

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ АМІНОКИСЛОТ ІЗ
РОЗГАЛУЖЕНИМ БОКОВИМ ЛАНЦЮГОМ У ЩУРІВ ЗА
УМОВ ДИСБАЛАНСУ НУТРИЄНТІВ У ХАРЧОВОМУ
РАЦІОНІ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала: студентка VI курсу, групи 600-M
спеціальності 091 біологія
(освітня програма «біохімія та
лабораторна діагностика»)

Юлія Сандуляк

Керівник: д.б.н., професор Галина КОПИЛЬЧУК

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № ____

від „____” _____ 2022 р.

завідувач кафедри біохімії та біотехнології

_____ д.б.н., професор Галина КОПИЛЬЧУК

Чернівці – 2022

Анотація

Магістерська робота присвячена дослідженню ключових ланок метаболізму амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом за умов дефіциту протеїну та надмірної кількості сахарози в харчовому раціоні: розподілу лейцину, ізолейцину та валіну в скелетних м'язах та плазмі крові; активностей трансаміназ – лейцин-, ізолейцин- та валінамінотрансфераз у мітохондріальній фракції м'язів, а також дегідрогеназ відповідних альфа-кетокислот із розгалуженим ланцюгом у мітохондріях печінки щурів.

Встановлено, що дисбаланс нутрієнтів у харчовому раціоні супроводжується порушенням процесів трансамінування амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом, що характеризується зменшенням вмісту лейцину, ізолейцину й валіну та зниженням активностей відповідних амінотрансфераз у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів.

Споживання надлишку сахарози незалежно від кількості харчового протеїну супроводжується порушенням функціонування дегідрогеназного комплексу розгалужених альфа-кетокислот: активацією кетоізокапроатдекарбоксилази на тлі зниження α -кето- β -метил-валеріатдекарбоксилази та α -кетоізо-валеріатдекарбоксилази у мітохондріальній фракції печінки щурів.

Надмірне споживання сахарози виступає ключовим чинником зниження вмісту амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у плазмі крові щурів, що можна розглядати як характеристику внутрішньоклітинного дефіциту даних амінокислот у м'язах.

Ключові слова: лейцин, ізолейцин, валін, трансамінування, α -кетокислоти з розгалуженим ланцюгом, м'язи, аліментарна депривація протеїну, високосахарозний раціон

Annotation

The master's thesis is devoted to the study of the key links of the metabolism of amino acids with a branched side chain under conditions of protein deficiency and excessive amounts of sucrose in the diet: the distribution of leucine, isoleucine and valine in skeletal muscles and blood plasma; activities of transaminases - leucine-, isoleucine- and valine aminotransferases in the mitochondrial fraction of muscles, as well as dehydrogenases of the corresponding α -ketoacids with a branched chain in the mitochondria of the liver of rats.

It was established that the imbalance of nutrients in the diet is accompanied by a violation of the processes of transamination of amino acids with a branched side chain, which is characterized by a decrease in the content of leucine, isoleucine, and valine and a decrease in the activity of the corresponding aminotransferases in the mitochondrial fraction of skeletal muscles of rats. Consumption of excess sucrose, regardless of the amount of dietary protein, is accompanied by a malfunction of the dehydrogenase complex of branched α -keto acids: activation of ketoisocaproate decarboxylase against the background of a decrease in α -keto- β -methyl-valerate decarboxylase and α -ketoisovalerate decarboxylase in the mitochondrial fraction of rat liver. Excessive consumption of sucrose is a key factor in reducing the content of amino acids with a branched side chain in the blood plasma of rats, which can be considered as a characteristic of the intracellular deficiency of these amino acids in muscles.

Key words: leucine, isoleucine, valine, transamination, branched-chain α -ketoacids, muscle, dietary protein deprivation, high-sucrose diet

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Ю.В. Сандуляк
(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Характеристика амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом.....	7
1.2. Особливості метаболічних перетворень лейцину, ізолейцину та валіну...9	
1.3. Роль амінокислот з розгалуженим боковим ланцюгом у розвитку патологічних станів печінки.....	16
1.4. Амінокислоти з розгалуженим боковим ланцюгом як сигнальні молекули.....	20
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	23
2.1. Об'єкти та методи досліджень.....	23
2.2. Виділення мітохондріальної фракції скелетних м'язів.....	24
2.3. Отримання мітохондріальної фракції печінки.....	24
2.4. Хроматографічний аналіз концентрації АРБЛ.....	25
2.5. Визначення амінотрансферазних активностей АРБЛ.....	26
2.6. Визначення активностей дегідрогеназ α -кетокислот із розгалуженим ланцюгом.....	27
2.7. Статистичні методи.....	28
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	29
ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	47
ДОДАТКИ.....	57

ВСТУП

Останні роки характеризуються стрімким збільшенням патологій гомеостатичних органів, які розвиваються на тлі нутритивного дисбалансу харчових раціонів [1]. Аліментарна депривація протеїну навіть при надлишку надходження енергетичних субстратів часто призводить до функціональної недостатності органів, що збільшує сприйнятливість до інфекцій та/або індукує жирову інфільтрацію печінки [2, 3]

Нині значна увага дослідників зосереджена на встановленні біохімічних механізмів метаболічної адаптації організму, що лежать в основі регулятивних каскадів через специфічні внутрішньоклітинні шляхи обміну есенціальних амінокислот (метіоніну та/або АРБЛ) завдяки координації системної відповіді активністю mTOR, що виступає основним модулятором синтезу протеїнів та передачі сигналів інсуліну [4].

Сигнальний шлях TOR безпосередньо активується за дії факторів росту, доступності амінокислот, енергетичного стану клітини, доступності кисню, дії інших стресорів тощо. У відповідь на зміну умов шлях TOR регулює процеси синтезу ліпідів та білків. Оскільки сигнальний шлях TOR чутливий до надходження поживних речовин, він також контролює процес клітинної відповіді на голодування – автофагію [5].

Амінокислотний дисбаланс – одна з характерних ознак значної кількості захворювань та токсичних впливів на організм. У зв'язку з цим дослідження закономірностей формування фонду вільних амінокислот за умов метаболічного дисбалансу залишається актуальним [3].

Серед внутрішньоклітинних перетворень вільних амінокислот ключова роль належить метаболізму амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом (АРБЛ) – валіну, лейцину та ізолейцину. На відміну від інших амінокислот, АРБЛ піддаються метаболічним перетворенням у м'язах, а не в печінці. На першому етапі катаболізму реакції трансамінування всіх трьох амінокислот супроводжуються утворенням відповідних розгалужених α -кетокислот.

Останні за умов окисного декарбоксилювання в печінці перетворюються до ацил-КоА тіоефірів. З цього моменту катаболізм кожної амінокислоти іде своїм специфічним шляхом. Лейцин перетворюється на ацетоацетат і ацетил-КоА, ізолейцин – на сукциніл-КоА і ацетил-КоА, катаболізм валіну призводить до утворення сукциніл-КоА [6].

Всі три амінокислоти функціонують як сигнальні молекули, що відповідають за регуляцію метаболізму білків, жирів та вуглеводів у організмі: продукт лейцину – 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА – слугує субстратом для синтезу холестеролу; метаболічний продукт валіну – 3-гідроксиізобутират – сприяє накопиченню внутрішньом'язових ліпідів [7].

Накопичення проміжних продуктів АРБЛ в тканинах та органах, а також тканинспецифічна дисфункція ензимів перетворень даних амінокислот можуть слугувати своєрідними біомаркерами при метаболічних синдромах [5]. У літературі [8] зазначається, що інфузії АРБЛ в людей знижують чутливість до інсуліну, що можливе за умов споживання високовуглеводного та високожирового раціонів.

Враховуючи описане вище, метою роботи стало дослідження особливостей метаболізму амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні.

Для досягнення даної мети були поставлені завдання:

1. Дослідити розподіл лейцину, ізолейцину та валіну в скелетних м'язах, печінці та плазмі крові щурів за умов споживання надлишку сахарози на тлі дефіциту харчового протеїну.
2. Дослідити активність ензимів трансамінування – лейцин-, ізолейцин-, валінамінотрансфераз в мітохондріальній фракції м'язів щурів за умов нутритивного дисбалансу.
3. Дослідити активність дегідрогеназ альфа-кетокислот з розгалуженим ланцюгом у мітохондріях печінки за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом

Дисбаланс нутрієнтів в харчовому раціоні нині залишається актуальною проблемою сьогодення. Відомо, що дефіцит харчових протеїнів супроводжується недостатнім надходженням амінокислот [8], насамперед есенціальних. Незамінними вважаються ті амінокислоти, вуглецевий скелет яких не може синтезуватися *de novo*. До таких амінокислот належать: валін, лейцин, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін, тирозин, аргінін, гістидин [9].

Центральним органом утилізації вільних амінокислот є печінка, що слугує ензиматичним арсеналом для катаболізму всіх амінокислот. Однак здатність до метаболізму амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у даному органі дещо обмежена [10]. Найбільшим резервуаром АРБЛ – лейцину, ізолейцину та валіну – є скелетні м'язи. Дані амінокислоти становлять 21 % від загального вмісту білка в людському організмі та 35-40 % від всієї кількості амінокислот у скелетних м'язах [11].

Лейцин, ізолейцин та валін належать до протеїногенних амінокислот, розгалужені ланцюги яких є гідрофобними. Саме ця особливість слугує ключовим фактором, що визначає роль даних амінокислот у формуванні тривимірних структур мембранних та глобулярних білках. Наприклад, лейцинова блискавка (англ. *leucine zipper*) – тип білкової структури, білковий мотив, що часто зустрічається в ДНК-зв'язуючих факторах транскрипції. У лейциновій блискавці амінокислота лейцин знаходиться приблизно в кожному 8-му положенні альфа-спіралі, внаслідок чого лейцинові залишки виявляються на одній її стороні, утворюючи амфипатичну спіраль, в якій одна сторона має гідрофобні властивості.

Валін, лейцин, ізолейцин, метіонін та фенілаланін складають внутрішню частину водорозчинних білків, їхні гідрофобні залишки утворюють неводне середовище, що є важливим для з'єднання молекули кисню з гемоглобіном та міоглобіном.

Лейцин, ізолейцин та валін задіяні в утворенні альфа-спіралей та бета-листів у вторинних структурних елементах протеїнів, також всі три амінокислоти присутні в різних спіралях білка, серед яких є кератин, міозин та фібриноген. Однак, незважаючи на структурну схожість, кожній із амінокислот притаманна різна схильність до мотивів вторинної структури: в α -спіралях найчастіше зустрічається лейцин, в β -спіралях частка лейцину значно менша, водночас ізолейцину та валіну – мізерні кількості. Відмінності в структурі амінокислот відображаються й в тому, що АРБЛ не завжди є взаємозамінними в протеїнах. Наприклад, заміна ізолейцину на валін у транс-тиретині призводить до розвитку кардіоміопатії, характеристикою якої є відкладання амілоїду в серці. Водночас при заміні валіну на лейцин у рецепторі – активованому проліфератором пероксисом, змінюється ліпідний профіль плазми і, навпаки, при заміні лейцину на валін у кальцієвому рецепторі протеїну відбувається порушення, яке призводить до гіпокальціурії [11].

Незважаючи на дещо відмінні функції лейцину, ізолейцину та валіну, їх переамінування відбувається за подібним механізмом. Власне, потрапивши у цитоплазму лейцин, ізолейцин та валін транспортуються до мітохондрій двома шляхами. Перший спосіб постулює те, що АРБЛ можуть переаміновуватися в цитозолі специфічними цитозольними амінотрансферазами, після чого утворені кетокислоти можуть транспортуватися через внутрішню мембрану мітохондрій специфічним білковим транспортером. І, навпаки, амінокислоти із розгалуженим боковим ланцюгом можуть спочатку потрапляти до мітохондрій завдяки транспортерам, з подальшим їх перетворенням на альфа-кетокислоти за допомогою мітохондріальних амінотрансфераз. Таким чином, три амінокислоти циркулюють в плазмі крові у вигляді вільних амінокислот, однак реабсорбуються до тканин за допомогою переносників [12].

Специфічних транспортерів потребують всі вільні амінокислоти: система А слугує транспортером для полярних й нейтральних амінокислот, система ASC для серину, аланіну та цистеїну, транспортери групи N для гістидину та аспарагіну, а система L для гідрофобних амінокислот, зокрема, АРБЛ [13].

Дана система складається із чотирьох транспортерів: LAT1, LAT2, LAT3 та LAT4. LAT1 – це незалежний від натрію транспортер, що здійснює транспортування валіну, лейцину та ізолейцину а також тирозину, триптофану, гліцину, метіоніну, аспарагіну. Дана транспортна система не проявляє залежності від іонного транспортного градієнта, однак потік амінокислот до клітини через даний переносник повинен поєднуватися із відтоком інших амінокислот із клітин [14].

LAT3 – один із представників даної системи, який високо експресується в печінці й м'язах, під час голодування активність даного транспортера підвищується в цих тканинах, що, ймовірно, вказує на домінуючу роль в метаболічному циклі трьох амінокислот та їх кетокислот між обома органами. До прикладу, під час голодування, вивільнення розгалужених альфа-кетокислот збільшується вдвічі. Як описано в літературі [15] підвищується й регуляція LAT3 до плазматичної мембрани що, ймовірно, засвідчує домінуючу роль даного транспортера в перенесенні АРБЛ та їх кетокислот із печінки та скелетних м'язів до органів, енергетичні запаси яких вичерпані. Наступна ізоформа L-системи – LAT4, яка окрім валіну, лейцину та ізолейцину, транспортує до тканин ще й метіонін та феніланін. Експресується даний транспортер в епітеліальних клітинах тонкого кишечника та ниркових каналців [15].

Отже, в клітинних баланс між надходженням та відтоком АРБЛ підтримується двома системами: А- та L-системою.

1.2. Особливості метаболічних перетворень лейцину, ізолейцину та валіну

Амінокислоти з розгалуженим боковим ланцюгом, що надходять в організм із харчового раціону, спершу абсорбуються в кишечнику. Більша частина

з них транспортується до периферичних тканин й потрапляє в кровотік, щоб досягти основних місць катаболізму, зокрема, м'язів. Однак, незважаючи на те, що три амінокислоти обходять перший етап катаболізму в печінці, їх окислювальне декарбоксилювання до відповідних α -кетокислот відбувається в даному органі. Це встановлює міжорганне переміщення АРБЛ між скелетними м'язами та печінкою [16].

