов абстиненции. С учётом выраженных клинических и патохимических реакций прерывистую алкоголизацию рассматривают как одно из клинических проявлений алкогольной болезни [1, 2].

В настоящее время доказано участие печени в реализации центральных и периферических эффектов алкоголя [3]. Известна центральная роль печени в формировании и стабилизации аминокислотного фонда в организме, который нарушается при алкогольной интоксикации [3, 4].

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является основным тормозным нейромедиатором головного мозга, и имеются доказательства её участия в проявлении различных эффектов алкогольной и морфиновой интоксикации [5-8]. В литературе обмен ГАМК иногда называют “ГАМК-шунт”, благодаря сопряжению его реакций с циклом трикарбоновых кислот [5, 8].

За пределами головного мозга, ГАМК-ергическая активность обнаружена в спинном мозге, ганглиях автономной нервной системы, горизонтальных клетках сетчатки и эндокринных железах [9, 10]. В пищеварительной системе млекопитающих ГАМК является трансмисмитером нейронов, иннервирующих пищеварительный тракт [10]. Печень млекопитающих также обладает довольно значительной ГАМК-ергической системой, деятельность которой связывают со способностью гепатоцитов к регенерации после частичной гепатэктомии [11-13]. В гепатоцитах обнаружен полный набор ферментов обмена ГАМК, ГАМК_A-ергические рецепторы, а также транспортные белки, переносящие ГАМК [12, 13]. Помимо переноса ГАМК в гепатоциты из циркулирующей крови, ГАМК-транспортные белки задействованы также в транспорте гуанидинацетата, и таурина [14, 15]. В литературных источниках имеются данные об участии ГАМК-ергической системы в регуляции регенерации печени после токсического действия этанола и некоторых гепатотропных соединений [11, 13, 16]. На сегодняшний день достаточно хорошо изучено влияние алкогольной интоксикации на параметры ГАМК-шунта в отделах головного

* - адресат для переписки

ОБМЕН γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ПЕЧЕНИ ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ АБСТИНЕНЦИИ

мозга [7, 8]. В то же время отсутствуют данные об изменениях параметров метаболизма ГАМК в печени при разных режимах введения алкоголя.

Цель данного исследования является сравнение эффектов прерывистой алкогольной интоксикации и отмены этанола на состояние катаболизма ГАМК, содержание ГАМК и некоторых аминокислот в печени крыс.

МЕТОДИКА

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г.

В модели алкогольного абстинентного синдрома (ААС) использовали метод интрагастральных интубаций по Майхровичу в модификации [17]. Животным внутрижелудочно вводили 25%-ный раствор этанола (2 раза в сутки по 5 г/кг массы тела) с интервалом 12 ч на протяжении 5 суток. Контрольные животные (I группа) получали 0,9%-ный раствор NaCl внутрижелудочно, дважды в сутки, в течение 5 суток. Декапитацию подопытных крыс проводили через 3 ч (II группа; “ААС – 3 часа”), 1 сутки (III группа; “ААС – 1 сутки”), 3 суток (IV группа; “ААС – 3 суток”) и 7 суток (V группа; “ААС – 7 суток”) после последней инъекции алкоголя. Животных контрольной группы декапитировали через 3 ч, 1, 3 и 7 суток после последней инъекции физиологического раствора.

При моделировании прерывистой алкогольной интоксикации (ПАИ) использовали следующие схемы введения этанола крысам. Животным внутрижелудочно вводили 25% раствор этанола в дозе 3,5 г/кг, 2 раза в сутки, на протяжении 4 суток с последующей отменой инъекций этанола сроком на 3 суток. В группе “ПАИ-14 суток” использовали два цикла прерывистого введения алкоголя с общей продолжительностью эксперимента 14 суток. В группе “ПАИ – 28 суток” было использовано четыре цикла прерывистого введения этанола, и продолжительность эксперимента составила 28 суток. Для контрольной группы в этой модели использовали такие же схемы внутрижелудочного введения, только раствор этанола был заменен 0,9%-ным раствором NaCl. Декапитацию крыс проводили через 3 суток после последнего введения алкоголя или физиологического раствора.

