

УДК 577.1:547.962.9

Л.Б. Бондаренко, д-р біол. наук, Г.Л. Гайдай, канд. біол. наук

ЕФЕКТ НАВАНТАЖЕННЯ РАЦІОНУ ФЕНІЛАЛАНІНОМ НА КОЛАГЕН І ТИПУ ШКІРИ ЩУРІВ, УРАЖЕНИХ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА

В експериментах на щурах-самцях лінії Вістар досліджено вплив навантаження раціону фенілаланіном на амінокислотний склад колагену І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена. Показано здатність навантаження раціону фенілаланіном на фоні безбілкової дієти нормалізувати якісні зміни у колагені І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена.

In experiments on Wistar male rats influence of phenylalanine load on skin type I collagen amino acid composition of animals with Guerin's carcinomas has been studied. As a result of investigation it has been shown that phenylalanine load of diet can normalize qualitative changes in skin type I collagen amino acid composition of animals with Guerin's carcinomas.

Вступ. Результати численних досліджень на протязі останнього десятиріччя механізмів регуляції обміну речовин в організмі знову підвищили інтерес науковців до амінокислот, що на даний момент розглядаються як універсальні природні біологічно активні сполуки, здатні виступати регуляторами спрямованої дії та використовуватись, у зв'язку з цим, як ефективні лікарські засоби [1]. При цьому необхідним є вивчення індивідуальної ролі кожної амінокислоти, адже зі змінами вмісту якоїсь із даних сполук змінюється як транспорт, так і внутрішньоклітинна концентрація інших. Наприклад, фенілаланін у надмірних кількостях може пригнічувати включення тирозину до білків печінки, але в той же час стимулювати включення триптофану, яке у свою чергу сповільнює утилізацію лейцину і гістидину [2].

Узагалі, фенілаланін заслуговує на особливу увагу. Зміни вмісту даної амінокислоти в пулі сироватки, тканин і органів супроводжують такі серйозні патології, як ревматизм, гіпертонія, атеросклероз, цукровий діабет та інші гормональні порушення, а також виразки різної локалізації [2]. Нещодавно встановлено, що зміни в обміні фенілаланіну можуть розглядатись і як індикатор реакції організму на рівень забрудненості навколишнього середовища [3]. До того ж, вивчення транспорту фенілаланіну та кінетики його обміну показало високий ступінь незалежності даних параметрів від інших складових раціону [4,5].

Усе зазначене зумовило наш інтерес до вивчення індивідуального впливу навантаження раціону фенілаланіном на структуру сполучнотканинних білків, що формувались у процесі ураження організму онкологічним захворюванням, і з'ясування можливої ролі даної амінокислоти як регулятора обміну білків за даної патології

Метою нашої роботи було вивчення впливу навантаження раціону фенілаланіном (на фоні безбілкової дієти) на амінокислотний склад колагену І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена. У зв'язку з цим необхідно було вирішити наступні завдання: провести порівняльне вивчення амінокислотного складу колагенів щурів у нормі та при карциномі Герена; дослідити можливості регуляції *in vivo* якісного складу колагенів у нормі та при неопластичному процесі за допомогою навантаження раціону фенілаланіном.

Об'єкти й методи досліджень. Експерименти проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар (120–150 г маси тіла). Тварини контрольної та І дослідної групи утримувались на стандартному раціоні віварію (20 % харчового білка). Щури II дослідної одержували раціон, позбавлений білка, але збалансований за іншими поживними речовинами, вітамінами і мінералами. Тварини III дослідної групи на фоні безбілкового раціону з першого

дня годування одержували навантаження фенілаланіном із розрахунку 500мг/100 г маси тіла щура на добу.

Щурам дослідних груп було прищеплено карциному Герена. Для цього відбирали пухлину розміром приблизно 3 см³, відділяли слиз, некротичні ділянки, подрібнювали й готували 30 %-у суспензію пухлинних клітин у фізіологічному розчині. Усі процедури проводили при температурі 4 °С. Суспензію вводили тваринам підшкірно з розрахунку 0,4 мл на 100 г м. т. щура. Через 15 діб було відмічено формування щеплених пухлин. На 21-й день після появи пухлин тварин забивали декапітацією, відбирали шкіру й одержували колаген І типу за методом [6]. На першому етапі проводили екстракцію білка 0,1 моль/л Na-цитратним буфером (рН 4,0) з наступним діалізом проти 0,01 моль/л Na₂HPO₄ при температурі 4 °С. Кристали білка збирали центрифугуванням при 6000 g 20 хв. Одержаний білок (100 мг) розчиняли в 10 мл 0,1 моль/л оцтової кислоти (рН 2,5) і додавали пепсин з розрахунку 20 мг/г білка. Залишали на 3 доби при температурі 4 °С. Потім проводили нейтралізацію розчину сухим Tris до рН 7,4 для інактивації пепсину. Наступним етапом було фракціонування розчину висололюванням NaCl. Фракція, що випадала у осад при 2,2 моль/л NaCl містила колаген І типу. Препарати піддавали діалізу проти 15 % KCl у 0,02 моль/л Na₂HPO₄. Чистоту препаратів колагену І типу перевіряли електрофоретично [7].

Аналіз амінокислотного складу проводили за допомогою амінокислотного аналізатора AAA-881 (Чехія) за методом, описаним у робрті [8].