Слід зазначити, що в печінці зареєстрована найвища активність супрамолекулярного комплексу – дегідрогенази альфа-кетокислот з розгалуженим ланцюгом, який відповідає за другий етап перетворення розгалужених альфа-кетокислот до кінцевих метаболітів. Проміжна активність даного комплексу зафіксована в нирках та серці, найнижчу активність ферментний комплекс виявляє у жировій тканині, скелетних м'язах, а також в мозку.

Незначна активність дегідрогеназного комплексу в м'язах вказує на ємність м'язової тканини для дієвого перенесення азоту з трьох амінокислот на альфа-кетоглутарат, а також, ймовірно, встановлює високе вивільнення метаболічних продуктів АРБЛ із тканини з метою подальшого їх перетворення в печінці. Дане співвідношення дозволяє майже повністю окисляти розгалужені альфа-кетокислоти і підтримувати їх низький рівень в тканині скелетних м'язів [17].

Амінотрансфери – це родина піродоксальфосфат-залежних ензимів, які беруть участь в реакціях трансамінування між донорами амінокислот та кетокислотними акцепторними субстратами. Реакції трасамінування складають 50 % всіх піродоксальфосфат-залежних реакцій [18]. Трансамінази амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом, у складі активного центру містять залишки цистеїну Cys315 і Cys318, що відповідають за регулювання субстратної специфічності. В літературі [19] зазначається, що руйнування у мотиві цієї ділянки змінює орієнтацію субстратів альфа-кетокислот в м'язах, водночас, саме завдяки цьому окисно-відновлювальному центру відбувається зворотне переамінування амінокислот [19].

В багатьох клітинах ензими АРБЛ проявляють свою активність, коли концентрація субстрату й продукту локалізуються на рівні чи нижче їх K_m . Це дозволяє ензимам швидко реагувати на зміну концентрацій субстратів у тканинах й цим сами слугувати основним резервом як для синтезу азоту й глутамату, так і для синтезу вуглецевих скелетів. Проте саме транспорт переамінованих продуктів трьох амінокислот забезпечує передачу азоту, отриманого із амінокислот з розгалуженим боковим ланцюгом між тканинами та органами, альтернативно α -кетокислоти із розгалуженим боковим ланцюгом можуть піддаатись окисненню всередині клітини [17].

У літературі [20] зазначається, що за високих концентрацій АРБЛ в м'язах їхні ензими слугують своєрідними транспортерами альфа-кетокислот з розгалуженим боковим ланцюгом, які здійснюють їх транспорт із м'язів до плазми крові, а потім у печінку.

Окисне декарбоксилювання альфа-кетокислот – другий етап катаболізму амінокислот із розгалуженим ланцюгом. Супрамолекулярний комплекс дегідрогенази альфа-кетокислот з розгалуженим ланцюгом належить до висококонсервативних ензимних комплексів, їх каталітична реакція є подібною, адже сприяє окислювальному декарбоксилюванню пірувату, альфа-кетоглутарату та, відповідно, α -кетокислот, утворюючи тіоефіри КоА [20].

Найбільшу активність даний ферментний комплекс проявляє в печінці, проміжну в нирках та серці й найнижчу активність у скелетних м'язах. Дегідрогеназа альфа-кетокислот з розгалуженим ланцюгом складається із трьох компонентів: розгалуженої гетеродимерної декарбоксилази α -кетокислот ($E_1 \alpha$ і β), дигіроліпоїлтрансациклази (E_2) та гомодимерної дигіроліпоїлдегідрогенази (E_3). E_1 субодиниця декарбоксилює відповідні альфа-кетокислоти до ацильних проміжних метаболітів, вивільняючи, при цьому CO_2 . Потім ацильна група з розгалуженим ланцюгом транспортується ліпоїльним доменом, який є складовою E_2 субодиниці до ядра дегідрогеназного комплексу, де й відбувається саме приєднання ацильної групи розгалужених кетокислот до

коферменту А. Після цього відбувається утворення складного ефіру ацил-КоА з розгалуженим ланцюгом та ліпоату, який в процесі метаболічних реакцій трансформується в дигідроліпоєву кислоту. Опісля субодиниця Е3 здійснює повторне окиснення дигідроліпоєвої кислоти за допомогою коферменту NAD⁺ з подальшим його перетворенням на NADH й ліпоєву кислоту. В літературі [21] зазначається, що з усіх розгалужених кетокислот, альфа-кетоізовалеріанова кислота виступає найкращим субстратом для цього комплексу [21].

Водночас якщо розгалужені амінокислоти не надходять в людський організм із харчового раціону їх дефіцит сприятиме інгібуванню даного ферментативного комплексу. Регулювання активності даного комплексу відбувається шляхом фосфорилування/дефосфорилування на залишках Е1а. Так, фосфорилування альфа-кетокислот з розгалуженим ланцюгом відбувається за участю кінази дегідрогеназного комплексу альфа-кетокислот, яка фосфорилує Ser293/302 на залишки субодиниці Е1а. Під час даного процесу здійснюється інгібування активності ферментативного комплексу, водночас інший компонент даного комплексу – мітохондріальна фосфатаза (PP2Cm) дефосфорилує дегідрогеназу альфа-кетокислот на Е1 залишках, що навпаки призводить до підвищення активності дегідрогенази [20].

Аналіз літератури вказує на те, що найвища експресія мРНК кінази зареєстрована в тканині скелетних м'язів, а проміжна в нирках та мозку, найнижча активність спостерігається в печінці. Ймовірно, що висока концентрація даного білка в м'язах, порівняно з іншими тканинами, відображає прямий вплив на активність дегідрогеназного комплексу розгалужених альфа-кетокислот в печінці. В літературі [22] зазначається, що накопичення розгалужених альфа-кетокислот сприяє інгібуванню кінази дегідрогеназного комплексу в скелетних м'язах, активуючи при цьому дегідрогеназний комплекс, який проявляє найнижчу активність за нормальних умов у цій тканині.

Таким чином за фізіологічних умов активність ензимів АРБЛ в скелетних м'язах до активності дегідрогеназного комплексу складає від 90% до 25%

з урахуванням потенційної активності цього комплексу в нефосфорильованій формі, оскільки більша частина цього комплексу в скелетних м'язах перебуває в неактивному/фосфорильованому стані, що й сприяє не тільки росту м'язів, а й синтезу м'язового білка [22].

Катаболізм амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом відбувається в мітохондріях. У ході багатостадійного процесу утворюються проміжні метаболіти, що можуть використовуватись в циклі Кребса. Початкові етапи розпаду є спільними для трьох амінокислот та розпочинаються із реакцій трансамінування, що каталізуються специфічними амінотрансферазами по відношенню до АРБЛ. Під час трансамінування дані амінокислоти зворотно переамінуються у відповідні альфа-кетокислоти: лейцин трансамінується в альфа-кетозокапроат (4-метил-2-оксопентаноат), ізолейцин переамінується в альфа-кетобета-метилвалеріат (3-метил-2-оксопентаноат), валін, в свою чергу, перетворюється на альфа-кетозовалеріат (3-метил-2-оксобутаноат) [23]. Відомо, що в момент переамінування амінокислот до кетокислот альфа-кетоглутарат отримує аміногрупу від однієї з АРБЛ з подальшим утворенням глутамату. Реакція трансамінування супроводжується взаємоперетворенням піродоксальфасфату/піридоксамінфосфату, відновлюючи конформацію піродоксальфосфату.

Як вже зазначено вище, другим етапом розпаду амінокислот є незворотне окисне декарбоксилювання альфа-кетокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у печінці. Відомо, що 5 % α -кетозокапроату, утвореного в процесі переамінування лейцину в м'язах, транспортується в цитоплазму, де піддається метаболізму до 3-гідрокси-3-метилбутирату діоксигеназою альфа-кетозокапроату. Новоутворений продукт лейцину здатний проходити крізь плазматичну мембрану в тканину скелетних м'язів, що може слугувати своєрідним біомаркером розпаду лейцину в м'язах [21]. Близько 90 % альфа-кетозокапроату окиснюється в печінці до ізовалеріїл-КоА, який, в свою чергу, перетворюється на 3-метилкротоніл-КоА. Далі за дії ферменту 3-метилкротонілкарбоксилази відбувається генерування цієї кетокислоти до метилглутаконіл-КоА, що

трансформується в 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА за допомогою ензиму 3-метилглутаконілгідратази. На третьому етапі катаболізму лейцину мітохондріальний ензим 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-ліаза здійснює перетворення 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА до ацетоацетату [21].

Останніми роками зростає інтерес до 3-метилглутаконіл-КоА-гідратази, порушення роботи якого призводить до числа вроджених помилок метаболізму. Дефіцит даного ензиму сприяє 3-метилглутаконіній ацидурії типу I, яка відноситься до рідкісних вроджених помилок катаболізму лейцину. Нестача ферменту в організмі приводить до накопичення 3-метилглутаконіл-КоА в матриксі мітохондрій, де й повинно відбуватися перетворення продукту на 3-метилглутаконінову кислоту через гідролітичне розщеплення тіоефірного зв'язку КоА [24]. Підвищений вміст цієї амінокислоти є справжньою знахідкою, що слугує відмінною ознакою захворювань і досить часто володіє першочерговим значенням в лабораторній діагностиці. Зокрема, існують два основні патологічні стани, пов'язані з даним ензимом – первинна та вторинна 3-метилглутаконінова ацидурія. Первинні ацидурії виникають на фоні метаболічної нестачі 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА [25]. Вторинна ацидурія є надзвичайно рідкісним захворюванням, яке пов'язане із мутаціями в гені HMGCL, що сприяє порушеному синтезу кетонів тіл й розпаду лейцину. Діагностують дані захворювання шляхом аналізу виявлення органічних кислот в сечі [26].

Ізолейцин є ще однією розгалуженою амінокислотою, що піддається початковому розпаду в скелетних м'язах. Перший етап катаболізму розпочинається із переамінування ізолейцину до альфа-кетометилвалеріат. Останній транспортується в гепатоцити за допомогою транспортерів системи L, де відбувається його незворотне окисне декарбоксилювання. За допомогою дегідрогеназного комплексу α -кетометилвалеріат перетворюється до 2-метилбутирил-КоА. В свою чергу, ацил-КоА дегідрогеназа здійснює перетворення метилбутирил-КоА в тиглоїл-КоА, що перетворюється до 2-метил-3-гідроксибутирил-КоА невідомим ен-

зимом. В подальшому 17- β -гідроксистероїддегідрогеназа перетворює 3-гідрокси-2-метилбутирил-КоА на 2-метилацетоацетил-КоА. Остання стадія перетворень полягає в продукуванні за участю 3-кетотіолази пропіонілу, який перетворюється до 2-метил-ацетоацетил-КоА та ацетил-КоА [21].

Порушений метаболізм однієї із кетокислот, як і в попередньому випадку, призводитиме до органічних ацидемій. До прикладу, через порушення метаболізму ізолейцину в людей виникає нестача 2-метил-3-гідроксибутирил-КоА дегідрогенази, яке є вкрай рідкісним захворюванням, та пов'язане із накопиченням у рідинах організму 2-метил-3-гідроксимасляної кислоти. Клінічний прояв розладу вкрай неоднорідний, включаючи нейродегенеративний перебіг й кардіоміопатію [27]. Такі рідкісні захворювання як метилмалонова та пропіонова ацидемія вражають приблизно 1:240 000 новонароджених у США. Біля 90 % випадків синдрому пропіонової ацидемії діагностуються в ранньому віці. Загальні прояви хвороби діагностуються гіпотонією, затримкою розвитку та комою [28].

У процесі перетворення валіну валінамінотрансфераза переміщує аміногрупу амінокислоти на альфа-кетоглутарат з утворенням альфа-кетоізовалеріату. Потрапляючи в печінку дана кетокислота піддається, як і його попередники окислювальному декарбоксилюванню дегідрогеназним комплексом. Таким чином альфа-кетоізовалеріат перетворюється на ізобутирил-КоА, який під дією ізобутирил-КоА дегідрогенази трансформується на метилакрил-КоА. За допомогою коротколанцюгової еноіл-КоА гідратази відбувається генерація до 3-гідрокси-ізобутират-КоА. Даний метаболічний продукт під дією 3-гідрокси-ізобутирил-КоА гідролази перетворюється на метилмалонатний альдегід. Кінцева стадія перетворень полягає в генеруванні метималонатного альдегіду під дією метилмалонатної напівальдегіддегідрогенази пропіоніл-КоА [21]. Це основний шлях катаболізму валіну до кінцевого продукту. Альтернативно пропіоніл-КоА може перетворюватися на проміжний продукт із ЦТК – сукциніл-КоА. Даний процес потребує коферментної форми вітаміну В₆, рибофлавіну, ліпоату, вітаміну В₁₂, тіаміну, рибофлавіну та біотину.

Під час перетворення валіну у двох взаємозалежних органах можуть виникати певні порушення. Так, підвищений рівень ізобутирил-КоА в людей свідчить про дефіцит мітохондріального ензиму ізобутирил-КоА-дегідрогенази [21]. Аналіз літератури [26] свідчить, що станом на сьогодні по всьому світі зареєстровані лише десятки людей із даним розладом. Перший випадок зареєстрований у 1998 році, з поширеністю 1:45 466 у південній Італії та 1:292 451 у Каліфорнії. Даний розлад супроводжується анемією, м'язовою атрофією та затримкою розвитку [28].

Підсумовуючи, слід зазначити, що отриманий з ізолейцину 2-метил-бутирил-КоА в кінцевому результаті перетворюється на ацетил-КоА та сукциніл-КоА, тоді як продукт валіну – ізобутирил-КоА дає пропіоніл-КоА, що генерується до сукциніл-КоА. Їх вуглецеві скелети можуть перетворюватися на глюкозу в реакціях глюнеогенезу, що підтверджує приналежність валіну до глюкогенних амінокислот, ізолейцину до глюкокетогенних, а кінцеві продукти лейцину дозволяють класифікувати дану амінокислоту як кетогенну [18].

1.3. Роль амінокислот з розгалуженим боковим ланцюгом у розвитку патологічних станів печінки

Доступність амінокислот для численних біохімічних перетворень визначається швидкістю, з якою вони з'являються в плазмі та тканинах, а також інтенсивністю використання в клітинному метаболізмі, утворюючи інші замінні амінокислоти; є джерелами енергії в результаті повного окиснення в ЦТК; виводяться з організму з сечею або включаються до складу білків.

Хоча рівень вільних амінокислот у плазмі може дати важливу інформацію про стан метаболічних процесів у організмі, оцінка реального потоку вільних амінокислот на рівні всього організму, міжорганному рівні та в межах самої клітини є більш важливою. Однак уявлення про даний процес нині досить обмежені.