Во всех экспериментальных группах у животных выделяли печень и замораживали в жидком азоте. В гомогенатах печени определяли активность ферментов катаболизма ГАМК: ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т) и дегидрогеназы янтарного полуальдегида (ЯПА-ДГ) спектрофлуориметрическим методом

[18], активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – спектрофотометрическим методом [19]. Содержание свободных аминокислот (ГАМК, β -Ала, Ала, Глу, Глн, Асп, Асн) определяли методом ВЭЖХ по описанной ранее методике [6]. Концентрацию белка в пробах измеряли по методу Лоури. Достоверность различий между группами оценивали параметрическим методом с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В печени и головном мозге синтез ГАМК и её предшественников – глутамина и глутамата, происходит из гексоз – глюкозы и галактозы [20]. В гепатоцитах были обнаружены полный набор ферментов обмена ГАМК, аналогичный головному мозгу, однако печеночные формы ферментов катаболизма ГАМК являются более неспецифическими [21–23]. Так, ГАМК-Т печени способна к переаминированию не только ГАМК, но и β -аланина и пищевых ω -аминокислот, а её функции отличаются от функций фермента, локализованного в нервной ткани, поскольку ГАМК не является в печени нейромедиатором [21, 22]. Позже было показано, что первично в печени происходит синтез ГАМК-Т, по строению аналогичной ферменту мозгового типа. Затем этот фермент-предшественник подвергается частичному протеолизу посредством эндопептидазы и превращается в β -аланин-оксоглутарат-аминотрансферазу [22]. ЯПА-дегидрогеназа в печени также является неспецифичным ферментом и окисляет, помимо янтарного, другие полуальдегиды [23, 24]. Её активность, как и других дегидрогеназ, в большей степени определяется соотношением $\text{NAD}^+/\text{NADH}(\text{H}^+)$, которое изменяется в печени при алкогольной интоксикации [3, 25].

В ходе эксперимента было выявлено, что 5-дневное введение этанола крысам и его последующая отмена вызывают достоверные изменения в активности ферментов обмена ГАМК и содержании изученных аминокислот (таблица).

Наиболее выраженные изменения показателей наблюдались в печени через 3 ч после последней инъекции этанола (“ААС – 3 часа”), что соответствует группе хронической алкогольной интоксикации. В этой группе угнетение активности ГАМК-Т в печени (на 21,1%; $p < 0,01$) сопровождалось значительным повышением концентраций -аланина (на 235,0%; $p < 0,001$), глутамина (282,6%; $p < 0,001$), глутамата (127,3%; $p < 0,05$), аспартата (168,3%; $p < 0,001$) и аспарагина (163,1%; $p < 0,001$). Одновременно снизился уровень аланина (на 44,9%; $p < 0,05$).

Таблица. Активность ферментов катаболизма ГАМК и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (нмоль/мг белка/мин), содержание некоторых аминокислот (нмоль/г ткани) в печени крыс (n=8) в разные сроки отмены этанола.

Группы Показатели	I контроль	II ААС - 3 часа	III ААС - 1 сутки	IV ААС - 3 суток	V ААС - 7 суток
ГАМК-Т	3,61±0,23	2,49±0,15*	2,30±0,17*	2,16±0,39*	3,65±0,19
ЯПА-ДГ	15,96±1,07	16,04±0,89	18,73±0,26*	14,27±0,62	12,96±0,52*
СДГ	47,89±2,12	53,03±1,92	53,79±3,22	51,32±2,42	44,41±1,57
ГАМК	15,40±0,72	13,11±1,18	15,89±0,88	17,46±1,10	12,59±0,59*
β-Ала	127,7±4,74	301,3±28,9*	150,3±20,4	136,3±8,01	99,29±4,49*
Глу	4138,5±199,7	5269,3±236,2*	4978,6±516,6	4853,1±440,4	4514,6±189,0
Гли	3287,6±338,6	9292,1±599*	2732,1±586*	4081,9±324,5	2941,9±340,5
Ала	2567,4±136,4	1414,1±212*	2863,4±359,1	2670,4±163,3	2681,3±134,8
Асп	1204±101,9	2029,3±106,5*	1998,4±94,4	1293,5±94,9	1367,3±62,4
Асн	135,9±6,66	221,6±11,98*	228,7±20,75*	141,8±9,07	123,5±4,76

Примечание: результаты представлены в виде средней величины ± ошибки средней.
* - $p < 0,05$ достоверные различия между контрольной и опытными группами.

