

УДК 619:616.935:636.2:577.115.3

КОРЕКЦІЯ ОБСЯГІВ ГЛЮКОГЕННИХ АМІНОКИСЛОТ У КРОВІ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ АЛКОГОЛЬНДУКОВАНОГО СТЕАТОЗУ ПЕЧІНКИ

Л. Калачнюк**, І. Сидір-Басараб***, Д. Мельничук**, Г. Калачнюк****

*Науково-дослідний інститут біотехнологічних основ підвищення продуктивності тварин Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького
вул. Пекарська, 50, Львів 79010, Україна

**Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ 03041, Україна

***Інститут фізіології і генетики тварин Чеської АН
вул. Віденська, 1083, Прага 4-Krč 14200, Чеська Республіка

Отримані результати свідчать, що за умов розвитку алкогольндукованого стеатозу печінки у плазмі крові щурів вірогідно зростає вміст вільних глюкогенних амінокислот – аланіну, глютамінової кислоти, глютаміну (Ala, Glu, Gln) та їхньої сумарної кількості. Відсоткове збільшення вмісту згаданих амінокислот може коливатися в межах 25,1–38,9%, а зростання їхньої суми сягає 33,1%. Використання фосфоліпідвмісних комплексних добавок рослинного і тваринного походження дає змогу не тільки зупинити, але й знизити зростання обсягів вказаних амінокислот. Ефективність позитивної корекції біологічно активними добавками на основі фосфоліпідів молока є на 5–13% вищою, ніж добавкою соєвого походження. Обговорюються причини і біохімічні механізми виявлених змін у спектрі глюкогенних амінокислот крові. Стимулюючу дію етанолу на процес зростання вмісту глюкогенних амінокислот у крові пов'язують із порушенням структурно-функціонального стану мембран у клітинах органів травної системи та м'язової тканини. Своєрідний рівень нормалізації вмісту вищевказаних амінокислот у крові при застосуванні таких фосфоліпідвмісних комплексів, як EPL “Есенціале”, FLP-MD і LP FLP-MD, пояснюють їхнім відновлювальним впливом на структуру й функції мембран і відновні реакції глюкозо-аланінового циклу, дезамінування, трансамінування, циклу трикарбонових кислот та інших метаболічних шляхів.

Ключові слова: глюкогенні амінокислоти, алкогольндукований стеатоз печінки, кров, фосфоліпідвмісні комплексні добавки, щурі.

Раніше нами було показано [1–5], що за умов інтоксикації етанолом (*EtOH*) у крові щурів вірогідно ($P \leq 0,001$) зростають концентрації триацилгліцеролів, холестеролу, білірубину й активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), аспартат- й аланінамінотрансфераз (АсАТ й АлАТ) і γ -глютамілтранспептидази на тлі вірогідного ($P \leq 0,001$) зростання в гепатоцитах вмісту малонового діальдегіду та зниження активності супероксиддисмутази й каталази. Зміни вказаних та багатьох інших біохімічних показників свідчать про деструктивну дію *EtOH* на обмінні процеси в організмі тварин і передусім на значні порушення структурно-функціонального стану мембран клітин печінки. Поряд із цим було встановлено, що завчасне застосування фосфоліпідвмісних препаратів рослинного і тваринного походження вірогідно нівелює виявлені порушення [1–5, 7–9]. За даними літератури [6, 10, 11], хронічна алкогольна інтоксикація сприяє ряду порушень обміну

білків і амінокислот (АК). Тому, виходячи з вищенаведеного, метою наших подальших досліджень було вивчити зміни у спектрі вільних амінокислот крові щурів, у яких ожиріння печінки викликали споживанням алкоголю, а відновлення рівня біохімічних процесів здійснювали шляхом застосування фосфоліпідвмісних комплексних добавок рослинного і тваринного походження. У цьому повідомленні основну увагу ми зосередили на особливостях змін у формуванні пулу вільних глюкогенних АК за дії екзогенних чинників.