У літературі [29] описано, що в пацієнтів з прогресуючим цирозом печінки концентрації АРБЛ у плазмі крові низькі, тоді як концентрації ароматичних амінокислот – фенілаланіну і тирозину підвищені, що також може мати безпосереднє відношення до прогресування печінкової енцефалопатії та негативного прогнозу у цих пацієнтів.

Водночас недостатність харчування часто пов'язують із підвищеною смертністю пацієнтів при гострому та хронічному гепатиті. Більше того, мальнутриція впливає на когнітивні функції та проявляється дерматологічними порушеннями. Адекватне використання харчових добавок, насичених есенціальними амінокислотами, зокрема АРБЛ, дозволяє уникнути подібних ускладнень при хронічному ураженні печінки. Суміші, що сприяють збереженню стандартного позитивного азотистого балансу, окрім набору амінокислот, повинні містити додаткові кількості калію, фосфатів, магнію, цинку, тіаміну. При цьому кращим є ентеральний шлях введення нутрієнтів [30].

Теми хронічних захворювань дедалі частіше цікавлять науковців, за їх підрахунками щорічно від даних хвороб помирають приблизно мільйони людей. Тільки в 2017 році більше двох мільйонів загинули через захворювання печінки. Останнім часом, хронічні захворювання стали найпоширенішими в усьому світі. Згідно даних, опублікованих в джерелі [15], більше восьми мільйонів людей нині страждають від хронічних патологій печінки, причому проблеми із харчуванням зафіксовано в 75–90 % пацієнтів.

Прогресування патологій печінки супроводжується цирозом, ознаками якого виступають голодування та посилений глюконеогенез, який переключає метаболізм вільних амінокислот від інших метаболічних потреб. До прикладу, основним резервуаром амінокислот, й місцем зберігання молекул глюкози є скелетні м'язи. Ця властивість допомагає органам отримувати доступ до енергетичних субстратів в момент голодування. Тому взаємодія між печінкою та м'язами, перш за все, відповідає за підтримання енергетичного балансу в даних органах [28].

Одним із найпоширеніших ускладнень цирозу печінки виступає саркопенія, ознаками якої є втрата маси скелетних м'язів. В літературі [29] зазначено, що саркопенією страждають близько 50–70 % пацієнтів, що хворіють цирозом печінки. Їх організм проявляє знижену здатність клітин печінки розщеплювати глікоген, а, отже, й використовувати вуглеводи в якості джерела енергії [29].

Такий стан пришвидшеної дії на голодування сприяє й виникненню саркопенії, адже поряд із цим підвищується використання амінокислот, зокрема, лейцину, ізолейцину та валіну для глюконеогенезу, що, в свою чергу, знижує рівень вищезазначених амінокислот в плазмі крові. Враховуючи те, що три амінокислоти виступають ключовим джерелом енергії для м'язів, їх низький рівень в крові й призводить до деградації тканини скелетних м'язів.

Розвиток цирозу супроводжується порушенням функціональної здатності гепатоцитів, що призводить до зниження детоксикаційної функції печінки. Тому при патологіях цього органу м'язи виконують компенсаторну роль, знешкоджуючи аміак в глютаматсинтезній реакції. Так, при гіперамонемічних станах аміак в мітохондріях трансформується в глютамат за допомогою проміжного продукту циклу Кребсу – α -кетоглутарату. Даний інтермедіат, в свою чергу, трансформує глютамат до глютаміну в м'язах, вуглецевий скелет якого в подальшому використовується в зворотному переамінуванні лейцину, ізолейцину та валіну [30].

Цікаво, що на відміну від інших ускладнень цирозу, які усуваються після трансплантації печінки, саркопенія не зменшується або в багатьох випадках погіршується після трансплантації. Незважаючи на те, що ці несприятливі наслідки не були спеціально оцінені щодо етіології захворювання печінки, за винятком гострого алкогольного гепатиту, саркопенія погіршує клінічні результати у великої популяції пацієнтів без цирозу печінки, а також у пацієнтів після трансплантації печінки [31].

Існують дані, що свідчать про прямий вплив етанолу на м'язовий протеостаз і подальшу саркопенію, що найчастіше спостерігається при алкогольному цирозі печінки. Згодовування або вплив етанолу на тваринних моделях призводить до порушення синтезу білка. Дослідження білкового обміну в усьому організмі пацієнтів зі стабільним алкогольним цирозом показали порушення синтезу білка в фазах після всмоктування та після прийому їжі, що свідчить про стан «анаболічної резистентності» [32].

Анаболічна резистентність визначається як субоптимальна стимуляція синтезу білка, незважаючи на достатнє споживання макронутрієнтів, і сприяє зниженню синтезу м'язового білка. Однак, щоб відбулася втрата м'язової маси, недостатньо самого лише зниженого синтезу білка, необхідний посилений розпад або протеоліз білка. Протеасомний шлях убіквітину, який вважається основним механізмом протеолізу скелетних м'язів, або не змінюється, або знижується під дією етанолу за умов алкогольної хвороби печінки. Натомість аутофагія скелетних м'язів посилюється та сприяє втраті м'язової маси. Незважаючи на те, що аутофагія є клітинною адаптивною реакцією на усунення пошкоджених органел і цитотоксичних клітинних білків, нерегульована аутофагія з впливом етанолу сприяє втраті м'язів [33].

Ці спостереження показують, що спричинене етанолом порушення білкового гомеостазу або протеостазу через дисбаланс між синтезом білка та аутофагічним протеолізом призводить до втрати м'язів.

Отже, порушення роботи як печінки, так і скелетних м'язів мають взаємопов'язані наслідки. При цьому ключовим чинником патофізіологічних змін може виступати змінена концентрація амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом.

1.4. Амінокислоти з розгалуженим боковим ланцюгом як сигнальні молекули

Амінокислоти, зокрема АРБЛ, відіграють важливу роль у регуляції секреції гормонів та діють як внутрішньоклітинні сигнальні молекули. З'являється дедалі більше доказів, що амінокислоти виконують найважливіші регуляторні функції в метаболізмі, причому лише на рівні всього організму.

Показано, що окремі амінокислоти або їх комбінації мають унікальні фізіологічні властивості, так, наприклад, АРБЛ регулюють транскрипцію та трансляцію генів. Сигнальні білки, такі як mTOR, діють як сенсори АРБЛ, в першу чергу, лейцину, модулюючи анаболічну дію білкової їжі. Амінокислоти стимулюють біосинтез білка та інгібують розпад протеїнів у скелетних м'язах та печінці. Однак специфічна роль АРБЛ у регуляції синтезу та протеолізу індивідуальних білків або білків із загальними функціями залишається невивченою, на відміну від найвідомішої функції амінокислот в організмі [34].

У експериментах на собаках показано, що при внутрішньовенному введенні амінокислот найбільш виражена стимуляція секреції інсуліну спостерігалася при введенні триптофану, лейцину та аспартату, тоді як валін, аланін та гістидин проявляли мінімальний ефект. Ці результати засвідчують, що дві амінокислоти, які мають схожу структуру (лейцин і валін), можуть мати різні фізіологічні ефекти. Навпаки, лейцин, ізолейцин і валін слабо впливали на секрецію глюкагону, тоді як введення гліцину, аланіну, серину або аспартату стимулювало секрецію глюкагону одночасно із мінімальним впливом на секрецію інсуліну. Ці дані показують, що лейцин та ізолейцин не тільки стимулюють вивільнення інсуліну з β -клітин, але також можуть інгібувати секрецію глюкагону. Недоліком цих експериментів є те, що всі амінокислоти вводили у однаковій дозі – 1 ммоль.

Функції вільних амінокислот можуть відрізнятися залежно від фізіологічного стану. Наприклад, у зрілому віці та при старінні змінюється здатність вільних амінокислот стимулювати секрецію гормонів. Показано, що лейцин

стимулюючи секрецію інсуліну в дітей, проявляє знижений ефект щодо даного процесу в дорослих. Оскільки циркулюючі концентрації гормону росту та його основного ефектора інсуліноподібного ростового фактору-1 з віком знижуються, цілком імовірно, що активація амінокислотами синтезу і секреції цих гормонів із віком також зменшується [35].

У даний час серед індивідуальних амінокислот роль лейцину як регулятора білкового обміну найбільш вивчена. Так показано, що внутрішньовенне введення лейцину людині призводить до зниження в плазмі крові концентрацій інших амінокислот. Ці зміни можуть бути результатом зниження розпаду білка, що зменшує швидкість вивільнення амінокислот у циркуляцію або підвищеного використання амінокислот для синтезу білка та метаболізму. При інфузії лейцину знижується як швидкість розпаду білка, і окиснення валіну. Більш того, баланс (відмінність між споживанням і вивільненням) таких незамінних амінокислот, як валін, лізин та фенілаланін, стає більшою мірою позитивним. Цей результат – зменшення швидкості вивільнення амінокислот із скелетних м'язів, гостро вказує на гальмування швидкості розпаду білка. У експерименті не зазначено підвищення швидкості синтезу білка у скелетних м'язах. Отже, основним механізмом, за яким знижуються рівні незамінних амінокислот після інфузії лейцину, є саме зменшення протеолізу [36].

Показано, що АРБЛ проявляють специфічний стимулюючий ефект на сигнальні шляхи, які ініціюють трансляцію мРНК, що призводить до підвищення синтезу білка у тварин. Вплив окремих амінокислот на біосинтез білка в м'язах, ймовірно, запускається через внутрішньоклітинний сигнальний шлях mTOR та p70 S6-кіназу, яка бере участь у активації трансляції. Активація (фосфорилування) цих молекул має місце при пероральному чи внутрішньовенному введенні амінокислот самкам, але, що цікаво, не відбувається при інфузії інсуліну щурам-самцям. Доведено, що АРБЛ діють як сигнальні молекули у ключових регуляторних точках, що контролюють транскрипцію та трансля-

цію. У специфічних умовах, таких як депривація амінокислот, зниження концентрацій незамінних амінокислот можуть змінювати експресію окремих генів, впливаючи на амінокислота-чутливі елементи [37].

mTOR є сенсором наявності амінокислот та ініціює інсулінозалежний каскад, регулюючи процес ініціації трансляції через ефектори, такі як p70 S6 кіназу та еукаріотичні ініціюючі фактори. Регуляція за участю сигнального каскаду mTOR більш чутлива до концентрацій внутрішньоклітинних амінокислот, ніж до позаклітинних амінокислот, що ще раз доводить наявність у комплексу сенсорних властивостей. Таким чином, ефект АРБЛ на стимуляцію біосинтезу білка через сигнальний комплекс (шлях mTOR) може здійснюватися шляхом переважного впливу на гени-мішені.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та методи досліджень

Експериментальні дослідження проводили на білих безпородних щурах із масою 150–180 г віком та віком 3-4 місяці. Усі процедури над лабораторними тваринами здійснювались згідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», що були ухвалені VII Національним конгресом із біоетики (Київ, 2019) та відповідають загальним положенням «Європейської конвенції щодо захисту тварин, які використовують як в експериментальних, так й інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) [38].

Лабораторних щурів під час експерименту утримували в пластмасових клітках із піщаною підстилкою, попередньо простерилізованою, та вільним доступом до їжі та води. Нормування раціону тварин проводили із урахуванням вимог парного харчування, за умов якого тварини контрольної групи споживали таку ж кількість раціону, як і дослідні щури. Протягом всього експерименту спостерігали за зовнішніми морфологічними змінами тварин, а також щоденно контролювали кількість спожитого раціону та вагу щурів [39].

Відповідно до моделі дослідження тварин було поділено на 4 групи:

- ✓ I група (К) – щури, які протягом всього експерименту споживала збалансований за всіма нутрієнтами напівсинтетичний раціон;
- ✓ II група (НПР) – тварини, які отримували дієту із низьким вмістом харчового протеїну;
- ✓ III група (ВС) – щури, яких утримували на високосахарозній дієті;
- ✓ IV група (НПР/ВС) – тварин отримувала дієту із високим вмістом сахарози й низьким вмістом протеїну.

Напівсинтетичний раціон AIN-93, розроблений Американським інститутом харчування, який споживали тварини контрольної групи містив 14 % протеїнів (казеїну), 10 % жирів та 76 % вуглеводів (8 % сахарози та 68 % крох-

малю) [40]. Тварини, які зазнавали аліментарної депривації протеїну, отримували раціон, що містив 4,7 % харчового протеїну, 85,3 % вуглеводів (77,3 % крохмалю та 8 % сахарози) й 10 % жирів [39].

Тварини III групи отримували напівсинтетичний високосахарозний раціон, який містив 14 % білка, 10 % жирів, 76 % вуглеводів (32 % сахарози та 44 % крохмалю) [41].

Тварини IV групи споживали низькопротеїнову/високосахарозну дієту, до складу якої входили 4,7 % протеїнів, 10 % жирів, 85,3 % вуглеводів (32 % сахарози та 53,3 % крохмалю).

Цервікальну дислокацію здійснювали під легким ефірним наркозом на 29 день експерименту згідно чинних рекомендацій та етичних норм щодо Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 р.).

2.2. Виділення мітохондріальної фракції скелетних м'язів

Мітохондріальну фракцію скелетних м'язів щурів отримували методом диференційного центрифугування в гомогенізуючому середовищі, до складу якого входили: 1 мМ $MgCl_2$, 0,05 М Трис- HCl , 0,1 М KCl , рН 7,4. Фрагменти клітин та ядер осаджували центрифугуванням при 9000 об/хв впродовж 10 хвилин. Для видалення неповністю зруйнованих клітин та ядер супернатант повторно центрифугували при 2000 об/хв протягом 5 хвилин [42].

2.3. Отримання мітохондріальної фракції печінки

Фракцію мітохондрій клітин печінки отримували шляхом препаративного диференційного центрифугування [43]. Усі необхідні маніпуляції проводили за температури 0–4° С. Склад середовища для гомогенізації включав: 250 мМ розчин сахарози, 1 мМ розчин EDTA, 10 мМ трис- HCl , рН 7,4. Гомогенат печінки фільтрували, використовуючи 4 марлеві шари. Ядра відділяли при

центрифугуванні за 1000 g впродовж 10 хв. Мітохондріальну фракцію із відібраного супернатанту осаджували, надаючи прискорення 12 000 g за часового проміжку 15 хв. Отриманий осад мітохондрій печінки промивали два рази, використовуючи середовище виділення даної фракції без додавання EDTA.

2.4. Хроматографічний аналіз концентрації АРБЛ

Вміст вільних амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у печінці, м'язах та плазмі крові визначали методом хроматографічного аналізу на амінокислотному аналізаторі Т 339 (Чехія) на базі Інституту біохімії імені О.В. Палладіна у рамках виконання угоди про співпрацю.

