

СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В МИКРОБНО-ТКАНЕВОМ КОМПЛЕКСЕ И ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШКАХ ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ ТРИПТОФАНА

Шейбак В. М.¹, Николаева И. В.¹, Павлюковец А. Ю.²

*¹Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь;*

*²Государственное учреждение здравоохранения
«Гродненский областной центр трансфузиологии»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Реферат. Экзогенное пероральное введение триптофана посредством воздействия на клетки кишечника (энтерохромовинные, эндокринные, клетки иммунной системы и др.), а также катаболизируясь микробиотой может оказывать влияние на гомеостаз не только в желудочно-кишечном тракте, но всего организма. Целью исследования явился анализ спектра свободных аминокислот и их азотосодержащих метаболитов в микробно-тканевом комплексе и пейеровых бляшках крыс после курсового введения триптофана. Животным внутрижелудочно вводили триптофан в дозе 40 мг/кг массы в течение 10 дней.

В результате исследования установлено, что курсовое внутрижелудочное введение триптофана не приводит к изменению структуры пула свободных аминокислот в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и пейеровых бляшках крыс, что свидетельствует о сохранении аминокислотного баланса. Тем не менее, в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника снижались concentra-

ции ряда ключевых для энергетического обмена клеток кишечника свободных аминокислот (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота).

Ключевые слова: микробно-тканевой комплекс тонкого кишечника, Пейеровы бляшки, свободные аминокислоты, триптофан.

Введение. Кишечный барьер, обеспечивающий первую линию защиты организма от патогенных факторов внешней среды, состоит из кишечной микробиоты, эпителиальных клеток кишечника и иммунных клеток слизистой оболочки, которые тесно связаны через сложную сеть цитокинов, антимикробных пептидов и продуктов метаболизма [1]. Кишечная микробиота включает миллионы микроорганизмов, колонизирующих желудочно-кишечный тракт, большинство из которых являются бактериями. Это большое количество микроорганизмов противостоит негативным факторам внешней среды благодаря их симбиотическим отношениям с организмом человека. Эти симбиотические взаимоотношения хозяина и комменсала развиваются после рождения и обеспечивают метаболические, иммунные и антиинфекционные процессы, посредством которых микробиота способствует гомеостазу кишечника и организма в целом.

Молекулярные методы позволили выявить разнообразную экосистему, содержащую девять бактериальных типов, из которых четыре являются доминирующими: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria [2], которые благодаря симбиотическим взаимоотношениям с организмом обеспечивают кишечное доминирование специфических комменсалов («симбионтов»), относящихся к типу Firmicutes и Bacteroidetes или Bifidobacteriales. Симбионты должны конкурировать с патогенными микроорганизмами или потенциальными патогенами («патобионтами») за существующие ранее ниши кишечника («конкуренция ниш»), а также за питательные вещества кишечника («конкуренция питательных веществ»). Это обеспечивает структурную стабильность микробиоты и называется «устойчивостью к колонизации». Для формирования устойчивости к колонизации используется репертуар специфических молекул с критическими антиинфекционными функциями, среди которых молекулы с важной метаболической и антимикробной и сигнальной ролью, такие как короткоцепочечные жирные кислоты, триптофан и его производные, а также бактериоцины.

Микробы-симбионты должны быть приняты иммунологически, тогда как кишечные патогены должны быть устранены. Эта дифференциация требует активации чрезвычайно хо-

рошо скоординированной и эффективной иммунной системы. Микробиота развивает взаимовыгодные отношения с организмом путем взаимодействия с кишечным эпителием и кишечной лимфоидной тканью (GALT). Эти симбиотические отношения облегчаются наличием специфических рецепторов и иммуномодулирующей способностью с помощью антигенных структур, экспонируемых кишечной микробиотой.

Ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань включает изолированные или агрегированные лимфоидные фолликулы (бляшки Пейера), внутриэпителиальные лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, брыжеечные ганглии, секреторные клетки IgA (sIgA) и лимфатические клетки. Пейеровы бляшки, локализованные в слизистой и подслизистой оболочках кишечника, покрыты «эпителием, ассоциированным с фолликулами», содержащим специализированные «М-клетки». Эти клетки поглощают и транспортируют антигены из просвета кишечника в кишечные дендритные клетки и Т-клетки. В то же время М-клетки инициируют продуцирование sIgA в слизистой оболочке и гуморальные реакции [3]. Таким образом, Пейеровы бляшки непосредственно опосредуют взаимодействие между кишечной флорой и гуморальным или клеточным иммунным ответом.

Микробно-тканевой комплекс кишечника фактически осуществляет антигенную и метаболическую интеграцию микробиоты кишечника с гомеостазом организма человека — фактор, претендующий на одну из ключевых ролей в патогенезе практически всех заболеваний. Между колониями микроорганизмов и подлежащими структурами имеется тесная структурная и функциональная взаимосвязь, что позволяет их объединить в единый микробно-тканевой комплекс (МТК). Таким образом, МТК образуют: 1) микроколонии бактерий и продуцируемые ими метаболиты; 2) муцины; 3) эпителиальные клетки слизистой оболочки; 4) клетки стромы слизистой оболочки (фибробласты, нейроэндокринные клетки, клетки микроциркуляторного русла). Метаболический, иммунологический и нейрогенный компоненты обеспечивают экзогенные нутриенты и продукты метаболизма и деградации микробиома.

Следовательно, анализ влияния на гомеостаз макроорганизма экзогенных соединений, поступающих через желудочно-кишечный тракт и, возможно, модулирующих состояние иммунной системы, необходимо сочетать с рассмотрением изменений интегральных показателей, характеризующих как состояние МТК, так и GALT, в форме пейеровых бляшек.

Триптофан — незаменимая аминокислота, которая содержится в основном в белковой пище и его доступность во многом зависит от рациона питания. Содержание триптофана в белках и плазме крови ниже, чем остальных 20 протеиногенных аминокислот. Следовательно, доступность триптофана ниже для макроорганизма, чем других аминокислот, и по этой причине, и вследствие наличия своих специфических физико-химических свойств, он играет лимитирующую роль во время синтеза белка. Кроме того, триптофан является предшественником множества биологически активных соединений, включая серотонин, мелатонин, триптамин, хинолиновую кислоту и кинуреновую кислоту, одновременно внося вклад в обеспеченность организма коферментами НАД и НАДФ [4, 5].

В отличие от периферических лимфатических узлов пейеровы бляшки конститутивно формируют ответ на комменсальные микроорганизмы и антигены пищевого происхождения, поглощаемые М-клетками. Пролиферация лимфоцитов и синтез цитокинов требуют адекватного потребления аминокислот из просвета кишечника. Поскольку транспорт триптофана обеспечивают семейства переносчиков, акцептирующих большие нейтральные аминокислоты, остается открытым вопрос о возможном дисбалансе обеспеченности свободными аминокислотами лимфоцитов бляшек в условиях поступления избыточного количества триптофана. Известно, что хотя триптофан хорошо всасывается, его всасывание снижается в присутствии других аминокислот.

С другой стороны катаболиты триптофана могут выполнять иммуномодулирующие функции, например, через кинурениновый или серотониновый пути. Показано, что добавление триптофана к пище не приводило к значительным изменениям концентрации цитокинов в сыворотке. Пероральное введение триптофана в количестве от 1,0 до 5,0 г/сут в течение 21 суток не влияло на потребление пищи, массу тела, общие биомаркеры и аминокислотный состав крови и мочи [6].

Значительная часть триптофана метаболизируется в желудочно-кишечном тракте микро-

биотой кишечника, образующей ряд биологически активных молекул, включая кинуренины и лиганды арилуглеводородного рецептора. Скорость-лимитирующими ферментами в этих процессах является индоламин-2,3-диоксигеназа-1, а продукция серотонина (5-гидроксиทริปтамин) особенно интенсивно идет в энтерохромаффинных клетках с участием триптофангидроксилазы-1.

Индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО) экспрессируется в некоторых субпопуляциях миелоидных клеток, включая CD11c+, CD8+, дендритные клетки мышей и CD123+ дендритные клетки у человека. Основной функцией ИДО считается подавление микробной инфекции путем снижения доступности триптофана в инфицированной ткани. Экспрессия ИДО в антигенпрезентирующих клетках коррелирует со слабой пролиферацией Т-лимфоцитов, увеличивая апоптоз и ослабляя иммунные ответы *in vivo*. Недостаточность триптофана блокирует активацию Т-лимфоцитов. Триптофан стимулирует фагоцитарную активность макрофагов [7].

Таким образом, экзогенное пероральное введение триптофана посредством воздействия на клетки кишечника (энтерохромаффинные, эндокринные, клетки иммунной системы и др.), а также катаболизируясь микробиотой может оказывать влияние на гомеостаз не только в желудочно-кишечном тракте, но всего организма.

Цель работы — анализ спектра свободных аминокислот и их азотосодержащих метаболитов в микробно-тканевом комплексе и пейеровых бляшках крыс после курсового введения триптофана.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на беспородных белых крысах-самках, массой 120–140 г, при свободном доступе животных к пище и воде. Животные были разделены на 2 группы: 1-я группа (контрольная) — внутрижелудочно в течение 10 дней вводили физраствор; 2-я группа — внутрижелудочно триптофан в дозе 40 мг/кг массы в течение 10 дней. Декапитацию животных осуществляли на 11-е сутки через 24 ч после последнего введения аминокислоты. Все манипуляции с животными проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Для анализа использовали безбелковые экстракты микробно-тканевого комплекса кишечника и пейеровых бляшек крыс. Определение свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-мер-

каптопро-пионовой 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 их обсуждение. Микробно-тканевой комплекс кишечника содержит свободные аминокислоты, которые поступают в клетки из просвета кишечника в процессе рас-

щепления пищевых и эндогенных белков, а также в некоторой степени синтезированные местной микробиотой. Взаимодействие между энтероцитами и микрофлорой (включая ее метаболиты) оказывает определяющее влияние на метаболизм интестинальных клеток и гомеостаз всего организма [9]. Внутривентрикулярное введение животным триптофана снижало в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника содержание протеиногенных аминокислот: аспарагиновой кислоты (на 32,2 %), глутаминовой кислоты (на 23 %), аспарагина (на 18 %) и глицина (на 17 %). Уменьшалось содержание азотосодержащих производных аминокислот — таурина (на 31 %) и α -аминомасляной кислоты (на 41 %) (таблица 1).

Таблица 1 — Изменения концентраций свободных аминокислот в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника крыс, получавших триптофан (40 мг/кг массы, 10 дней) $M \pm m$, нмоль/г.

Исследуемый показатель	Контроль	Триптофан
Аспарагиновая кислота	917 \pm 91	621 \pm 51*
Глутаминовая кислота	1693 \pm 112	1308 \pm 55*
Аспарагин	726 \pm 119	598 \pm 52*
Глицин	4734 \pm 291	3936 \pm 188*
Таурин	4686 \pm 541	3219 \pm 196*
α -аминомасляная кислота	34 \pm 3,7	20 \pm 3,9*

* Статистически значимо относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

Известно, что большая часть глутамин и почти весь глутамат и аспарат, поступающий в энтероциты, катаболизируется. Слизистая оболочка тонкого кишечника также играет важную роль в утилизации аргинина, пролина и аминокислот с разветвленной цепью, а также глицина и серина, поступающих перорально, только 30–50 % экзогенных аминокислот попадают в портальную вену.

Аминокислоты являются основным источником энергии для слизистой оболочки тонкого кишечника и являются предшественниками

глутатиона, оксида азота, полиаминов, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, а также предшественниками в метаболических циклах (аланин, цитруллин и пролин). Треонин и аргинин являются ключевыми в поддержании целостности слизистой оболочки кишечника.

В пейеровых бляшках уровни протеиногенных аминокислот не изменялись, однако наблюдали повышение уровня цитруллина (в 1,3 раза), снижение концентрации β -аминомасляной (на 16,7 %) и α -аминомасляной кислот (на 30 %) (таблица 2).

