

## ФОНД СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В РЕЗИДЕНТНЫХ ЛИМФОЦИТАХ СЕЛЕЗЕНКИ ПЕЧЕНИ: ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА

В.М. Шейбак, А.Ю. Павлюковец, А.И. Жмакин, Е.М. Дорошенко  
Гродненский государственный медицинский университет

Развитие промышленного производства и усиливающееся загрязнение окружающей среды делают актуальными клинические и экспериментальные исследования причин и механизмов развития токсического действия солей тяжелых металлов. Показано, что по сравнению с другими катионами тяжелых металлов (Ni, Mn, Hg), свинец обладает наиболее высокой кумулятивной способностью. Поскольку  $Pb^{2+}$  не является необходимым компонентом тканей животных и человека, его присутствие нарушает обмен макро- и микроэлементов, особенно  $Ca^{2+}$ ,  $Se^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ . Исследования патофизиологических и патобиохимических механизмов развития патологического процесса в организме животных и человека однозначно указывают на ведущую роль в инициации всего комплекса морфобиохимических изменений иммунной системы [6].

Являясь двухвалентным катионом, свинец обладает избирательной способностью вступать в химическое взаимодействие с различными макромолекулами организма, в первую очередь с ферментами и другими белками, а также некоторыми аминокислотами, содержащими SH-группы. Образующие  $Pb^{2+}$  ковалентные и координационные связи с сульфгидрильными, фосфатными и карбоксильными группами плазматических белков повышают жесткость мембраны и снижают ее устойчивость к осмотическому стрессу. Кроме того,  $Pb^{2+}$  накапливается в клетках, в первую очередь, костного мозга, селезенки и печени, влияет на биосинтез белка, энергетический баланс и генетический аппарат клетки [3, 5]. Наиболее выраженные негативные эффекты свинца регистрируются в быстро пролиферирующих клетках и тканях. Катионы  $Pb^{2+}$ , взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами и факторами транскрипции, препятствуя реализации регуляторной и структурной функции  $Ca^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , нарушают экспрессию генов и транскрипцию ДНК. В частности, *in vitro* ацетат свинца ( $2-7 \times 10^{-4}$  М) блокирует синтез РНК в спленоцитах крыс [1], что уменьшает функциональную активность Т- и В-лимфоцитов. Хроническое поступление свинца в организм снижает в сыворотке крови уровни ИЛ-1 $\beta$ , и ИНФ- $\gamma$ , а также число и процент CD16 $^{+}$  клеток [8].

С другой стороны, влияние катионов свинца на гуморальный и клеточный иммунный ответ определяется торможением синтеза IgG, реализации Т-зависимого комплекса иммунных реакций и устойчивости к инфекционным агентам у мышей и крыс. Одновременно, нагрузка свинцом повышает функциональную активность В-лимфоцитов (тестируемую по реакции розеткообразования) и пролиферацию Т-хелперов (Th2) у мышей, а также стимулирует развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа и анафилактическую реакцию на овоальбумин. Свинец усиливает активацию Th2 и тормозит Th1 хелперов, при этом проявляется стимулирующее действие свинца на дифференцировку мышинных В-лимфоцитов [7]. Таким образом, катионы свинца обладают биполярным действием на иммунную функцию в зависимости от дозы и кратности введения, оказывая иммуномодулирующий, но, в целом, супрессивный, эффект.

Нами ранее показано, что введение солей свинца значительно снижает концентрации свободных серо-содержащих аминокислот в ткани печени и приводит к аминокислотному дисбалансу в плазме крови, что сопровождается изменением общего спектра показателей пула свободных аминокислот в иммунокомпетентных тканях [2].

**Цель работы** — сравнительный анализ фонда свободных аминокислот в лимфоцитах селезенки и печени при однократном и курсовом введении в организм животных ацетата свинца.

**Материал и методы.** Эксперименты проведены на белых крысах-самках массой 160–190 г. Было проведено 2 серии экспериментов. В первой серии животные получали ацетат свинца внутривенно в дозе 150 мг/кг массы однократно в виде 0,15%-го раствора. Животных декапитировали на 11-е сут после введения ацетата свинца. Во второй серии животные получали ацетат свинца с питьевой водой (0,03%-й раствор) 30 дней. Для анализа использовали лимфоциты выделенные из селезенки и печени. Определение концентраций свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фтальевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Определение содержания 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.** Исследования показали, что в лимфоцитах, выделенных из селезенки животных, подвергнутых острой свинцовой интоксикации, повышены концентрации аспартата (в 1,7 раза) и триптофана (в 2,3 раза), а также общее содержание протеиногенных аминокислот (с  $16,0 \pm 2,12$  до  $24,5 \pm 2,48$  нмоль/ $10^6$  клеток).

В то же время при хронической свинцовой интоксикации, в лимфоцитах, выделенных из селезенки, значительных изменений структуры аминокислотного фонда не наблюдали. Однако, нами обнаружено существенное повышение суммарного количества лейцина, изолейцина и валина (АРУЦ) с  $2,1 \pm 0,24$  до  $2,8 \pm 0,18$  нмоль/ $10^6$  клеток, что может свидетельствовать об активном транспорте этих незаменимых аминокислот в клетки для синтеза белковых молекул, обладающих аутокринной и паракринной биологической активностью (хемокины, цитокины). Известно, что в отдельных тканях помимо субстратной функции, в определенных физиологических условиях (повышенное содержание аминокислот в клетке, высокая концентрация инсулина) лейцин выполняет регуляторную функцию активатора биосинтеза белка, в частности, процесса инициации трансляции [4].