Підготовку проб здійснювали попередньо на кафедрі біохімії та біотехнології навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів ЧНУ ім. Юрія Федьковича.

М'язи та печінку гомогенізували в 0,1 М К-фосфатному буфері, рН 7.4. Гомогенат центрифугували при 8000 об/хв впродовж 10 хвилин. Для депотеїнізації до супернатанту додавали 30 % розчин сульфосаліцилової кислоти та повторно центрифугували впродовж 20 хвилин.

Безбілковий фільтрат плазми крові отримували після додавання 3 % розчину сульфосаліцилової кислоти.

У випадку колонкової іонообмінної хроматографії для поділу амінокислот використовуються дрібнозернисті катіонообмінники (смоли), що представляють собою сополімер стиролу і дивінілбензолу сферичної форми з функціональною групою - SO_3^- , причому для скорочення тривалості аналізу необхідні смоли з малим розміром зерен. У основі іонообмінної колонкової хроматографії лежать амфотерні властивості амінокислот. Для того, щоб відбувся поділ суміші амінокислот на колонці, катіонообмінник попередньо врівноважується буферним розчином цитрату натрію або цитрату літію. Функціональні групи приймають, відповідно, вид: - $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ або - $\text{SO}_3^- \text{Li}^+$. Далі відбувається елюція (вимивання) амінокислот у визначених умовах: на великій швидкості,

при підвищеному тиску і температурі та використанні п'ятих етапів зміни елюентів.

Для реєстрації амінокислот в елюатах використовується метод детекції нінгідрином.

Принцип роботи полягає в тому, що елюант із ємкості за допомогою насосу, що дозує, поганяється через хроматографічну колонку. На виході з колонки до елюату мікронасосом безупинно підкачується нінгідриновий реактив у визначеному співвідношенні з елюатом. Суміш елюата і нінгідринового реактиву по капілярній трубці направляється в реактор, що нагрівається до температури 95–98° С і потім направляється в проточну кювету. Інтенсивність забарвлення вимірюють на ФЕКу за допомогою фотоелементу, на який світло від джерела проходить через стінки кювети. Реєстрування сигналів фотоелемента здійснювали самописним потенціометром у вигляді хроматограми, площа піків яких, в подальшому, підраховується із площею піків вільних амінокислот із відомою концентрацією. При порівнянні двох площ здійснюються обчислення абсолютного вмісту амінокислот у аналізованому зразку.

На хроматограмі розраховують площу піка кожної амінокислоти (або висоту піка). Кількість мікромолей кожної амінокислоти (X_1) у досліджуваному розчині обчислювали за формулою:

$$X_1 = S_1 / S_0, \text{ де}$$

S_1 – площа піку (або висота) амінокислоти в досліджуваному зразку,

S_0 – площа піка (або висота) цієї ж амінокислоти в розчині стандартної суміші амінокислот, що відповідає 1 мікромолю кількості кожної амінокислоти [44].

2.5. Визначення амінотрансферазних активностей АРБЛ

Лейцинамінотрансферазну активність у мітохондріальній фракції скелетних м'язів тварин визначали за кількістю α -кетозокапроату на спектрофотометрі CARY60 (США) при довжині хвилі 440 нм [45]. Реакційне середовище містило: 0,08 мМ альфа-кетоглутарат, 0,15 мМ розчин лейцину, 0,8 М розчин

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ та мітохондріальну фракцію. Всі зразки інкубували впродовж 5 хвилин при температурі 37°C , а потім вносили по 1 мл 2,4-динітрофенігідразину. Утворення гідразонів в отриманій суміші відбулося після 10 хвилинного інкубування при 25°C .

Реакційну суміш в усіх зразках екстрагували шляхом додавання 5 мл циклогексану з інтенсивним перемішуванням впродовж 20 с та центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 2-3 хвилин.

У чисті пробірки відбирали надосадову рідину та додавали по 1,5 мл 10% розчину Na_2CO_3 . Всі проби повторно центрифугували впродовж 1 хвилини при 1500 об/хв. Отриману карбонатну фазу відбирали та вносили по 2 мл 15 % розчину NaOH .

Реакційна суміш для визначення активностей валін- та ізолейцинамін-трансфераз складалась із попередніх реагентів, окрім лейцину, який замінювали двома іншими субстратами – валіном та ізолейцином. Екстрагування реакційної суміші здійснювали етилацетатом. Після відбирання органічної фази, замість 10 % розчину Na_2CO_3 додавали по 2 мл калій-сульфатного буферу (5,3 г Na_2CO_3 , 0,84 г NaHCO_3 , 200 г Na_2SO_4), pH 7,5. Після центрифугування у кожену пробу вносили по 5 мл петролейного ефіру. До отриманої фази вносили по 2 мл 15 % розчину NaOH .

Активність ензимів визначали зі кількістю утвореного субстрату: α -кетотізокапроату, α -кетотізовалеріату та кето- β -метил-валеріату, які утворюються в реакціях трансамінування лейцину, ізолейцину та валіну.

2.6. Визначення активностей дегідрогеназ α -кетокислот із розгалуженим ланцюгом

Активність дегідрогеназного комплексу α -кетокислот із розгалуженим боковим ланцюгом визначали спектрофотометрично за кількістю утвореного NADH при довжині хвилі 340 нм [46].

До складу реакційної суміші входили 30 мМ розчин K_2HPO_4 , 2 мМ $MgSO_4$, 2 мМ дитіотреїтолу, 0, 1 мМ тритон X-100, рН 7,5, 0,56 М розчин тіамін пірофосфату, 0,56 М КоА, 0,56 моль NAD^+ та мітохондріальна фракція та відповідні кетокислоти.

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі [47].

2.7. Статистичні методи

Статистичне опрацювання отриманих результатів досліджень проводили на персональному комп'ютері, використовуючи прикладну програму статистичного аналізу *Microsoft Excel 2016*. Оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою параметричного t-критерію Стюдента, порівнюючи усі дослідні групи із контролем. Різницю між показниками вважали статистично вірогідною при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що амінокислотний гомеостаз у тканинах підтримується в основному за рахунок есенціальних амінокислот. Так, після споживання нутрієнтів у складі харчового раціону у внутрішньоклітинному гомеостазі амінокислот доминуватимуть процеси ауторегуляції, що супроводжуватиметься катаболізмом надлишкових амінокислот у клітинах [48, 49].

З іншого боку, депривація макронутрієнтів за умов недостатнього їх надходження запускатиме протилежний процес – аутофагію, що призводитиме до активації транскрипційних факторів для підтримки врівноваженої концентрації амінокислот як в плазмі, так і в тканинах [50].

Наприклад, зміни в метаболічних шляхах лейцину, ізолейцину та валіну індукують низку метаболічних функцій через активацію сигнального шляху mTOR. Дана протеїнкіназа виступає центральним регулятором різноманітних клітинних процесів, починаючи від синтезу білка, активації процесів аутофагії та закінчуючи підтриманням гомеостазу глюкози в тканинах та органах. З іншого боку, порушене функціонування цього сигнального шляху призводитиме до прогресування деяких патологічних процесів, зокрема діабету [50].

Широкомасштабний аналіз, описаний в літературі [51], засвідчує зміну концентрацій АРБЛ за умов прогресування деяких патологічних станів при введенні метаболітів лейцину, ізолейцину та валіну. Дослідники встановили, що ті захворювання, які супроводжувалися вираженим катаболічним станом, сприяли зниженій концентрації амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у крові та тканинах м'язів.

Відомо, що метаболічні перетворення амінокислот у тканинах скелетних м'язів переважно лімітують валін, лейцин та ізолейцин. Серед зазначених амінокислот особлива роль належить лейцину, який задіяний у низці метаболічних процесів. За фізіологічних умов харчові білки майже повністю гідролізуються до амінокислот, які потім швидко абсорбуються у стінках кишечника. Активний транспорт амінокислот є енергозалежним процесом, який відбувається за

участю білків-транспортів за допомогою Na^+ -залежного симпорту. Після надходження по ворітній вені абсорбовані амінокислоти, не менше 20 % з яких АРБЛ, захоплюються у печінкою. Однак, вони проходять даний орган транзитом і використовуються в основному в скелетних м'язах [52].

Результати проведених досліджень показали зниження вмісту лейцину, ізолейцину та валіну в тканинах скелетних м'язів усіх дослідних груп порівняно із показниками контролю (рис. 3.1).

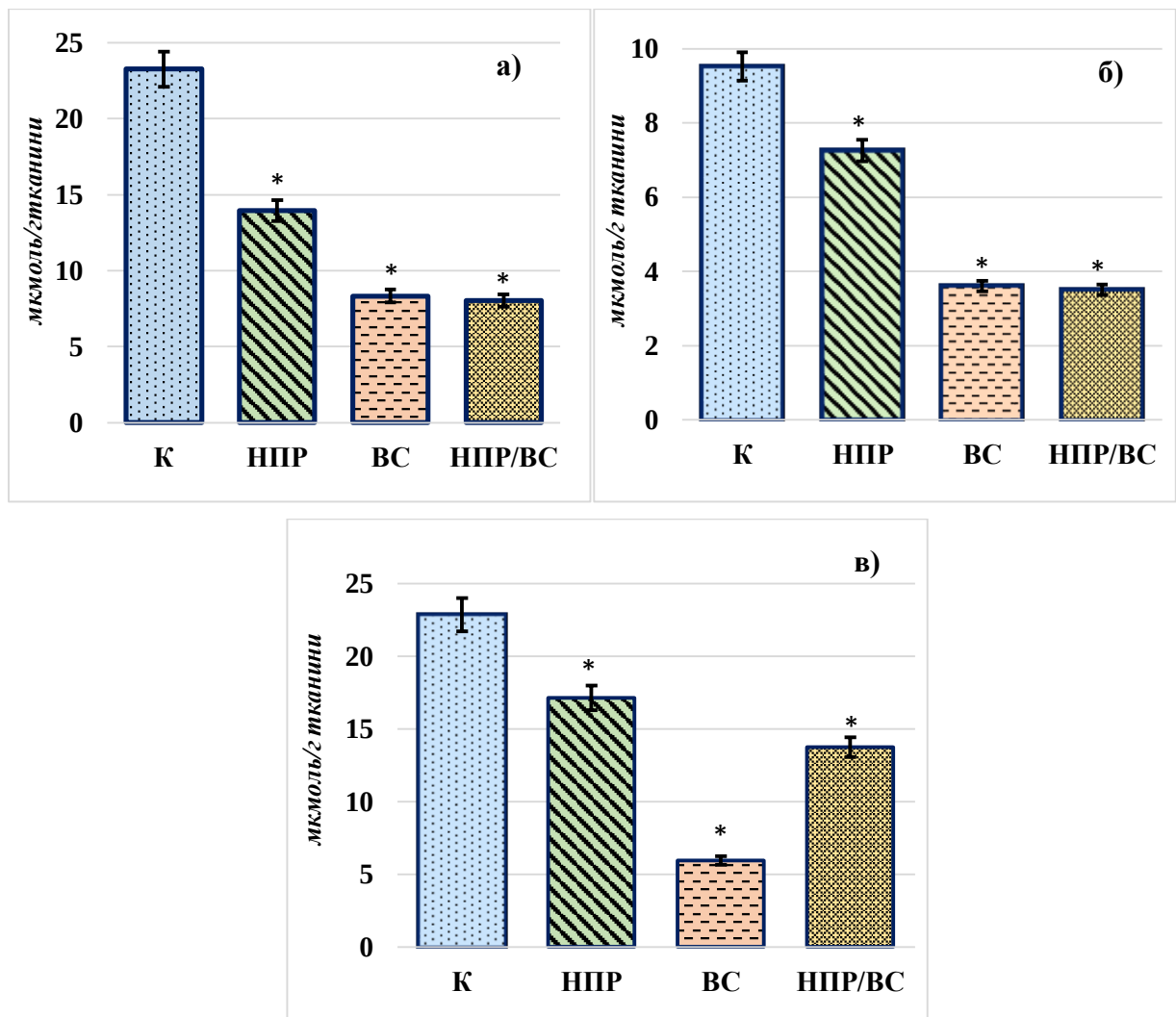


Рис. 3.1. Вміст лейцину (а), ізолейцину (б) та валіну (в) у скелетних м'язах щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Примітка (тут і надалі):

К – щури, які споживали повноцінний напівсинтетичний раціон; **НПР** – щури, які споживали низькопротеїновий раціон; **ВС** – щури, які споживали високосахарозний раціон; **НПР/ВС** – щури, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.

Очевидним є те, що зниження вмісту трьох есенціальних амінокислот – лейцину, ізолейцину та валіну – в групі протеїнодефіцитних щурів у 1,7 (рис. 3.1, а), 1,4 (рис. 3.1, б) та 1,3 рази (рис. 3.1, в) відповідно порівняно зі значеннями контрольної групи тварин пов'язане із нестачею харчового протеїну в раціоні. З іншого боку, всі АРБЛ трансамінуються у м'язах до відповідних кетокислот, які «згодом утилізуються в реакціях глюконеогенезу в печінці, що може відбуватися й за даних експериментальних умов та спрямоване для підтримання енергетичних ресурсів організму, оскільки їх рівень регулюється розподілом між біосинтезом протеїнів та окислювальним метаболізмом у мітохондріях» [53].

Щодо концентрації АРБЛ за умов споживання надлишку легкозасвоюваного вуглеводу – сахарози, то у скелетних м'язах груп ВС та НПР/ВС зареєстровано максимальне зниження рівня лейцину (рис. 3.1, а) та ізолейцину (рис. 3.1, б), що дозволяє розглядати надміру кількість сахарози ключовим чинником даних змін.

Особлива роль серед усіх АРБЛ належить лейцину, який, «на відміну від ізолейцину та валіну, ініціює біосинтез протеїнів у скелетних м'язах шляхом активації кіназного комплексу mTOR та характеризується найвищою реакційною здатністю до окислення» [53, 54].

За даними літератури [55], лейцин ініціює синтез м'язових білків у скелетних м'язах – тканині, що відповідає за утилізацію глюкози в організмі. У скелетних м'язах поглинання глюкози відбувається інсулінозалежним механізмом. Даний гормон на мембрані зв'язується із своїм рецептором (IR), що супроводжується активацією ензиму тирозинкінази, який фосфорилує власні субстрати (IRS-1 та IRS-2) за залишками амінокислоти тирозину. Зв'язування субстратів в подальшому сприяє активації фосфоінозитол-3-кінази (PI3K), яка призводить до функціонування фосфоінозитол-2-фосфату (PIP2) та фосфоінозитол-3-фосфату (PIP3), що, в свою чергу, ініціюють сигнальний шлях через альфа-серинтреонінпротеїнкіназу, активація якого призводить до збільшення

транслокації GLUT4 до плазматичної мембрани і збільшення поглинання глюкози [56, 57].