Досліди проводили на 25 щурах-самцях живою масою 130–150 г, які були розділені на п'ять груп по 5 тварин у кожній. Щури 1-ї (контрольної) групи у складі раціону одержували ізокалорійний розчин глюкози (40%-ний розчин), 2, 3, 4 і 5-ї груп – (окрім глюкози) алкоголь (30%-ний розчин v/v) по 8 г/кг живої маси *per os*. Крім цього, тварини 3, 4 і 5-ї груп за 1 год до введення етанолу і глюкози додатково отримували фосфоліпідвмісну добавку зі сої EPL («Есенціале», 25 мг/ 1 кг живої маси), FLP-MD (фосфоліпідвмісна добавка на основі відходів молока – по 25 мг/ 1 кг живої маси) і LP (ліпосомальна форма фосфоліпідної молочної добавки, 10 мг/ 1 кг живої маси) відповідно. Детальний опис методики подано раніше [1–5]. Плазму крові депротейнізували сульфасаліциловою кислотою і супернатант використовували для амінокислотного аналізу іонообмінною хроматографією HPLC (model 6300, Beckman Instruments, Fullerton, CA). Оптичну густина вимірювали при 440 і 570 нм після постколоночної обробки нінгідрином. Як внутрішній стандарт використовували (S)-2-аміноетил-L-цистеїн. Отримані цифрові дані обробляли статистично з використанням критерію Стьюдента «t».

Отримані результати стосовно визначення вмісту окремих основних вільних глюкогенних амінокислот (ВГАК) та їхньої сумарної кількості у плазмі крові за дії екзогенних факторів наведено в табл. 1, а відсоткові зміни їхнього вмісту – на рис. 1.

Із наведених у табл. 1 даних видно, що споживання алкоголю викликає вірогідне збільшення кожної зі згаданих вільних глюкогенних амінокислот (Ala, Glu і Gln) та їхньої суми у плазмі крові щурів. Вказані на рис. 1 відсоткові зміни вмісту цих АК перебувають у межах 25,1–38,9%, а збільшення їхньої суми становить 33,1%.

Виявлені зміни свідчать про можливу стимулюючу дію екзогенного *EtOH* на процеси утворення та використання вуглецевого ланцюга й амінного азоту вказаних амінокислот у функціонуванні клітин печінки не тільки в реакціях у напрямі глюконеогенезу, а й у багатьох інших дуже важливих внутрішньоклітинних перетвореннях на рівні ціло-

Таблиця 1

Вміст окремих вільних глюкогенних амінокислот і їхньої сумарної кількості у плазмі крові щурів за умов розвитку алкогольіндукованого стеатозу печінки та впливу фосфоліпідвмісних комплексних добавок ($M \pm m$; $n=5-15$)

Групи тварин	ВГАК, мкмоль/л			
	Ala	Glu	Gln	$\Sigma_{\text{ВГАК}}$
1 (К; контроль)	406±23	358±19	531±24	1295±77
2 (К+EtOH)	564±26*	496±23*	664±17*	1724±66*
3 (К+EtOH+EPL)	503±13*#	432±11*#	583±22*#	1518±63*#
4 (К+EtOH+FLP-MD)	471±24#	384±17#	556±23#	1411±71#
5 (К+EtOH+LP)	452±20#	373±22#	547±27#	1372±58#

Примітки. * вірогідні різниці ($P \leq 0,05-0,001$) порівняно з контролем; # вірогідні різниці ($P \leq 0,05-0,001$) порівняно з 2-ю групою («алкогольною»).