В лимфоцитах печени на 11 сутки после острой свинцовой интоксикации происходит достоверное увеличение уровней большинства свободных заменимых аминокислот в 2–4 раза (аспартата, глутамата, серина, глутамина, гистидина, глицина, аргинина, аланина), а также незаменимых аминокислот: (лизина, тирозина, валина, метионина, фенилаланина, лейцина и треонина). Однократное поступление в организм ацетата свинца достоверно повышало уровни фосфоэтанолamina (в 2,4 раза), цитруллина (в 1,9 раза), этаноламина (в 4,1 раза), орнитина (в 4,0 раза) и таурина (в 2,2 раза). Данные колебания индивидуальных концентраций свободных аминокислот привели к дисбалансу аминокислотного спектра: существенно увеличивалось общее содержание протеиногенных аминокислот (с  $80,2 \pm 15,3$  до  $258,0 \pm 43,1$  нмоль/ $10^6$  клеток). При этом содержание заменимых (с  $55,0 \pm 11,1$  до  $192,0 \pm 27,0$  нмоль/ $10^6$  клеток) и незаменимых аминокислот (с  $21,0 \pm 3,7$  до  $65,4 \pm 17,2$  нмоль/ $10^6$  клеток) увеличивалось синхронно, также как и суммарное содержание АРУЦ (с  $12,2 \pm 1,83$  до  $34,6 \pm 9,4$  нмоль/ $10^6$  клеток). О преимущественном использовании транспортируемых в клетки аминокислот для биосинтетических целей свидетельствует менее выраженное повышение общего количества азотсодержащих метаболитов аминокислот (с  $41,5 \pm 5,43$  до  $108,3 \pm 13,45$  нмоль/ $10^6$  клеток) и серосодержащих аминокислот (с  $28,8 \pm 3,55$  до  $58,8 \pm 5,9$  нмоль/ $10^6$  клеток). Подтверждением иммуносупрессивного действия катионов  $Pb^{2+}$  являются полученными нами данные об отсутствии значимого ответа со стороны клеток иммунной системы. Так, в лимфоцитах печени в ситуации хронической нагрузки ацетатом свинца отсутствовали существенные изменения аминокислотного фонда и его отдельных показателей. Между тем о нарушении метаболического баланса свидетельствовало статистически значимое увеличение концентрации метионина с  $0,2 \pm 0,03$  до  $0,6 \pm 0,18$ . Метионин является одной из основных аминокислот, инициирующих белковый синтез и обеспечивающих адекватный синтез ключевых эндогенных антиоксидантов (цистеин, глутатион, таурин), а также с помощью механизма метилирования обеспечивающей эпигенетическую регуляцию экспрессии генов.

Таким образом, анализ аминокислотного фонда в клетках иммунной системы на различных стадиях интоксикации свинцом позволяет выделить отдельные фазы воздействия токсиканта на метаболизм в лимфоцитах, что может быть основой стратегии разработки профилактических и лечебных мероприятий.

#### **FOUND FREE AMINO ACIDS IN RESIDENT LYMPHOCYTES OF SPLEEN AND LIVER: LEAD ACETATE INFLUENCE**

*V.M. Sheibak, A.Y. Pavlyukovets, A.I. Zhmakin, E.M. Doroshenko*

A comparative analysis amino acids fund of free in the lymphocytes of the spleen and liver after a single and course administration of lead acetate has been performed. The level of aspartate and tryptophan, as well as the total content of proteinogenic amino acids is increase in the lymphocytes isolated from the spleen of the animals exposed to acute lead intoxication. The levels of majority of the defined nonessential and essential amino acids as well as nitrogen-containing metabolites (phosphoethanolamine, citrulline, ethanolamine, ornithine and taurine) is increase in lymphocytes of the liver. BCAA level is increase in lymphocytes of the spleen in case of chronic lead intoxication. No significant changes in lymphocytes of the liver of animals exposed lead acetate chronic intoxication have been detected.

#### **Литература**

1. Латушко, Т.В. Влияние химических и медикаментозных препаратов на структурно-функциональные системы организма / Т.В. Латушко, Е.В. Барковский. — Минск, 1992. — С. 107–114.
2. Павлюковец, А.Ю. Острая свинцовая интоксикация повышает концентрации свободных аминокислот в лимфоцитах печени / А.Ю. Павлюковец // Материалы конференции студентов и молодых ученых, посвящ. памяти проф. М.В. Кораблева, Гродно, 18–19 апр. 2013 г. — Гродно, 2013. — С. 334–335.
3. Moussa, S.A. Biophysical and biochemical changes in blood of rats exposed to lead toxicity / S.A. Moussa, S.A. Bashandy // Roman. J. Biophys. — 2008. — Vol. 18. — P. 123–133.
4. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation / J.C. Anthony [et al.] // J. Nutr. — 2000. — Vol. 130. — P. 139–145.
5. Patra, R.C. Effect of antioxidant ascorbic acid, l-methionine or  $\alpha$ -tocopherol alone or along with chelator on cardiac tissue of lead-treated rats / R.C. Patra, D. Swarup // Veterinar. Arh. — 2004. — Vol. 74, № 3. — P. 235–244.

6. Heavy metal contamination in soil, water and their presence in livestock and products: a review / V. Rajaganapathy [et al.] // J. Environ. Sci. Technol. — 2011. — Vol. 4. — P. 234–249.

7. Resteksamorzija, N. Lead induced renal impairment: hypertension, anaemia and immunological changes / N. Resteksamorzija, R. Turk, B. Momcilovic // Vet. Hum. Toxicol. — 1993. — Vol. 35. — P. 354.

8. The cellular effect of lead poisoning and its clinical picture / R. Brochin [et al.] // GUJHS. — 2008. — Vol. 5. — P. 8–16.