За фізіологічних умов, лейцин «через активацію сигнальних шляхів викликає секрецію інсуліну, що сприяє поглинанню м'язами більше глюкози, тим самим знижуючи її рівень в крові» [53]. Таким чином, недостатність даної амінокислоти за умов споживання надлишку сахарози можна розглядати як передумову порушення гомеостазу глюкози.

З іншого боку, «ця ж сама альфа-серинтреонінпротеїнкіназа може запустити mTOR через який лейцин активує біосинтез протеїнів». Зокрема, в літературі [58] з'являється дедалі більше припущень про те, що mTOR1 може фосфорилувати субстрати інсуліну в м'язовій тканинці. Даний процес, в свою чергу, призводить до інгібування даного шляху, що супроводжується порушенням транслокації GLUT4 – транспортера глюкози до мембрани клітин. Тому зниження вмісту лейцину (рис. 3.1, а) за умов споживання високосахарозного раціону може супроводжуватися пригніченням процесів синтезу м'язових білків.

Зміни метаболізму в скелетних м'язах проявляють значний вплив на метаболізм організму загалом. Скелетні м'язи споживають ~75%–80% глюкози і є основним органом, що визначає швидкість метаболізму. Втрата м'язової маси знижує загальне споживання глюкози в організмі, що сприяє розвитку гіперглікемії та впливає на ступінь інсулінорезистентності [59, 60].

Аналогічна тенденція змін вмісту лейцину зареєстрована нами за умов абсолютного дисбалансу макронутрієнтів на прикладі споживання надмірного вмісту сахарози на тлі аліментарної депривації протеїну (група НІР/ВС) (рис. 3.1, а). Тому «можна припустити, що доступність енергосубстратів за даних експериментальних умов стає обмеженою, що призводить до запуску глюко-неогенезу та катаболічних перетворень амінокислот» [53, 61].

Окрім цього лейцин ініціює синтез білка шляхом активування mTOR1, який в свою чергу активує транскрипційні фактори 4E-BP1 і p70S6K, ініціація яких призводить до пришвидшеної транскрипції протеїнів [57].

Щодо ізолейцину, то в літературі [61] з'явилося перше повідомлення про те, що дана амінокислота стимулює поглинання глюкози скелетними м'язами *in vivo* та знижує концентрацію глюкози в крові у щурів без підвищення рівня інсуліну в плазмі. Таким чином, зниження рівня ізолейцину (рис. 3.1, б) за даних експериментальних умов узгоджується з попередньо встановленим науковою групою явищем гіперглікемії. Даний процес відбувається через активування протеїнкінази (AMPK), яка покращує поглинання глюкози шляхом підвищеної експресії GLUT-4 й транслокації її до плазматичної мембрани [61].

М'язи є енергоємною тканиною, які для генерування молекул АТФ використовують жирні кислоти та глюкозу. Проте дана тканина не може використовувати обидва субстрати одночасно. Використання м'язовою тканиною одного із вищезазначених, субстратів у м'язах підпорядковується циклу Рендла, де використання молекул глюкози в якості джерела субстрату інгібуватиме окислення ліпідів, й навпаки [62]. Так, за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні ініціація ліполізу в жировій тканині забезпечуватиме м'язи жирними кислотами, які пригнічуючи окислення глюкози в м'язах, перепрограмовують їх метаболізм в цьому органі й цим самим сприяють тому, що молекули глюкози використовуватимуться як джерело субстрату не м'язами, а мозком, який використовує її майже виключно для своїх енергетичних потреб [60].

Зокрема, в літературі [59] зазначається, що за умов виникнення інсуліно-резистентного стану, яке можливе за даних умов, окиснення глюкози в м'язах сповільнюється, що в свою чергу сприятиме накопиченню триацилгліцеролів у цій тканині. Валін за даних умов, транспортуватиме жирні кислоти із циркуляції до міофібрил через капілярну стінку. Дослідники встановили [57, 61], що валін сприяючи поглинанню жирних кислот м'язами, сприяє накопиченню

ліпідів у цьому органі, що можна розглядати як передумову виникнення інсулінорезистентного стану.

Аналогічна тенденція змін вмісту трьох амінокислот спостерігається у тварин, що утримувались на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні (рис. 3.1). У літературі [62] показано, що АРБЛ модулюють метаболізм ліпідів в м'язовій тканині. До прикладу, ізолейцин сприяє збільшенню накопичення внутрішньом'язових ліпідів, пригнічуючи фосфорилування АМФ-активованої протеїнкінази α -ацетилкоензим А-карбоксилази, яка в свою чергу, активують стеароїл-КоА-десатурази, що відповідає за ліпогенез в м'язах.

З іншого боку, лейцин та ізолейцин при надлишку сахарози в м'язах збільшують експресію PPAR рецептора, який індукує UCP-3 – в м'язах. Надекспресія цього гену в даній тканинній сприяє поглинанню глюкози за рахунок підвищеного рекрутування переносника глюкози GLUT4 на клітинну поверхню [63].

За даними літератури [63], валін та ізолейцин за даних умов активують фактор росту фібробластів (Fgf21) в скелетних м'язах, а також в печінці та жировій тканині. Даний гормон є одним із головних регуляторів енергетичного гомеостазу. Виходячи з цього, можна припустити, що індукування двома амінокислотами Fgf21 призводить до збільшених витрат енергії. Таким чином порушений метаболізм АРБЛ пригнічує дію інсуліну, що, в свою чергу, призводить до накопичення неповністю окислених ліпідів в м'язах [64, 65].

Отже, за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні у скелетних м'язах щурів спостерігається зниження вмісту АРБЛ. Споживання надлишку сахарози незалежно від кількості харчового протеїну супроводжується максимальним зменшенням рівня лейцину та ізолейцину, що можна розглядати як ключовий чинник встановлених змін.

Враховуючи те, що ферменти, які задіяні в катаболізмі лейцину, ізолейцину та валіну володіють унікальним тканинспецифічним розподілом, наступним етапом нашої роботи стало дослідження активностей відповідних трансаміназ у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів.

Відомо, що реакції трансамінування трьох амінокислот здебільшого протікають саме в м'язовій тканині. Перетворення розгалужених амінокислот відбувається шляхом перенесення аміногруп АРБЛ на альфа-кетоглутарат із утворенням глутамату та відповідних альфа-кетокислот. Це відіграє важливу роль в катаболізмі амінокислот, оскільки під час трансамінування відбувається перерозподіл азоту між есенціальними амінокислотами [66].

Окрім того, що процеси трансамінування допомагають перетворювати надлишкові амінокислоти на відповідні метаболічні продукти, що й сприяє нормалізуванню есенціальних амінокислот в тканинах та органах, трансамінування відіграє важливу роль у діагностиці, адже даний процес прогнозує патологічні захворювання. Враховуючи те, що амінотрансфери відносяться до внутрішньоклітинних ензимів, їх активність в сироватці крові підтримується в діапазоні референтних значень [67].

Нами встановлено, що в мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів спостерігається зниження трансаміназ – лейцин-, ізолейцин- та валінаміно-трансфери порівняно зі значеннями контролю (рис 3.2).

Можна припустити, що в скелетних м'язах протейнодефіцитних тварин зниження активності зазначених ензимів пов'язане зі зменшенням концентрації амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом, які виступають субстратами в реакціях трансамінування.

Слід відмітити, що максимальне зниження лейцинамінотрансфери (рис. 3.2, а), ізолейцинамінотрансфери (рис. 3.2, б) та валінамінотрансфери (рис. 3.2, в) в міхондріальній фракції скелетних м'язів щурів зареєстровано у групах ВС та НПР/ВС. Встановлений нами факт, ймовірно, «пов'язаний із тим, що за даних умов м'язи починають посилено використовувати глюкозу, що ймовірно, супроводжується запуском глюконеогенезу» [53].

За даних умов тканини скелетних м'язів використовують глюкозу як джерело енергетичного субстрату, що сприяє захопленню вуглецевого скелета

пірувату у вигляді аланіну за допомогою реакцій трансамінування, використовуючи при цьому аміногрупу глутамату, що утворюється під час трансамінування лейцину, ізолейцину та валіну.

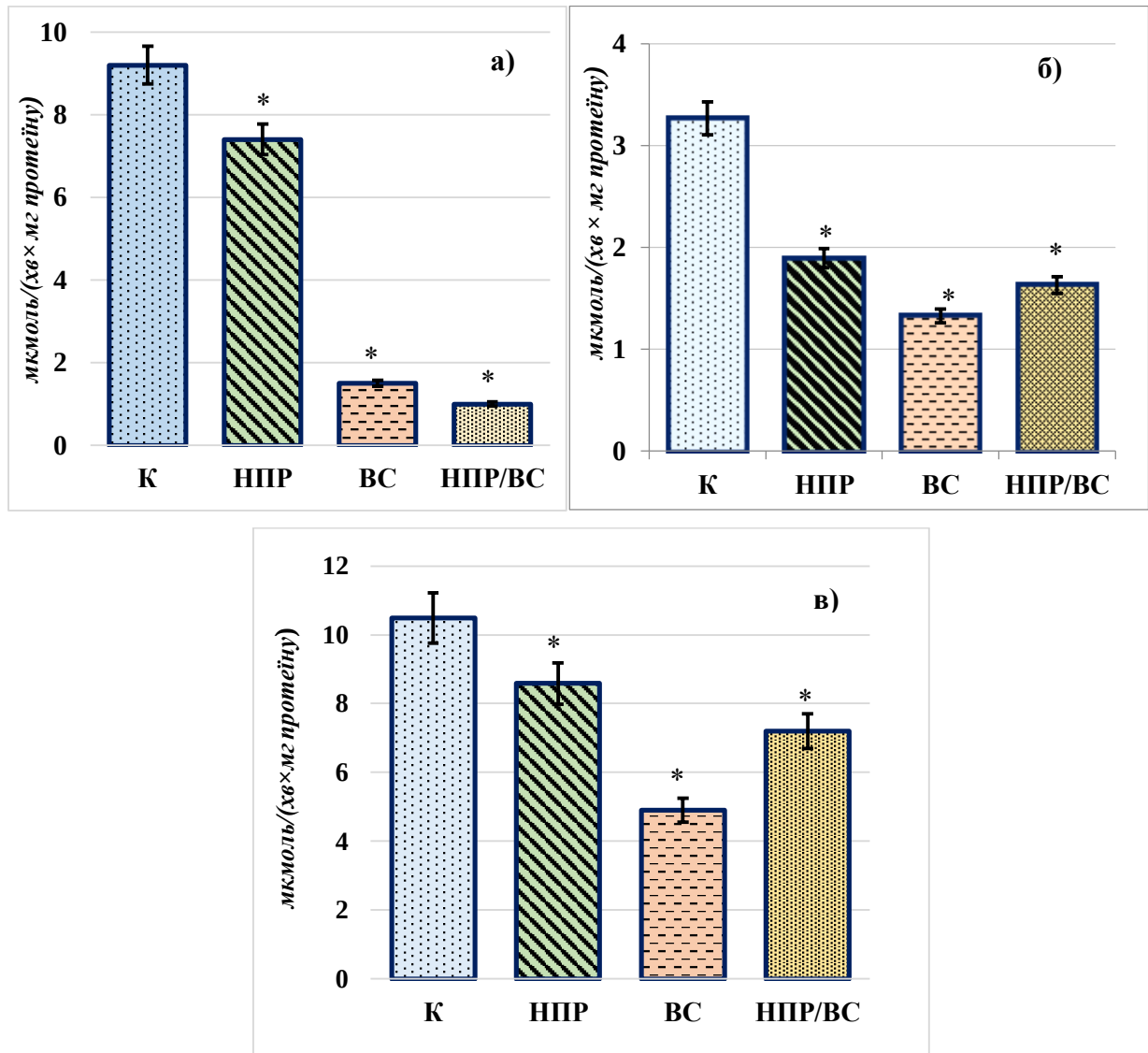


Рис. 3.2. Активність лейцинамінотрансферази (а), ізолейцинамінотрансферази (б), валінамінотрансферази (в) у скелетних м'язах щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Враховуючи те, що акцептором аміногруп в реакціях трансамінування є альфа-кетоглутарат, то окрім новоутвореної альфа-кетокислоти вихідним продуктом у цій реакції буде й глутамат, що в подальшому під час трансамінування з піруватом, перетворює дану сполуку на аланін з одночасним регенеру-

ванням альфа-кетоглутарату – одного із метаболітів ЦТК. Зниження активності даних метаболітів за умов споживання надлишку сахарози, ймовірно, призводитиме до виснаження рівня інтермедіатів у цій тканинній, що в свою чергу, можна розглядати як передумову порушеної активності ензимів АРБЛ в цій тканинній [68, 69].

Аналогічна тенденція змін щодо активностей амінотрансфераз спостерігається у щурів, які при надмірному споживанні сахарози отримували дефіцит харчового протеїну (рис. 3.2). Це можна пояснити тим, що катаболізм АРБЛ в скелетних м'язах частково регулюється дегідрогеназним комплексом. Встановлено, що «трансамінази та дегідрогенази α -кетокислот з розгалуженим боковим ланцюгом тісно пов'язані та утворюють надмолекулярний комплекс, відомий як «метаболон», функціонування якого відбувається скоординовано для врегулювання катаболізму АРБЛ. Це полегшує перенесення субстратів і підвищує ефективність реакцій» [53].

Активність дегідрогеназного комплексу в м'язах незначна й становить лише 2 % від її загальної активності в печінці. Тому за нормальних фізіологічних умов у тканинній скелетних м'язів даний комплекс майже не проявляє свою активність, що в свою чергу, сприяє синтезу білків, а утворені в реакціях трансамінування продукти трьох амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом стають доступними для окислювального декарбоксилювання даним комплексом у печінці. Варто зазначити, що «в подальшому утворенні альфа-кетокислоти за дії дегідрогеназ перетворюються до відповідних ацильованих похідних КоА, які в свою чергу, або метаболізуються в печінці або передають ацильний залишок на карнітин. Останні можуть транспортуватися для подальшого окислення в інші тканини, зокрема, в м'язи. Цей механізм дозволяє регулювати структуру внутрішньомітохондріального пулу КоА, звільняючи КоASH, що має важливе значення для метаболізму» [53]. Тому порушення роботи такого комплексу за даних експериментальних умов, ймовірно, призводитиме до накопичення альфа-кетокислот в плазмі крові [66].