Параллельное повышение концентраций β-аланина, глутамата и глутамина при низкой активности катаболизма ГАМК может свидетельствовать об общем угнетении обмена этой аминокислоты в печени. Известно, что β-аланин и глутамат являются субстратами неспецифичной ГАМК-Т печени, а глутамин – основным предшественником глутамата в печени и головном мозге [22, 25]. Помимо глутамина и глутамата, за пределами нервной системы источниками ГАМК являются путресцин, спермин, спермидин и орнитин [9]. Можно предположить, что угнетение активности ГАМК-Т при ААС может свидетельствовать не только о состоянии обмена ГАМК, но и о нарушении способности печени к утилизации некоторых нутриентов при интенсивной алкогольной нагрузке.

Активность ГАМК-Т в печени оказалась сниженной также в группах животных, на 1 и 3 сутки после последнего введения этанола (таблица). Так, в группе “ААС – 1 сутки” угнетение активности ГАМК-Т (на 36,3%; $p < 0,01$) сопровождала активация второго фермента катаболизма ГАМК – ЯПА-ДГ (на 18,4%; $p < 0,05$). Одновременно в этой группе отмечено достоверное уменьшение содержания глутамина (на 16,9%; $p < 0,05$), и значительное повышение уровня аспарагина – на 168,3% ($p < 0,01$) (таблица).

На 3-и сутки после отмены этанола (группа “ААС – 3 суток”) в печени наблюдалось снижение (на 40,2%; $p < 0,05$) активности ГАМК-Т при отсутствии изменений других изучаемых параметров системы ГАМК.

На 7-е сутки после отмены этанола (V группа) было отмечено снижение уровней ГАМК и β-аланина на 18,3% ($p < 0,05$) и 22,3%

($p < 0,001$), соответственно, на фоне неизменной активности ГАМК-Т. В то же время в печени крыс группы “ААС – 7 суток” активность ЯПА-ДГ была снижена на 18,8% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем (таблица). По данным литературы, печёночная форма ЯПА-ДГ является неспецифичным ферментом, активностью которого, как и других дегидрогеназ, в большей степени определяется соотношением $NAD^+/NADH(H^+)$ [24]. Следовательно, угнетение активности ЯПА-ДГ на 7-е сутки после отмены этанола может свидетельствовать не только о процессах окисления субстратов реакции, но и о состоянии синтеза восстановленных эквивалентов в гепатоцитах в отдалённые сроки алкогольного абстинентного синдрома.

Во всех подопытных группах ААС не наблюдалось достоверных изменений в активности СДГ печени.

Показатели катаболизма ГАМК, содержание ГАМК и некоторых свободных аминокислот были изучены в модели прерывистой алкогольной интоксикации, в которой были использованы 2 и 4 цикла прерывистого введения растворов этанола по схеме “4 суток алкоголизации + 3 суток отмены” (рис. 1-2).

В печени крыс, подвернутых ПАИ общей продолжительностью эксперимента 14 суток (2 цикла ПАИ), активность ГАМК-Т достоверно выросла на 30,8% ($p < 0,001$) (рис. 1). При этом концентрации субстратов этой реакции ГАМК, β-аланина и глутамата, существенно не изменились. Одновременно отмечалось увеличение уровней глутамина (на 12,1%; $p < 0,05$) и значительное снижение концентрации аланина (на 42%; $p < 0,05$) (рис. 2).