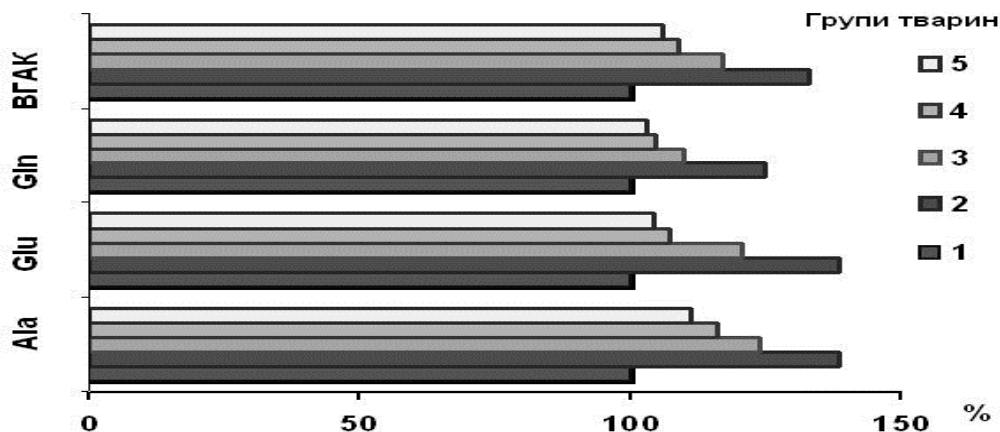


Рис. 1. Відсоткові зміни вмісту вільних глюкогенних амінокислот у плазмі крові щурів за дії екзогенних чинників (M; n=5–15).

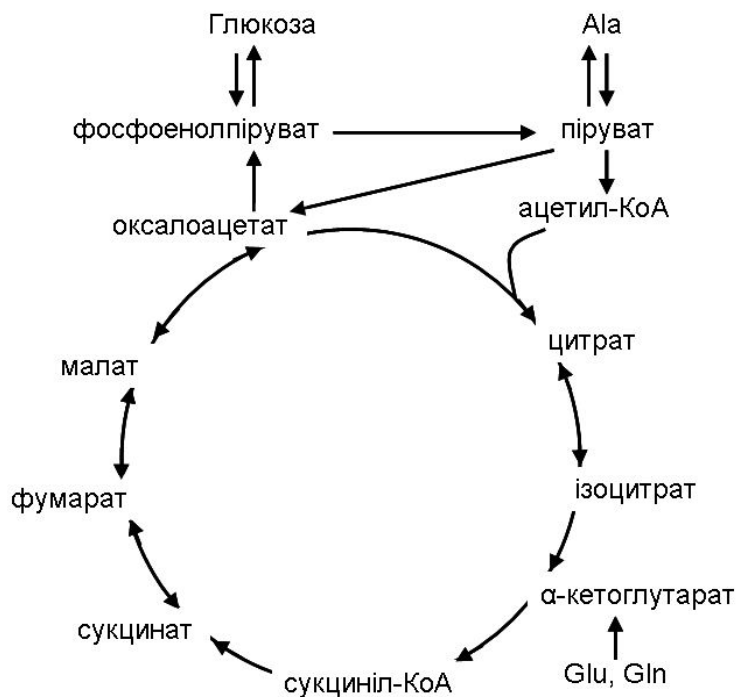


Рис. 2. Окислювальна деградація вуглецевого ланцюга Ala, Glu і Gln.

го організму. Адже відомо, що окислювальна деградація вуглецевого ланцюга Ala, Glu і Gln, як і багатьох інших амінокислот, завершується утворенням сполук, які включаються в цикл трикарбоних кислот (ЦТК). Так, якщо з Ala спочатку утворюється піруват, а потім із нього – ацетил-КоА, то з Glu і Gln утворюється α -кетоглутарат, із якого після серії ензиматичних реакцій синтезується оксалоацетат, що разом з ацетил-КоА дає змогу функціонувати ЦТК (рис. 2), а також (через фосфоенолпіруват) – синтезувати глюко-

зу. Слід зазначити, що Gln гідролізується до Glu глутаміназою або прямо дезамінується до амідю α -кетолутарамової кислоти, яка потім гідролізується до α -кетоглутарової кислоти й аміаку (рис. 3).

В організмі окисному дезамінуванню передують трансамінування, у результаті якого всі амінокислоти перетворюються у відповідні кетокислоти. Водночас α -кетоглутарат перетворюється у глутамат, який і стає об'єктом окислювального дезамінування. Цей процес відбувається під дією специфічної глутаматдегідрогенази (ГДГ), для роботи якої необхідним є NAD^+ . Продуктами реакції виявляються α -кетоглутарат і NH_3 (рис. 4). Цей шлях перетворень АК є досить загальним. ГДГ, завдячуючи її ключовим позиціям у перетворенні АК, є алостеричним ферментом, що складається із декількох однакових субодиниць. Молекулярна маса цього ферменту 280 000.