Таким чином зниження активностей амінотрансфераз – лейцин-, ізолейцин- та валінамінотрансферази у скелетних м'язах щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні пов'язано зі зниженням вмісту відповідних амінокислот – субстратів даних реакцій.

Проте процеси трансамінування лейцину, ізолейцину та валіну до відповідних кетокислот є початковим етапом їх загального перетворення. Відомо, що ключовим етапом трансформування трьох амінокислот до кінцевих метаболітів є окисне декарбоксилювання, що здійснюється в печінці за допомогою дегідрогеназного комплексу альфа-кетокислот із розгалуженим боковим ланцюгом [68].

Тому нами досліджено активність декарбоксилаз розгалужених альфа-кетокислот, що утворилися в реакціях трансамінування лейцину – α -кетоізокапроат, ізолейцину – α -кето- β -метилвалеріат та валіну – α -кетоізовалеріат у мітохондріальній фракції клітин печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні.

Результати досліджень засвідчують різноспрямовану тенденцію змін щодо активностей декарбоксилаз розгалужених α -кетокислот (рис. 3.3). Так, нами встановлено, що в мітохондріальній фракції печінки щурів активність α -кетоізокапроатдекарбоксилази суттєво зростає за умов споживання надлишку сахарози незалежно від кількості харчового протеїну (групи ВС та НПР/ВС) (рис. 3.3, а).

У літературі [70] описано, що продукт трансамінування лейцину – α -кетоізокапроат викликав різку секреторну відповідь інсуліну в острівцях. Відповідь α -кетоізокапроату блокувалася метиллейцином або амінооксиацетатом – інгібіторами амінотрансфераз.

Підвищена секреція інсуліну часто пов'язана з резистентністю до інсуліну. Найпростішим поясненням є те, що нормальний рівень секреції інсуліну не здатний стимулювати нормальний кліренс глюкози. Таким чином залишкова глюкоза викликає додаткову секрецію інсуліну. Гіперсекреція інсуліну не

завжди є компенсаторною реакцією на інсулінорезистентність, це може відбуватися за відсутності резистентності до інсуліну, а в деяких випадках може являти собою первинний метаболічний дефект.

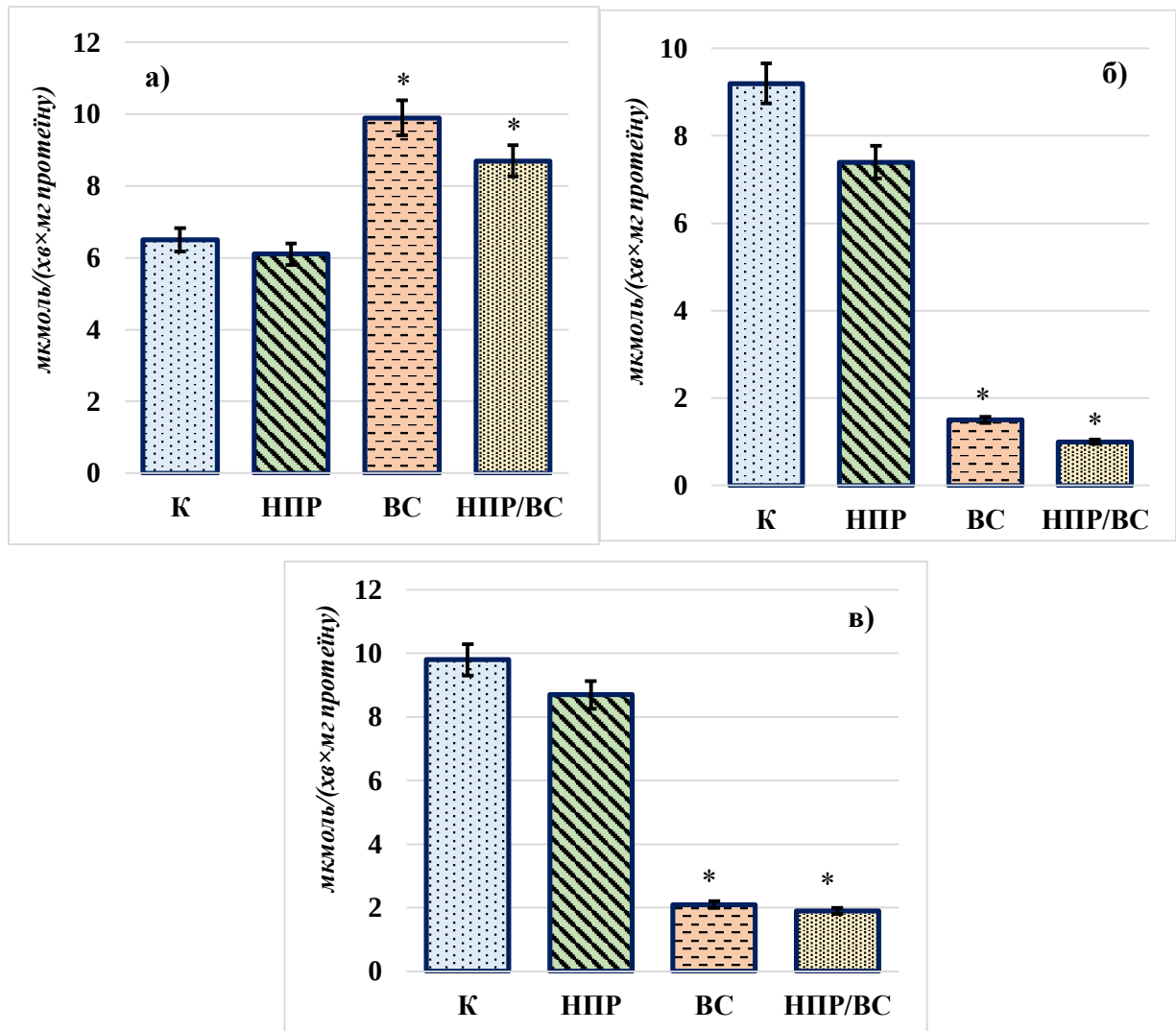


Рис. 3.3. Активність α -кетоізокапроатдекарбоксилази (а), α -кето- β -метил-валеріатдекарбоксилази (б) та α -кетоізовалеріатдекарбоксилази (в) мітохондріальній фракції печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

На додаток до глюкози, амінокислоти, деякі з їхніх аналогів α -кетокислот і субстрати мітохондріального метаболізму є потужними стимуляторами секреції інсуліну. Ці секретогоги відповідають за підтримку базальної секреції

інсуліну, на яку припадає ~50% усієї секреції інсуліну. α -Кетоізокапроат, продукт трансамінування лейцину, стимулює секрецію інсуліну.

α -Кетоізокапроат може бути окислений до ацетил-КоА та ацетоацетату, або він дає лейцин через трансамінування з глутаматом, утворюючи α -кетоглутарат. Однак окислення лейцину не робить значного внеску в секрецію інсуліну. Швидше вважається, що лейцин опосередковує його вплив через алостеричну активацію глутаматдегідрогенази, ферменту, який каталізує окисне деамінування глутамату.

Відомо, що активність дегідрогеназного комплексу строго контролюється двома ензимами: кіназою дегідрогенази кетокислот із розгалуженим ланцюгом (BCKDK), що відповідає за інактивацію даного комплексу шляхом фосфорилування, що, в свою чергу призводить до зниження його активності в гепатоцитах, й протеїнфосфатазою (PP2Cm), яка виконує зворотну дію, й відповідає за активацію цього ж комплексу шляхом дефосфорилування. Ймовірно, що за даних умов ген кінази, який відповідає за регуляцію транскрипції у відповідь на певні харчові чинники тканиноспецифічним способом стимулюватиме дію протеїнфосфатази, що призводитиме до підвищення активності даного ензимного комплексу [69].

Водночас нами встановлено зниження активностей α -кето- β -метил-валеріатдекарбоксилази (рис. 3.3, б) та α -кетоізовалеріатдекарбоксилази (рис. 3.3, в) порівняно зі значеннями контролю.

Відомо, що печінка виступає ключовим органом, який піддається впливу високих концентрацій інсуліну, що надходить до неї через ворітну вену. Регуляція метаболізму як глюкози, так і ліпідів спричинена інсуліном здійснюється через прямі, які ще називають печінкові, й непрямі або позапечінкові шляхи. Регулювання гормоном метаболізму ліпідів та глюкози здійснюється через активацію SREBP – білка, що зв'язує елемент вуглеводної відповіді і ліпогенез *de novo*. У літературі [72] зазначається, що надмірне споживання вуглеводів

викликає накопичення триацилгліцеролів у печінці через активування інсуліном цього транскрипційного фактора. Інсулін, стимулюючи активацію SREBP, сприяє фосфорилуванню серин/треонін кінази 2 (Akt2), яка підвищує експресію фактора транскрипції 1, що зв'язує регуляторний елемент стеролу (SREBP1). Останній, в свою чергу, активує ліпогенні гени: синтазу жирних кислот (FASN) і стеаройл-КоА-десатуразу-1 (SCD1). При цьому інсулін сприяє відкладенню ліпідів у печінці, водночас, пригнічуючи процеси глікогеногенезу, які протікають в цьому ж органі через пригнічення передачі сигналів серин/треонін кінази 2 (Akt2) в гепатоцитах.

Згідно літературних даних, встановлено, що субстрати дегідрогеназного комплексу розгалужених α -кетокислот – α -кетоізовалеріат, α -кетоізокапроат – також впливають на метаболізм як глюкози, так й ліпідів в печінці, послаблюючи передачу сигналів інсуліну через серин/треонін кіназу 2 (Akt2). На основі цих висновків було зроблено припущення, те що коли передача сигналів інсуліну до Akt2 порушується до надзвичайної міри, даний орган демонструватиме резистентність до інсуліну, адже в цей момент, вищезазначений гормон не зможе зупинити глікогеногенез і не зможе сприяти ліпогенезу [73].

З іншого боку, існують непрямі механізми регулювання метаболізму глюкози та ліпідів в печінці. Як вже зазначалося активність дегідрогеназного комплексу розгалужених α -кетокислот регулюється шляхом фосфорилування/дефосфорилування. Експресія протеїнфосфатази регулюється на рівні транскрипції у відповідь на стан поживних речовин. Ензимний комплекс розгалужених альфа-кетокислот складається з трьох компонентів (E1, E2 і E3), що здійснюють різні фази реакції, де α -кетокислоти з розгалуженим боковим ланцюгом перетворюються на ацилкоензим А [75].

Таким чином протеїнфосфатаза при взаємодії із субодиницею E2 дегідрогеназного комплексу починає конкурувати з кіназою цього ж комплексу за спільний субстрат. В свою чергу, вчені у своїх дослідженнях [74] пов'язали

активацію транскрипційного фактора, який зв'язує елемент вуглеводної відповіді (ChREBP), із підвищеною активністю кінази даного комплексу та зниженою активністю фосфатази цього ж комплексу, що й можливе за даних умов. Адже при активації протеїнфосфатази й змінюється загальна активність дегідрогеназного клмплексу, що й можливе за даних умов.

Зокрема, в літературі [74] зазначено, що надмірне споживання сахарози індукуватиме експресію ChREBP- β , завдяки якому рівень кінази – складової частинки дегідрогеназного комплексу підвищується, а рівень протеїнфосфатази (PP2Cm), навпаки, знижується, це призводить до зниження активності α -дегідрогеназного комплексу розгалужених α -кетокислот [74].

Відомо, що загальним механізмом інсулінорезистентності є нездатність переходити від окислення жирів натще до окислення глюкози під час їжі. Тому знижену активність α -кето- β -метил-валеріатдекарбоксилази (рис. 3.3, б) та α -кетоізовалеріатдекарбоксилази (рис. 3.3, в) у тварин, які утримувалися на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні можна пов'язати із тим, що, ймовірно, за даних умов надлишок вільних жирних кислот конкуруватиме з розгалуженими кетокислотами за ті самі шляхи окислення, відповідно, продукти їхнього розпаду – НАДН+ H^+ та ацетил-КоА, можуть алостерично пригнічувати активність дегідрогеназного комплексу, ймовірно, через його структурну схожість з піруватдегідрогеназою – ключовим гліколітичним ферментом.

Згідно моделі Рендла побічні продукти окислення жирних кислот, такі як ацетил-КоА, НАДН, діятимуть як потужні алостеричні інгібітори гліколізу. Можна припустити, що за даних умов субстрати дегідрогеназного комплексу розгалужених α -кетокислот, ймовірно, впливатимуть на активність піруватдегідрогенази, в печінці, що призводить до помітного зниження поглинання глюкози та окислення, а також до зниження ферментного комплексу в даному органі [75].

Таким чином, споживання надлишку сахарози незалежно від кількості харчового протеїну супроводжується порушенням функціонування дегідроге-

назного комплексу розгалужених альфа-кетокислот: активацією-кетозокапроатдекарбоксилази на тлі зниження α -кетоз- β -метил-валеріатдекарбоксилази та α -кетозовалеріатдекарбоксилази у мітохондріальній фракції печінки щурів.

Описано, що «одним з найбільш важливих показників проміжного обміну є вміст вільних амінокислот у крові, що відображає баланс між надходженням амінокислот із їжі та тканин внаслідок катаболізму легкоомобілізованих протеїнів. Однак, метаболічна функція АРБЛ визначається більшою мірою його внутрішньоклітинною концентрацією, а не рівнем в плазмі крові. Тому вміст у плазмі лише частково може бути характеристикою надлишку або дефіциту лейцину» [53].

Результати проведених нами досліджень показали зниження вмісту амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у плазмі крові усіх дослідних груп тварин порівняно із показниками контролю (рис. 3.4).

Враховуючи, що АРБЛ є есенціальними амінокислотами, які не синтезуються *de novo* в організмі, їх рівень в крові буде залежати від кількості спожитої їжі та гідролізу харчового протеїну в тканинах [76]. Так, послідовне зниження вмісту трьох амінокислот у сироватці крові за умов аліментарної депривації протеїну активує механізм протеїнозберігаючого періоду, в момент якого мінімізуються витрати енергії та зменшується втрата азоту з сечею. Ймовірно, що зниження вмісту в крові розгалужених амінокислот через білкове голодування призводить й до зниження обміну білків м'язів, що в свою чергу, призводить до зменшення рівня даних амінокислот у крові [77].

Нами зареєстровано й зниження концентрації лейцину, ізолейцину та валіну в крові порівняно із показниками контролю у тварин, що споживали високосахарозний раціон (рис. 3.4). В одній зі своїх публікацій Ньюгард разом з іншими дослідниками [77] показали, що рівень АРБЛ та їх метаболітів й ароматичних амінокислот корелює із чутливістю до інсуліну.