Таблица 2 — Изменений концентраций азотосодержащих метаболитов аминокислот в пейеровых бляшках крыс, получавших триптофан (25 мг/кг, 10 дней) $M \pm m$, нмоль/г.

Исследуемый показатель	Контроль	Триптофан
Цитруллин	136 \pm 8,2	169 \pm 12,9*
β -аминомасляная кислота	18 \pm 0,9	15 \pm 0,5*
α -аминомасляная кислота	50 \pm 4	35 \pm 5,7*

* Статистически значимо относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, в данных экспериментальных условиях курсовое внутриве-

нтривентрикулярное введение триптофана не приводит к изменению структуры пула свободных аминокис-

кислот в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и пейеровых бляшках крыс, что свидетельствует о сохранении аминокислотного баланса. Тем не менее, в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника снижались концентрации ряда ключевых для энергетического обмена клеток кишечника свободных аминокислот (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота). Аспарагин и глицин могут быть востребованы в синтезе азотистых оснований, необходимых в процессах пролиферации клеток кишечника.

Известно, что основную часть триптофана, попадающего в ЖКТ утилизирует микробиота кишечника, образуя ряд биологически активных молекул (в основном кинуренины, в

том числе лиганды арилуглеводородного рецептора, а также серотонин). Многие гомеостатически значимые эффекты в метаболических осях кишечник–печень и кишечник–мозг метаболитов триптофана могут быть реализованы путем воздействия на все многообразие клеток кишечника и рецепторы блуждающего нерва. Следовательно, метаболические эффекты аминокислот, в данном случае перорально введенного триптофана, на организм необходимо рассматривать не только как поддержание целостности барьера слизистой оболочки кишечника, нормального функционирования лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника, но и для гомеостаза организма в целом.

Список цитированных источников

1. Takiishi, T. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life / T. Takiishi, C. I. M. Fenero, N. O. S. Cvmara // *Tissue Barriers*. — 2017. — Vol. 5, № 4. — P. 13–20.
2. Rajilić-Stojanović, M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. / M. Rajilić-Stojanović, H. Smidt, W.M. De Vos, // *Environ Microbiol*. — 2007. — Vol. 9. — P. 2125–2136.
3. Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria / D. Rios [et al.] // *Mucosal Immunol*. — 2016. — Vol. 9, № 4. — P.907–916.
4. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration / M. Lesurtel [et al.] // *Science*. — 2006. — Vol. 312. — P. 104–107.
5. Friedman, M. Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan / M. Friedman // *Int. J. Tryptophan Res.* — 2018. — Vol. 11. — P. 86–91.
6. Wells, G. Investigating the Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review / G. Wells, P. T. Kennedy, L. N. Dahal // *Front. Immunol*. — 2021. — Vol. 12. — P. 651–687.
7. Appleton, J. The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health / J. Appleton // *Int. Med. (Encinitas)*. — 2018. — Vol. 17, № 4. — P. 28–32.

Free amino acids in the microbial tissue complex and Peyer's patches after triptofan course introduction

Sheybak V. M.¹, Nikolaeva I. V.¹, Pavlyukovets A. Yu.²

¹ *Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus;*

² *Grodno Regional Center for Transfusiology, Grodno, Republic of Belarus*

The aim of the study was to analyze the spectrum of free amino acids and their nitrogen-containing metabolites in the microbial-tissue complex and Peyer's patches of rats after a course of administration of tryptophan. The animals were intragastrically injected with tryptophan at a dose of 40 mg/kg body weight for 10 days. Course intragastric administration of tryptophan does not lead to a change in the structure of the pool of free amino acids in the microbial-tissue complex of the small intestine and Peyer's patches of rats, which indicates the preservation of the amino acid balance. However, in the microbial-tissue complex of the small intestine, the concentrations of a number of free amino acids key for the energy metabolism of intestinal cells (aspartic acid, glutamic acid) decreased.

Keywords: microbial-tissue complex of the small intestine, Peyer's patches, free amino acids, tryptophan.

Поступила 08.06.2022