Ензим здатний утворювати агрегати паличкоподібної форми з молекулярною масою $2,2 \cdot 10^6$. Ефектори впливають на рівновагу між мономерною і полімерною формами. Він інгібується АТР, ГТР, НАДН, а активується АДФ і різними АК. Активність його змінюється також під дією тироксину і деяких стероїдних гормонів.

Із експериментальних даних видно, що під дією алкоголю більше як на третину зростають обсяги утворення досліджуваних глюкогенних АК у плазмі крові, а також, можливо, посилюються реакції їх використання у багатьох процесах цілого організму і передусім у глюкозо-аланіновому циклі, де у м'язах утворений із пірувату аланін посилено виділяється у кров і транспортується нею до печінки. У клітинах печінки Ala трансформується у піруват, з якого може синтезуватися глюкоза. Очевидно, завдяки таким та низці багатьох інших перетворень під дією EtOH відбувається виснаження м'язової тканини. Адже тут можливі завчасні перевитрати аланіну, глутамату й енергетичних запасів для цілеспрямованого поповнення фонду пірувату й ацетил-КоА у клітинах печінки. Паралельне підвищення вмісту Glu і Gln можна розцінювати, передусім, як превентивний засіб цілого організму для прискореного біосинтезу фолієвої кислоти із Gln, використання азоту його амідної групи та вуглецевого ланцюга для утворення багатьох інших сполук (наприклад, при синтезі гуанозин-5'-фосфату в присутності GMP-синтази чи в синтезі глюкозаміну з D-фруктози-6-фосфату під дією глюкозамін-6-фосфатізомераз, а також при синтезі сечовини в реакції $\text{CO}_2 + \text{ATP} \rightarrow$ карбамоїлфосфат, цитидин-5'-трифосфату, надлишків глутамату й α -кетоглутарату, триптофану,

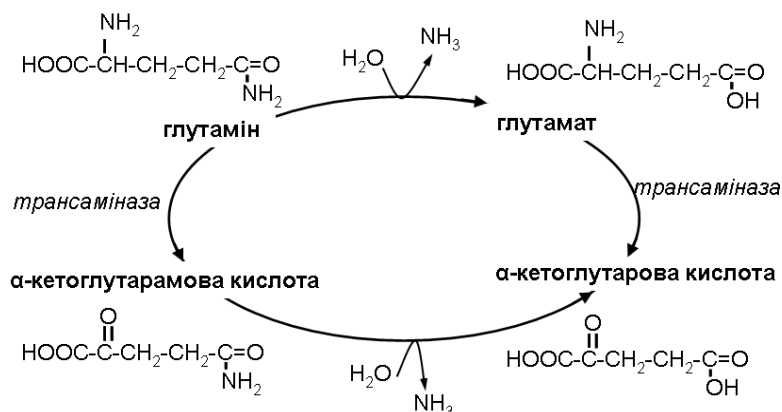


Рис. 3. Метаболізм глутаміну і глутамату.

гістидину, білків тощо). Безперечно, визначальною є також роль сполук Glu і Gln у підтриманні процесів трансамінування (рис. 3).

Важливо зазначити, що всі застосовані нами лікарські препарати (EPL, FLP-MD і LP) вірогідно знижували рівень вмісту Ala, Glu, Gln і $\Sigma_{\text{ВГАК}}$ у плазмі крові порівняно з 2-ю («алкогольною») групою. Причому за умов застосування фосфоліпідвмісних комплексних добавок тваринного походження (FLP-MD та особливо ліпосомальної форми LP) був отриманий ефект вищий порівняно з рослинним (EPL – «Есенціале»). Виявлені переваги коливались у межах 5–13% (рис. 1).

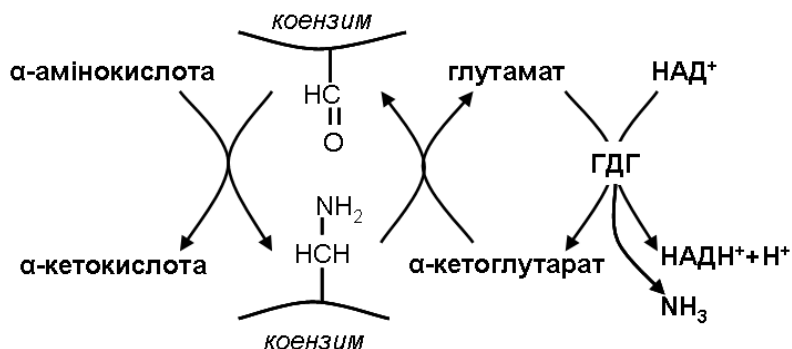


Рис. 4. Основний шлях окисного дезамінування амінокислот.