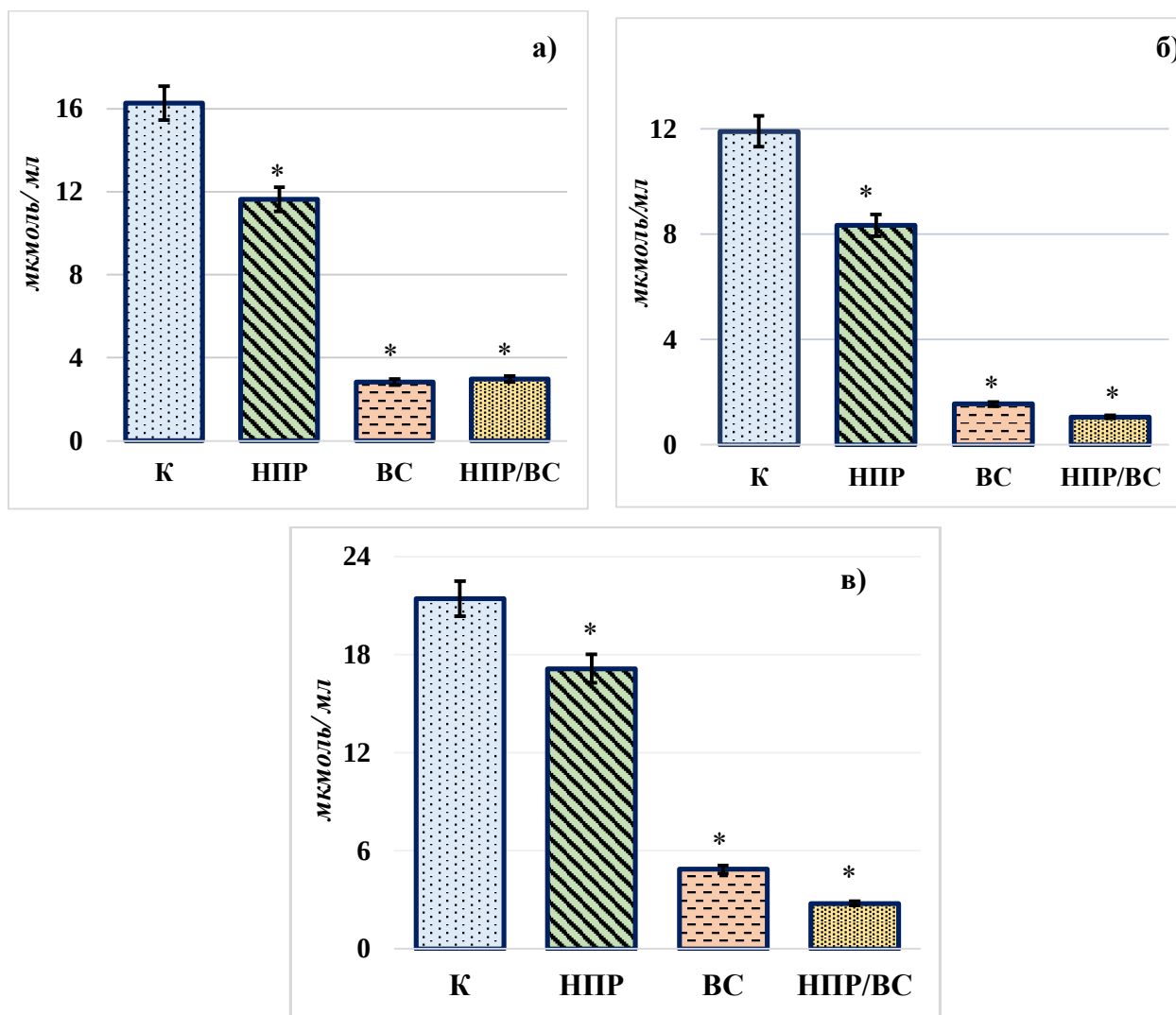


Рис. 3.4. Концентрація лейцину (а), ізолейцину (б) та валіну (в) у плазмі крові щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Транспортні системи ароматичних амінокислот та амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом здатні виконувати роль не тільки транспортера, а й рецептора. Виконуючи, дану роль їх спільна транспортна система передає інформацію про надходження поживних речовин в тканину до комплексу mTOR1, який дозволяє клітинам певним чином реагувати на зміни рівнів амінокислот у крові. Враховуючи те, що АРБЛ активують даний комплекс, який шляхом фосфорилування субстрату рецептора інсуліну — IRS-1 сприяє резистентності до інсуліну в тканинах [76], можна припустити, що за даних умов

інсулін реагуючи на гіперглікемію стимулюватиме транспортери АРБЛ до інших периферичних тканин з метою ініціації синтезу м'язових протеїнів, що в свою чергу, призводить до зниженого вмісту АРБЛ у сироватці крові [77].

Водночас, транспортування ароматичних та розгалужених амінокислот до тканин та органів через єдиний спільний транспортер — LNAA призводить до виникнення між ними конкуренції. Таким чином, підвищений рівень ароматичних амінокислот призводитиме до зниження рівня трьох розгалужених амінокислот, що й можливе за даних умов [55].

Водночас нами зафіксовано зниження вмісту амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у сироватці крові щурів за умов надмірного споживання вуглеводів на тлі аліментарної депривації протеїну. В літературі [54] повідомляється про те, що посилений протеоліз та синтез білка в м'язах підвищує доступність АРБЛ для скелетних м'язів. За умов нестачі харчового протеїну три амінокислоти можуть виступати джерелом азоту для синтезу аланіну та глютаміну, що вивільняються в кровотік й в подальшому поглинаються вісцеральними тканинами, в якості глюкогенних субстратів. Ймовірно, що за даних умов частина азоту, яка виділяється під час розпаду аланіну й глютаміну використовуватиметься для амінування розгалужених амінокислот, що призводитиме до зниження рівнів трьох амінокислот крові [52].

Отже, дисбаланс нутрієнтів у харчовому раціоні супроводжується порушенням процесів трансамінування АРБЛ що характеризується зниженням активності трансаміназ у мітохондріальній фракції скелетних м'язів, що, очевидно, пов'язано зі зниженням вмісту лейцину, ізолейцину та валіну – субстратів даних реакцій.

Надмірне споживання сахарози виступає ключовим чинником зниження вмісту АРБЛ у плазмі крові щурів, що можна розглядати як характеристику внутрішньоклітинного дефіциту даних амінокислот у м'язах.

ВИСНОВКИ

1. Дисбаланс нутрієнтів у харчовому раціоні супроводжується порушенням процесів трансамінування амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом, що характеризується зменшенням вмісту лейцину, ізолейцину й валіну та зниженням активностей відповідних аміотрансфераз у мітохондріальній фракції скелетних м'язів щурів.
2. Споживання надлишку сахарози незалежно від кількості харчового протеїну супроводжується порушенням функціонування дегідрогеназного комплексу розгалужених альфа-кетокислот: активацією кетоізокапроатдекарбоксилази на тлі зниження α -кето- β -метил-валеріатдекарбоксилази та α -кетоізовалеріатдекарбоксилази у мітохондріальній фракції печінки щурів.
3. Надмірне споживання сахарози виступає ключовим чинником зниження вмісту амінокислот із розгалуженим боковим ланцюгом у плазмі крові щурів, що можна розглядати як характеристику внутрішньоклітинного дефіциту даних амінокислот у м'язах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Santos E., Oliveira D., Graziela B., Tsujita M., Jackeline O., Hastreiter A., Ricardo A. Fock., Borelli P. Hematological alterations in protein malnutrition. *Nutrition reviews*. 2017. V. 75(11). P. 909-919
2. Beaumont M., Blachier F. Amino acids in intestinal physiology and health. *Amino Acids in Nutrition and Health*. 2020. V. 1265. P. 1-20. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-45328-2_1
3. Mittendorfer B., Klein S., Fontana L. A word of caution against excessive protein intake. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020. V. 16(1) P. 59-66. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0274-7>
4. Conboy E., Vairo F., Schultz M., Agre K., Ridsdale R., Deyle D., Lanpher B. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency: unique presenting laboratory values and a review of biochemical and clinical features. *JIMD Reports*. 2017. V. 40. P. 63-69.
5. Nilsen M., Jersin Sb., Ulvik A., Madsen A., McCann A., Svensson P., Dankel S. 3-Hydroxyisobutyrate, a strong marker of insulin resistance in type 2 diabetes and obesity that modulates white and brown adipocyte metabolism. *Diabetes*. 2020. V. 69(9). P. 1903-1916. <https://doi.org/10.2337/db19-1174>
6. Vanweert F., Schrauwen P., Phielix E. Role of branched-chain amino acid metabolism in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes-related metabolic disturbances BCAA metabolism in type 2 diabetes. *Nutrition & Diabetes*. 2022. V.12 (1). P. 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41387-022-00213-3>
7. Wolak-Dinsmore J., Gruppen E., Shalaurova I., Matyus P., Grant P., Gegen R., Dullaart. P. A novel NMR-based assay to measure circulating concentrations of branched-chain amino acids: Elevation in subjects with type 2 diabetes mellitus and association with carotid intima media thickness. *Clinical biochemistry*. 2018. V.54. P. 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.02.001>

8. Navarro G., Sharma A., Dugas L. R., Forrester T., Gilbert J. A., Layden B. T. Gut microbial features can predict host phenotype response to protein deficiency. *Physiological reports*. 2018. V. 6 (23). P. 13932. <https://doi.org/10.14814/phy2.13932>.
9. Hou. Y., Wu G. Nutritionally essential amino acids. *Advances in Nutrition*. 2018. V. 9(6). P.849-851. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy054>
10. Wolfe R.R. Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality?. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2017. V. 14(1). P. 30. <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0184-9>.
11. Bifari F., Nisoli E. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. *British journal of pharmacology*. 2017. V. 174(11). P. 1366-1377. <https://doi.org/10.1111/bph.13624>.
12. Gojda J., Cahova M. Gut microbiota as the link between elevated BCAA serum levels and insulin resistance. *Biomolecules*. 2021. V. 11(10). P.1414.
13. Webb L.A., Sadri H., Schuh K., Egert S., Stehle P., Meyer I., Sauerwein H. Branched-chain amino acids: Abundance of their transporters and metabolizing enzymes in adipose tissue, skeletal muscle, and liver of dairy cows at high or normal body condition. *Journal of dairy science*. 2020. V. 103(3). P. 2847-2863. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17147>.
14. Zhang J., Xu Y., Li D., Fu L., Zhang X., Bao Y., Zheng L. Review of the correlation of LAT1 with diseases: mechanism and treatment. *Frontiers in Chemistry*. 2020. V. 8. P. 564-809.<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.564809>.
15. Guetg A., Mariotta L., Bock L., Herzog B., Fingerhut R., Camargo S. M., Verrey, F. Essential amino acid transporter Lat4 (Slc43a2) is required for mouse development. *The Journal of physiology*. 2015. V. 593(5). P. 1273-1289. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283960>.
16. Zhenyukh O., Civantos E., Ruiz-Ortega M., Sánchez M. S., Vazquez C., Peiro C., Mas S. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via

- mTORC1 activation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017. V. 104. P. 165-177. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.009>.
17. Rajendram R., Preedy V. R., Patel V. B. Branched chain amino acids in clinical nutrition. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*. 2018. V. 83(4). P. 424-433. doi: 10.1016/j.rgmx.2018.05.006.
 18. Lo E., Xu J. H., Zhan Q., Zeng Z., El-Nezami H. The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Liver Diseases. *Biomedicines*. 2022. V. 10(6). P. 1444. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061444>.
 19. Toyokawa Y., Koonthongkaew J., Takagi, H. An overview of branched-chain amino acid aminotransferases: functional differences between mitochondrial and cytosolic isozymes in yeast and human. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021. V. 105(21). P. 8059-8072. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11612-4>
 20. Madu G. N. Effect of Branched-Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Depletion on Myotube. *Protein Metabolism*. 2020. V. 1. P. 1-15. <http://hdl.handle.net/10315/37913>.
 21. Adeva-Andany M. M., López-Maside L., Donapetry-García C., Fernández-Fernández C., Sixto-Leal C. Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans. *Amino acids*. 2017. V. 49(6). P. 1005-1028. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2412-7>.
 22. Zhang Z. Y., Monleon D., Verhamme P., Staessen J. A. Branched-chain amino acids as critical switches in health and disease. *Hypertension*. 2018. V. 72(5). P. 1012-1022. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10919>.
 23. Mann G., Mora S., Madu G., Adegoke O. A. Branched-chain amino acids: catabolism in skeletal muscle and implications for muscle and whole-body metabolism. *Frontiers in Physiology*. 2021. V. 12. P. 702-826. doi:10.3389/fphys.2021.702826.
 24. Nardecchia F., Caciotti A., Giovanniello T., Ferri L., Galosi S., Leuzzi V. 3-Methylglutaconic Aciduria Type I Due to AUH Defect: The Case Report of a Diagnostic Odyssey and a Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23(8). P. 4422. <https://doi.org/10.3390/ijms23084422>

25. Grünert C., Schlatter M., Schmitt N., Gemperle-Britschgi C., Mrázová L., Sass O. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: clinical presentation and outcome in a series of 37 patients. *Molecular genetics and metabolism*. 2017. V. 121(3). P. 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.05.014>
26. Grünert S. C., Sass J. O. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: one disease-many faces. *Orphanet journal of rare diseases*. 2020. V. 15(1). P. 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-1319-7>.
27. Stepien K. M., McCarthy P., Treacy E. P., O'Byrne J. J., Pastores G. M. Neurocognitive assessments and long-term outcome in an adult with 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. 2018. V. 16. P. 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.06.005>.
28. Longo N., Sass O., Jurecka A., Vockley J. Biomarkers for drug development in propionic and methylmalonic acidemias. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2022. V. 45(2). P. 132-143. <https://doi.org/10.1002/jimd.12478>.
29. Allaire M., Rautou P.E., Codogno P., Lotersztajn S. Autophagy in liver diseases: Time for translation? *Journal of Hepatology*. 2019. V. 70(5). P. 985-998. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.006>
30. Dos Santos L., Anastácio R. The impact of L-branched-chain amino acids and L-leucine on malnutrition, sarcopenia, and other outcomes in patients with chronic liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021. V. 15(2). P. 181-194. doi: <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1829470>
31. Tsien C., Garber A., Narayanan A., Shah S.N., Barnes D., Eghtesad B., Fung J., McCullough A.J., Dasarathy S. Post-liver transplantation sarcopenia in cirrhosis: a prospective evaluation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014. V. 29. P. 1250–1257. <https://doi.org/10.1111/jgh.12524>
32. Dasarathy J., McCullough A.J., Dasarathy S. Sarcopenia in Alcoholic Liver Disease: Clinical and Molecular Advances. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017. V. 41(8). P.1419-1431 <https://doi.org/10.1111/acer.13425>