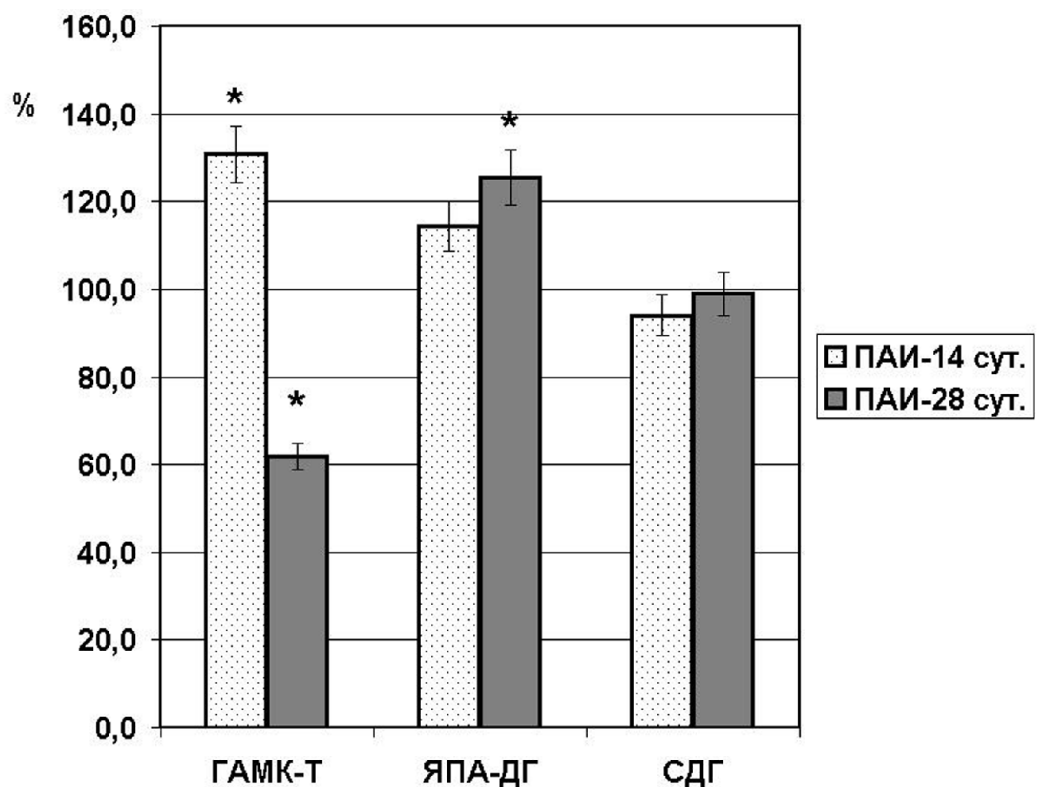


Рисунок 1. Активность ферментов катаболизма ГАМК и сукцинатдегидрогеназы в печени крыс при прерывистой алкогольной интоксикации продолжительностью 14 суток (ПАИ-14 суток) и 28 суток (ПАИ-28 суток) (в % к контролю; * - достоверные изменения по отношению к контролю, $p < 0,05$).