Загалом, наведені дані узгоджуються із результатами наших попередніх досліджень і зокрема тих, що стосуються зміни окремих показників, які віддзеркалюють інтенсивність окисно-відновних процесів, трансамінування, ліпідного обміну, алкоголь-метаболізуючих та інших реакцій в організмі щурів за дії використаних токсичних і біопротекторних речовин [1 – 5].

За умов розвитку алкогольіндукованого стеатозу печінки вірогідно підвищується вміст вільних глюкогенних амінокислот – Ala, Glu, Gln і їхньої сумарної кількості в плазмі крові щурів.

Використання фосфоліпідвмісних комплексних добавок рослинного (EPL – «Есенціале») й тваринного (FLP-MD і LP) походження знижує вміст глюкогенних амінокислот у крові. Причому найвищий ефект проявляє ліпосомальна форма біологічно активної добавки, виготовленої на основі фосфоліпідів молока.

1. Калачнюк Л. Г., Мельничук Д. О., Калачнюк Г. І. Регуляція метаболізму жирних кислот та інших ліпідних сполук у жуйних тварин // Укр. біохім. журн. 2007. Т. 79. № 1. С. 22–45.
2. Калачнюк Л. Г., Сидір-Басараб І. М., Калачнюк Г. І., Мельничук Д. О. Зміни активності внутрішньоклітинних ензимів за дії токсиканта і протектора // Наук. вісн. ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. 2009. Т. 11. № 2 (41). Ч. 2. С. 105–109.
3. Калачнюк Л. Г., Мельничук Д. О., Сидір-Басараб І. М. та ін. Зміни активності ліпогенних ензимів у клітині за дії екзогенних факторів // Наук. вісн. ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. 2009. Т. 11. № 3 (42). Ч. 2. С. 76–80.
4. Калачнюк Л. Г., Мельничук Д. О., Сидір І. М. та ін. Антиоксидантна здатність фосфоліпідвмісних комплексів за умов розвитку алкогольіндукованого гепатичного стеатозу // Наук. вісн. ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. 2008. Т. 10. № 3 (38). Ч. 1. С. 99–105.

5. *Калачнюк Л. Г., Мельничук Д. О., Сидір І. М.* та ін. Зміни біохімічних показників крові за екзогенної дії алкоголю та фосфоліпідвмісних комплексів // *Наук. вісн. НАУ.* 2008. Вип. 127. С. 117–120.
6. *Островский С. Ю.* Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма. Минск: Наука и техника, 1995. 280 с.
7. Пат. 86516 Україна, МПК А61К 35/20 А23К 1/100. Ветеринарна біологічно активна добавка ліпосомальної форми та спосіб репаративної терапії в гепатології / Мельничук Д.О., Грищенко В.А., Литвиненко О.М. Бюл. № 8. 2009.
8. *Прохорова А. О., Степанова Л. І., Лапоша О. А.* та ін. Функціонування антиоксидантної системи організму щурів при експериментальній ентеропатології та за її корекції // *Наук. вісн. НАУ.* 2008. Вип. 127. С. 240–245.
9. Рекомендації щодо застосування ліпосомальної форми біологічно активної добавки FLP-MD на основі фосфоліпідів молока при токсичному гепатиті (Науково-методична рада Держкомветмед України: Мельничук Д.О., Грищенко В.А., Томчук В.А., Литвиненко О.М.). К.: Вид. НАУ, 2008. 20 с.
10. *Shepard B. D., Tuma O. L.* Alcohol-induced protein hyperacetylation : mechanisms and consequences // *World J. Gastroenterol.* 2009. Vol. 15. N 10. P. 1219–1230.
11. *Takada A.* Alcohol and Alcoholism: Proc. 4th Congr. ISBRA, Kyoto, Amsterdam etc., 1988. P. 9–16.