33. Thapaliya S., Runkana A., McMullen R., Nagy E., McDonald C., Naga Prasad V., Dasarathy S. Alcohol-induced autophagy contributes to loss in skeletal muscle mass. *Autophagy*. 2014. V. 10. P. 677–690. <https://doi.org/10.4161/auto.27918>
34. Li F., Yin Y., Tan B., Kong X., Wu G. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids*. 2011. V. 41(5). P. 1185-1193. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0983-2>
35. Boehmer H., Brown D., Wesolowski R., Hay W., Rozance A Chronic Fetal Leucine Infusion Potentiates Fetal Insulin Secretion and Increases Pancreatic Islet Size, Vascularity, and β Cells in Late-Gestation Sheep. *The Journal of Nutrition*. 2020. V. 150(8). P. 2061-2069. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa138>
36. Argyrakopoulou G., Kontrafouris P., Eleftheriadou I., Kokkinos A., Arapostathi C., Kyriaki D., Perrea D., Revenas C., Katsilambros N., Tentolouris N. The Effect of the Oral Administration of Leucine on Endothelial Function, Glucose and Insulin Concentrations in Healthy Subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019. V. 127(8). P. 505-510. doi: 10.1055/a-0597-8985.
37. Luzi L., Giordano M., Castellino P. Effects of insulin and amino acids on leucine metabolism in young and middle-aged humans. *Eur J Nutr*. 2001. V. 40(3). P. 106-12. <https://doi.org/10.1007/s003940170010>
38. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M. Lylyk I.S. Indexes of citrulline metabolism in rat liver under the toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Ukr Biochem J*. 2020. V. 92(1). P. 113-119 doi: <https://doi.org/10.15407/ubj92.01.113>.
39. Копильчук Г. П., Волощук О. М. Активність NADH-убіхінонредуктази та сукцинатдегідрогенази печінки щурів за умов токсичного гепатиту, індукованого ацетоамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну. *Ukr Biochem J*. 2015. V. 87(1). P. 121-126.
40. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee

- on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 199. V. 123(11). P. 1939-1951.
41. Fernandes-Lima F., Monte T. L., Nascimento F. A., Gregório B. M. Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First 'Hit' of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs. Cells Tissues Organs.* 2016. V. 201(6). P. 464-472. doi: 10.1159/000446514
 42. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., Данилович Г.В., Костерін С.О. Шляхи та механізми трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях. *Фізіол. журн.* 2017. Т. 63, № 4. С. 87–104.
 43. Акопова О., Сагач В. Индукция открытия митохондриальной поры под действием Ca^{2+} в миокарде крыс. *Український біохімічний журнал.* 2004. Т. 76. № 1. С. 48 – 55.
 44. Fekkes D. State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996. V. 682(1). P. 3-22. doi: 10.1016/0378-4347(96)00057-6.
 45. Taylor R.T., Jenkins W.T. Leucine aminotransferase. I. Colorimetric assays. *J Biol Chem.* 1966. V. 241(19). P. 4391-4395.
 46. Patston P.A., Espinal J., Beggs M., Randle P.J. Assay of total complex and activity state of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex and of activator protein in mitochondria, cells, and tissues. *Methods Enzymol.* 1988. V. 166. P. 175-189. doi: 10.1016/s0076-6879(88)66024-1.
 47. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 1951. V. 123. № 1. P. 265–273.
 48. Wang J., Liu Y., Lian K., Shentu X., Fang J., Shao J., Sun H. BCAA catabolic defect alters glucose metabolism in lean mice. *Frontiers in physiology.* 2019. V. 10. P. 1140. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01140>
 49. Bröer S., Gauthier-Coles G. Amino acid homeostasis in mammalian cells with a focus on amino acid transport. *The Journal of Nutrition.* 2022. V. 152(1). P. 16-28. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab342>

50. Dimou A., Tsimihodimos V., Bairaktari E. The Critical Role of the Branched Chain Amino Acids (BCAAs) Catabolism-Regulating Enzymes, Branched-Chain Amino transferase (BCAT) and Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase (BCKD), in Human Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23(7), P. 4022. <https://doi.org/10.3390/ijms23074022>
51. Bifari F., Nisoli E. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. *British journal of pharmacology*. 2017. V. 174(11). P. 1366-1377. <https://doi.org/10.1111/bph.13624>
52. Gawedzka A., Grandys M., Duda K., Zapart-Bukowska J., Zoladz J. A., Majerczak, J. Plasma BCAA concentrations during exercise of varied intensities in young healthy men—the impact of endurance training. *Peer journal*. 2020. V. 8. P. 10491. <https://doi.org/10.7717/peerj.10491>
53. Копильчук Г.П., Николайчук І.М., Сандуляк Ю.В. Особливості трансамінування лейцину в скелетних м'язах щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*. 2022. V. 14. Iss. 1. P. 14-20.
54. Chen J., Ou Y., Luo R., Wang J., Wang D., Guan J., Li Y., Xia P., Chen P.R., Liu Y. SAR1B senses leucine levels to regulate mTORC1 signalling. *Nature*. 2021. V. 596(7871). P. 281-284. doi: 10.1038/s41586-021-03768-w.
55. Yoon M.S. The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism. *Nutrients*. 2016. V. 8(7). P. 405. <https://doi.org/10.3390/nu8070405>
56. Yin Q., Brameld J. M., Parr T., Murton A.. Leucine and mTORc1 act independently to regulate 2-deoxyglucose uptake in L6 myotubes. *Amino Acids*. 2020. V. 52(3). P. 477-486.
57. Yoshizawa F. Effects of leucine and isoleucine on glucose metabolism. In *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition* Humana Press, New York, NY. 2015. V. 1. P. 63-73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1923-9_6

58. Yoon I., Nam M., Kyoung K., Hee-Sun M., Sungmin J., Jayun S., Ji A., Seung J., Sang B., Seongmin K., Youn H., Yang W., Hee Chan., Kibum K., Min-Sun Y., Aerin C., Kyukwang P., Hwang G., Hwang K., Han J., Kim J, Sunghoon K. Glucose-dependent control of leucine metabolism by leucyl-tRNA synthetase 1. *Science*. 2020. V. 367 (6474). P. 205–210. DOI: 10.1126/science.aau2753
59. Holeček M. Why are branched-chain amino acids increased in starvation and diabetes? *Nutrients*. 2020. V.12(10). P. 3087. <https://doi.org/10.3390/nu12103087>
60. Takada A., Shimizu F., Ishii Y., Ogawa M., Takao T. Glucose or Sucrose Intakes and Plasma Levels of Essential and Nonessential Amino Acids. In *New Insights Into Metabolic Syndrome*. *IntechOpen*. 2020. V.3. P. 121-216.
61. Jang C., Oh S., Wada S., Rowe G. C., Liu L., Chan M., Arany Z. A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. *Nature medicine*. 2016. V. 22(4). P. 421-426. <https://doi.org/10.1038/nm.4057>
62. Liu S., Sun Y., Zhao R., Wang Y., Zhang W., Pang W. Isoleucine increases muscle mass through promoting myogenesis and intramyocellular fat deposition. *Food & function*. 2021. V. 12(1). P. 144-153. DOI: 10.1039/D0FO02156C
63. O’rielly R., Li H., Lim S. M., Yazbeck R., Kritas S., Ullrich S., Page A. J. The effect of isoleucine supplementation on body weight gain and blood glucose response in lean and obese mice. *Nutrients*. 2020. V. 12(8). P. 2446. <https://doi.org/10.3390/nu12082446>
64. Sayda M. H., Abdul Aziz M. H., Gharahdaghi N., Wilkinson D. J., Greenhaff P. L., Phillips, Atherton P. J. Caloric restriction improves glycaemic control without reducing plasma branched-chain amino acids or keto-acids in obese men. *Scientific Reports*. 2022. V. 12(1). P. 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21814-z>
65. Biswas D., Duffley L., Pulinilkunnil T. Role of branched-chain amino acid–catabolizing enzymes in intertissue signaling, metabolic remodeling, and energy homeostasis. *The FASEB Journal*. 2019. V. 33(8). P. 8711-8731. <https://doi.org/10.1096/fj.201802842RR>

66. Tessari P. Leucine transamination is lower in middle-aged compared with younger adults. *The Journal of Nutrition*. 2017. V. 147(11). P. 2025-2030. <https://doi.org/10.3945/jn.117.250852>
67. Gupta A. Comprehensive biochemistry for dentistry: textbook for dental students. *Springer*. 2018. P.1-604.
68. Petersen K., Dufour S., Cline G., Shulman G. I. Regulation of hepatic mitochondrial oxidation by glucose-alanine cycling during starvation in humans. *The Journal of clinical investigation*. 2019. V. 129(11). P. 4671-4675.
69. Go M., Shin E., Jang S., Nam M., Hwang G., Lee S. BCAT1 promotes osteoclast maturation by regulating branched-chain amino acid metabolism. *Experimental & molecular medicine*. 2022. V. 54(6). P. 825-833. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00775-3>
70. Rabaglia M.E., Gray-Keller M.P., Frey B.L., Shortreed M.R., Smith L.M., Attie A.D. Alpha-Ketoisocaproate-induced hypersecretion of insulin by islets from diabetes-susceptible mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005. V. 289(2). P. 218-224. doi: 10.1152/ajpendo.00573.2004.
71. Ampong I., Watkins A., Gutierrez-Merino J., Ikwuobe J., Griffiths H. Dietary protein insufficiency: an important consideration in fatty liver disease? *British Journal of Nutrition*. 2020. V. 123(6). P. 601-609.
72. Zhao H., Zhang F., Sun D., Wang X., Zhang X., Zhang J., Tao L. Branched-chain amino acids exacerbate obesity-related hepatic glucose and lipid metabolic disorders via attenuating Akt2 signaling. *Diabetes*. 2020. V. 69(6). P. 1164-1177. <https://doi.org/10.2337/db19-0920>
73. White P., McGarrah R., Grimsrud P. A., Tso S., Yang W. Haldeman H., Newgard C. BThe BCKDH kinase and phosphatase integrate BCAA and lipid metabolism via regulation of ATP-citrate lyase. *Cell metabolism*. 2018. V. 27(6). P. 1281-1293. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.015>

74. Ortega-Prieto P., Postic C. Carbohydrate sensing through the transcription factor ChREBP. *Frontiers in genetics*. 2019. V. 10. P. 472. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00472>
75. Vanweert F., Schrauwen P., Phielix E. Role of branched-chain amino acid metabolism in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes-related metabolic disturbances BCAA metabolism in type 2 diabetes. *Nutrition & Diabetes*. 2022. V. 12(1). P. 1-13. doi: 10.3389/fcimb.2022.834485
76. Siomkajło M., Rybka J., Mierzchała-Pasierb M., Gamian A., Stankiewicz-Olczyk J., Bolanowski M., Daroszewski J. Specific plasma amino acid disturbances associated with metabolic syndrome. *Endocrine*. 2017. V. 58(3). P. 553-562. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1460-9>
77. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition & metabolism*. 2018. V. 15(1). P. 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0271-1>

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

Правила безпеки передбачають проведення заходів, спрямованих на попередження небезпеки, пов'язаної з особливостями роботи в лабораторії, а саме:

- отруєння, алергізація, опіки та інші ураження, пов'язані із застосуванням отруйних і вогнебезпечних речовин, сильних кислот, лугів тощо;
- вплив шкідливих чинників під час роботи з приладами, обладнанням і скляним посудом.

Обладнання біохімічної лабораторії

До загального обладнання біохімічної лабораторії належать: термостати повітряні, фотоколориметри, спектрофотометри, центрифуги, шафи сушильні, гематологічні аналізатори, біохімічні аналізатори, мікроскопи, дозатори, автоклави, дистилятори тощо.

Під час експлуатації апаратури та обладнання необхідно суворо дотримуватись вимог інструкцій та паспортів. Робота на несправних електроприладах та електрообладнанні забороняється.

Під час *експлуатації центрифуг* необхідно дотримуватись таких вимог:

- при завантаженні пробірками розташовувати їх суворо попарно для рівноваги;
- перед включенням в електромережу перевірити, чи герметично до корпусу прилягає кришка;
- вмикати в електромережу плавно, після вимкнення дати можливість ротору зупинитись, зупиняти рукою забороняється;
- після роботи потрібно провести огляд приладу і протерти його.

Під час *експлуатації термостата* необхідно дотримуватись вимог:

- забороняється ставити в термостат речовини, що легко займаються;
- захисні ковпаки від регулюючих пристроїв не можна знімати без електрика;
- чистити можна тільки після відключення від електромережі.

При роботі з *електрообладнанням* забороняється:

- працювати з незаземленим обладнанням;
- торкатися частин обладнання, через які проходить струм;
- перекладати з місця на місце апарати, які перебувають під напругою;
- користуватись несправним обладнанням;
- самостійно ремонтувати обладнання та замінювати стандартні запобіжники саморобними;
- закріплювати електропровід мотузкою, цвяхами тощо;
- працювати з обладнанням, що не пройшло чергової перевірки згідно з графіком;
- працювати без засобів захисту;
- залишати без догляду ввімкнене обладнання.

Заходи надання першої допомоги

1. При роботі в біохімічній лабораторії найбільш вірогідними випадками є пошкодження, пов'язані з необережним поводженням з хімічними реактивами, вогнем і електронагрівальними приладами, скляним посудом, аваріями лабораторного обладнання.

2. При опіках хімічними речовинами, особливо кислотами і лугами, уражену ділянку шкіри швидко промивають великою кількістю води, а потім на обпечене місце накладають примочку: при опіках кислотою з 2 % розчином питної соди; при опіках лугами з 2 % розчином оцтової кислоти.

3. При термічних опіках обпечене місце присипають двовуглекислим натрієм (питна сода), крохмалем або тальком, або прикладають примочки з 96% етилового спирту, 2 % свіжоприготованим розчином питної соди або 2 % розчином перманганату калію. Потім змащують уражене місце маззю від опіків. При важких опіках потерпілого слід негайно відправити до медпункту.

4. При отруєнні парами шкідливих і отруйних речовин вивести по на чисте повітря, при необхідності зробити штучне дихання, дати протиотруту (молоко), викликати лікаря або відправити до медпункту.

5. При отруєнні через стравохід дати потерпілому велику кількість 2 % розчину перманганату калію, дати протиотруту (молоко), викликати лікаря або відправити до медпункту.