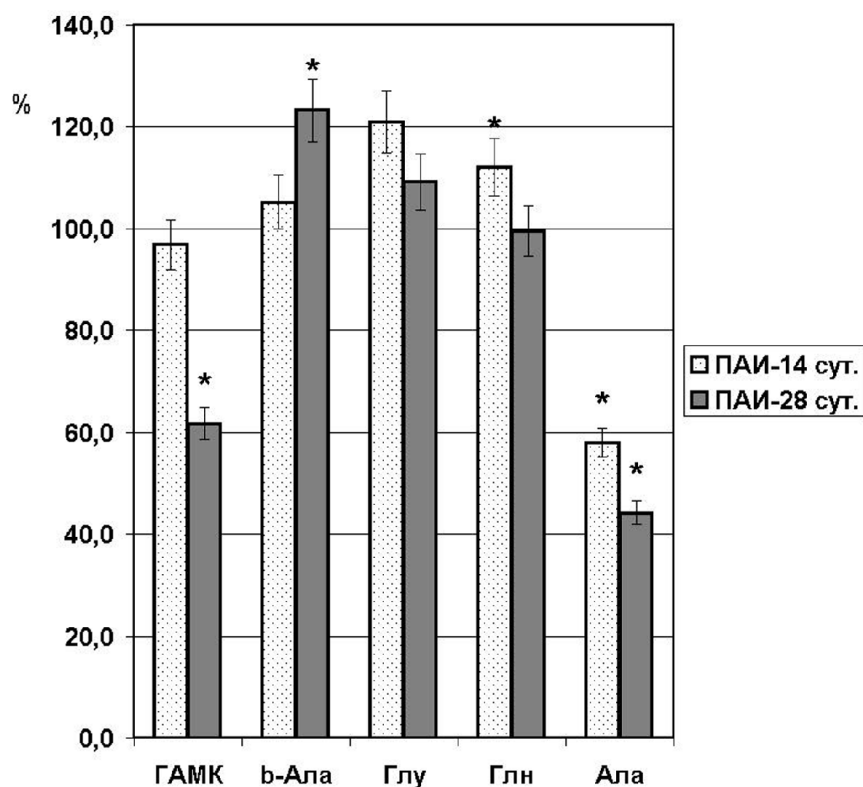


Рисунок 2. Содержание ГАМК и некоторых аминокислот в печени крыс при прерывистой алкогольной интоксикации продолжительностью 14 суток (ПАИ-14 суток) и 28 суток (ПАИ-28 суток) (в % к контролю; * - достоверные изменения по отношению к контролю, $p < 0,05$).

Применение 4-х циклов прерывистой алкоголизации (ПАИ – 28 суток) оказало более выраженное воздействие на изученные показатели обмена ГАМК и содержание аминокислот. Активность ГАМК-Т была ниже контроля (на 30,2%; $p < 0,001$) на фоне повышения активности ЯПА-ДГ (на 25,4%; $p < 0,01$) (рис. 1). Кроме того, угнетение активности ГАМК-трансаминазной реакции в группе “ПАИ – 28 суток” сопровождалось достоверным снижением уровня ГАМК (на 30,2%; $p < 0,05$), но повышением β -аланина (на 23,2%; $p < 0,05$). Одновременно в печени этих животных было отмечено значительное снижение концентрации аланина (на 55,8%; $p < 0,05$) (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований являются подтверждением наблюдений других авторов о том, что ГАМК-ергическая система является мишенью для алкоголя не только в ЦНС, но и в печени [11, 13, 16]. Ранее было показано, что хроническая алкогольная интоксикация и отмена этанола приводит к угнетению катаболизма ГАМК в отделах головного мозга крыс, который сопровождается дисбалансом уровней тормозных (ГАМК, глицин) и возбуждающих аминокислот (глутамат, аспартат) [7].

В наших экспериментах интенсивная нагрузка алкоголем и алкогольная абстиненция вызывала в печени достоверное угнетение активности ферментов катаболизма ГАМК, сопровождаемое изменениями в содержании субстратов этих реакций, и некоторых других аминокислот. При обсуждении сдвигов в содержании пула свободных аминокислот в печени следует учитывать то, что ГАМК и другие изученные аминокислоты могут выполнять в печени функции нутриентов [3, 4, 8]. Принимая во внимание множественность функций неспецифических ГАМК-Т и ЯПА-ДГ в ткани печени [11, 13, 14, 24], можно предположить, что наблюдаемые метаболические сдвиги являются следствием неспецифической адаптации клеток печени к интенсивной алкогольной нагрузке и периодам её отмены. Следовательно, наблюдаемые изменения при отмене алкоголя и прерывистой алкоголизации могут свидетельствовать о нарушениях утилизации не только ГАМК, но и других её метаболитов, относящихся к нутриентам.

Результаты работы позволили сделать следующие выводы:

1. Введение этанола крысам в течение 5 суток вызывает в печени достоверное угнетение активности ГАМК-Т, особенно выраженное через 3 ч, 1 и 3 суток после последней инъекции этанола. В то же время наиболее выраженные изменения в содержании субстратов этой реакции (β -аланин, глутамат) и других аминокислот (глутамин, аланин) были отмечены через 3 ч после последнего введения этанола (группа “ААС – 3 часа”).

2. Прерывистое введение алкоголя в течение 14 суток (группа “ПАИ-14 суток”) оказывало активирующее воздействие на ГАМК-Т печени, что сопровождалось повышением уровня глутамина, и снижением – аланина.