**CORRECTION OF GLUCOGENIC AMINO ACIDS CAPACITIES
IN THE BLOOD UNDER CONDITION OF DEVELOPMENT ALCOHOL-INDUCED
HEPATIC STEATOSIS**

L. Kalachnyuk*, I. Sydir-Basarab, D. Melnychuk*, G. Kalachnyuk******

**Biotechnology Research Institute of Animal Production Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyi
50, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine*

***National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
15, Heroiv Oborony St., Kyiv 03041, Ukraine*

****Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences
1083, Videnska St., Prague 4-Krč 14200, Czech Republic*

The obtained results testify that, under condition of development alcohol-induced hepatic steatosis, glucogenic amino acids (alanine, glutamate, glutamine and their total amount) content increases in the blood plasma of rat. Percentage changes of the pointed out amino acids content are at boundary-line of 25.1% to 38.9% and rise of their sum is to 33.1%. Use of complex agents containing phospholipids from plant and animal origin makes possible to reduce increase of the amino acids capacity. Effectiveness of positive correction by biologically active additives on base of milk phospholipids was higher by 5–13% than by one from plant origin (soybeans). It is discussed causes and biochemical mechanisms of the discovered changes of pattern of amino acids in blood. The ethanol effect stimulating on process of glucogenic amino acids in the blood is connected with breaches of cellular membranes structure-functional status in the organs of digestive tract and muscular tissue. Under use of such complex agents containing phospholipids as EPL “Essenciale”, FLP-MD and LP FLP-MD, the peculiar level of normalization of the amino acids content pointed above could be

explained their recovery affect on structure and functions of membranes and reactions of reduction of glucose-alanine cycle, deamination, transamination, three carbonic acid cycle and other metabolic pathways.

Key words: glucogenic amino acids, alcohol-induced hepatic steatosis, blood, complex additives containing phospholipids, rats.

КОРРЕКЦИЯ КОЛИЧЕСТВА ГЛЮКОГЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ В КРОВИ ПРИ РАЗВИТИИ АЛКОГОЛЬИНДУЦИРОВАННОГО СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ

Л. Калачнюк, И. Сыдир-Басараб***, Д. Мельничук**, Г. Калачнюк*****

**Научно-исследовательский институт биотехнологических основ повышения продуктивности животных Львовского национального университета ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжиццокого ул. Пекарская, 50, Львов 79010, Украина*

***Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины*

ул. Героев Обороны, 15, Киев 03041, Украина

****Институт физиологии и генетики животных Чешской АН ул. Виденская, 1083, Прага 4-Krč 14200, Чешская Республика*

Полученные результаты являются свидетельством того, что в условиях алкогольиндуцированного стеатоза печени в плазме крови достоверно возрастает содержание свободных глюкогенных аминокислот – аланина, глутаминовой кислоты, глутамина (Ala, Glu, Gln) и их суммарного количества. Процентное возрастание содержания упомянутых аминокислот может находиться в пределах 25,1–38,9%, а увеличение их суммы достигает 33,1%. Использование фосфолипидсодержащих комплексных добавок растительного и животного происхождения позволяет не только остановить, но и снизить рост количества указанных аминокислот. Эффективность положительной коррекции биологически активными добавками на основании фосфолипидов молока на 5–13% выше, чем при использовании добавки соевого происхождения. Обсуждаются причины и биохимические механизмы обнаруженных изменений в спектре глюкогенных аминокислот крови. Стимулирующее действие этанола на процесс увеличения содержания глюкогенных аминокислот в крови связывают с нарушениями структурно-функционального состояния мембран в клетках органов пищеварительной системы и мышечной ткани. Своеобразный уровень нормализации содержания вышеуказанных аминокислот в крови при использовании таких фосфолипидсодержащих комплексов, как EPL “Эссенциале”, FLP-MD и LP FLP-MD, объясняют их восстанавливающим влиянием на структуру и функции, а также реакции глюкозо-аланинового цикла, дезаминирования, трансаминирования цикла трикарбоновых кислот и других метаболических путей.

Ключевые слова: глюкогенные аминокислоты, алкогольиндуцированный стеатоз печени, кровь, фосфолипидсодержащие комплексные добавки, крысы.

Стаття надійшла до редколегії 14.04.10

Прийнята до друку 07.09.10