3. Увеличение длительности прерывистой алкогольной интоксикации до 28 суток (группа “ПАИ-28 суток”) оказало на изученные ферменты действие, подобное модели ААС. В печени крыс этой группы угнетение катаболизма ГАМК на фоне снижения уровня самой ГАМК, и увеличения концентрации другого субстрата ГАМК-Т – β -аланина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Samson H.H. (2000) *Addiction*, **95**(2), 61-72.
2. Dyr W. (2004) *Alkoholizm i Narkomania*, **17**(3-4), 151-157.
3. Рослый И.М., Абрамов С.В., Агаонов В.Р., Иванов А.В., Шуляк Ю.А. (2004) *Вопр. наркологии*, №2, 70-79.
4. Артемова О.В., Лелевич В.В. (2007) *Журнал ГрГМУ*, №3, 25-28.
5. Розанов В.А. (1989) *Успехи совр. биологии*, **103**, 375-391.
6. Лелевич В.В., Виноцкая А.Г., Дорошенко Е.М., Нефедов Л.И. (2000) *Нейрохимия*, **17**, 202-206.
7. Виноцкая А.Г., Лелевич В.В., Леднева И.О., Дорошенко Е.М. (2009) *Весті НАН Беларусі. Серыя медыцынскіх навук*, №3, 27-30.
8. Лелевич В.В., Виноцкая А.Г., Лелевич С.В. (2009) *Нейрохимия*, **26**, 275-281.
9. Tillakaratne N.J., Medina-Kauwe L., Gibson K.M. (1995) *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, **112**, 247-263.
10. Krantis A. (2000) *News Physiol. Sci.*, **15**, 284-290.
11. Zhang M.N., Gong Y., Minuk G.Y. (2000) *Mol. Cell. Biochem.*, **207**, 109-114.
12. Erlitzki R., Gong Y., Zhang M., Minuk G. (2000) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **279**, 733-739.
13. Gong Y., Cui L., Minuk G.Y. (1999) *Alcohol*, **19**, 213-218.
14. Tachikawa M., Ikeda S., Fujinawa J., Hirose S., Akanuma S., Hosoya K. (2012) *PLoS One*, **7**(2), p. e32557.

ОБМЕН γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ПЕЧЕНИ ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ АБСТИНЕНЦИИ

15. Ikeda S., Tachikawa M., Akanuma S., Fujinawa J., Hosoya K. (2012) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., **303**(3), G291-297.
16. Lou G., Zhang M., Minuk G.Y. (1999) Alcohol, **19**, 219-227.
17. Абдрашитов А.Х., Листвина В.П., Нужный В.П., Успенский А.Е. (1983) Фармакол. токсикол., №6, 94-98.
18. De Boer Th., Bruinvels J. (1977) J. Neurochem., **28**, 471-478.
19. Прохорова М.И. (ред.) (1982) Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во ЛГУ, 188-226.
20. Roser M., Josic D., Kontou M., Mosetter K., Maurer P., Reutter W. (2009) J. Neural. Transm., **116**, 131-139.
21. Kirby N., Fowler L., Edwardson J.M., Phillips N.I. (1985) Biochem. J., **230**, 481-488.
22. Ohyama T., Matsuda K., Tachibana H., Fujimoto S., Mori M., Horiuchi M., Tamaki N. (2004) FEBS Lett., **572**, 251-255.
23. Chambliss K.L., Zhang Y.A., Rossier E., Vollmer B., Gibson K.M. (1995) J. Neurochem., **65**, 851-855.
24. Nguyen E., Picklo M.J. (2003) Biochim. Biophys. Acta, **1637**, 107-112.
25. Norikura T., Kojima-Yuasa A., Opare K.D., Matsui-Yuasa I. (2007) Amino Acids, **32**, 419-423.

Поступила: 13. 06. 2013.

PARTUCULARITIES OF γ -AMINOBUTYRIC ACID METABOLISM IN THE LIVER OF RATS DURING DIFFERENT TYPES OF ALCOHOL WITHDRAWAL

V.V. Lelevich, A.G. Vinitskaya, S.V. Lelevich, Ye.M. Doroshenko

Grodno State Medical University,
Grodno, ul. Gorkogo, 80, 230009 Belarus; e-mail: vinitskaya@tut.by

Activities of GABA-catabolising enzymes and the contents of some amino acids have been studied in the liver of the rats with different types of alcohol cessation after its systemic administration. Intermittent alcohol intoxication was accompanied by activation of liver GABA catabolism in case of the lowest alcohol load. However ethanol in higher doses and prolongation of intermittent alcohol administration decreased GABA catabolism. It is suggested that the observed changes may reflect non-specific adaptation of hepatocytes to the excessive alcohol consumption and its further cessation.

Key words: γ -aminobutyric acid (GABA), GABA catabolism, amino acids, liver, ethanol.