Результати досліджень та їх обговорення. Результати визначення впливу різного рівня забезпеченості раціону білком і навантаження фенілаланіном на фоні безбілкової дієти на амінокислотний склад колагену І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена, наведено в табл. 1.

З одержаних даних видно, що за умови формування карциноми Герена у тварин, які утримувались на стандартному раціоні (дослідна група I), синтезувався колаген І типу шкіри, який вірогідно відрізнявся від даного білка в нормальних тварин за вмістом 7 амінокислот: зростала кількість гідроксипроліну при одночасному зниженні вмісту аспарагінової кислоти, серину, аланіну, валіну, метіоніну й фенілаланіну. Такі зміни в амінокислотному складі колагену можуть позначитись на структурі колагенової спіралі (зростання гідроксипроліну), на ступені її жорсткості (зміни за аланіном, валіном, метіоном і фенілаланіном), на значенні її поверхневого заряду (зміни за аспарагіною кислотою та серином) [9]. Крім того, зниження вмісту аспарагінової кислоти може привести до зменшення числа доменів Arg-Глі-Асп, відповідальних за процеси адгезії клітин до колагенових

фібрил [10], а зниження вмісту серину – числа локусів взаємодії з ферментом, що відщеплює від колагенової молекули фрагменти, здатні стимулювати процеси фібрилогенезу *de novo* [11].

Утримання дослідних тварин з карциномою Герена на безбілковому раціоні (дослідна група II) вело до зменшення числа вірогідних відмінностей амінокислотного складу колагену I типу шкіри даної групи від норми.

Зміни були відмічені стосовно 5 амінокислот і вони виявлялися слабкіше, ніж у групі I: знижувався вміст аспарагінової кислоти, серину, аланіну та фенілаланіну і зростав – проліну. У цілому безбілковий раціон послаблював ступінь виявлення змін у амінокислотному складі колагену I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена, не змінюючи кардинально самого характеру цих змін.

Таблиця 1. Амінокислотний склад колагену I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена, при різній забезпеченості раціону білком і навантаженні фенілаланіном (залишки/1000 залишків, $M \pm m$, $n=6$).

Амінокислота	Контроль	Дослід I	Дослід II	Дослід III
Лізин	29,37 $\pm$ 0,67	31,07 $\pm$ 3,19	31,88 $\pm$ 2,44	31,26 $\pm$ 1,82
Гістидин	3,89 $\pm$ 0,36	3,39 $\pm$ 0,48	3,66 $\pm$ 1,27	3,65 $\pm$ 0,52
Аргінін	49,30 $\pm$ 3,96	51,33 $\pm$ 4,90	51,44 $\pm$ 4,45	50,63 $\pm$ 2,21
Гідроксипролін	79,12 $\pm$ 5,73	113,81 $\pm$ 2,87*	104,47 $\pm$ 10,91	101,80 $\pm$ 11,06
Аспарагінова к-та	47,97 $\pm$ 1,31	34,10 $\pm$ 1,93*	32,43 $\pm$ 0,93*	34,62 $\pm$ 2,24
Треонін	18,33 $\pm$ 1,51	18,49 $\pm$ 2,92	19,14 $\pm$ 0,98	19,08 $\pm$ 2,76
Серин	51,61 $\pm$ 1,72	38,22 $\pm$ 0,24*	27,86 $\pm$ 1,98*	39,66 $\pm$ 1,26**
Глутамінова к-та	74,92 $\pm$ 1,70	72,73 $\pm$ 0,22	76,58 $\pm$ 3,85	75,87 $\pm$ 1,81
Пролін	114,00 $\pm$ 3,57	125,26 $\pm$ 5,54	127,13 $\pm$ 3,02*	126,66 $\pm$ 1,41*
Гліцин	322,77 $\pm$ 6,95	328,82 $\pm$ 1,00	328,07 $\pm$ 3,54	327,23 $\pm$ 9,35
Аланін	128,00 $\pm$ 3,51	1 08,44 $\pm$ 5,35*	109,25 $\pm$ 2,34*	110,01 $\pm$ 2,44
Валін	27,93 $\pm$ 2,97	21,86 $\pm$ 0,55*	22,79 $\pm$ 1,82	25,54 $\pm$ 2,52
Метіонін	4,28 $\pm$ 0,56	0,44 $\pm$ 0,25*	0,88 $\pm$ 0,45	0,74 $\pm$ 0,25
Ізолейцин	8,21 $\pm$ 1,22	9,54 $\pm$ 0,44	9,25 $\pm$ 0,73	9,33 $\pm$ 0,27
Лейцин	24,26 $\pm$ 0,65	22,89 $\pm$ 0,30	24,03 $\pm$ 1,00	22,75 $\pm$ 1,43
Тирозин	2,49 $\pm$ 0,48	2,33 $\pm$ 0,42	2,34 $\pm$ 0,19	2,46 $\pm$ 0,13
Фенілаланін	13,27 $\pm$ 0,44	11,58 $\pm$ 0,44*	11,67 $\pm$ 0,21*	10,90 $\pm$ 0,67*
Гідроксилізін	5,86 $\pm$ 0,22	5,19 $\pm$ 0,34	6,12 $\pm$ 0,98	5,33 $\pm$ 0,40

*– $p < 0,05$ щодо контролю; **– $p < 0,05$ щодо дослідної групи II (у групі III)

Ураховуючи вірогідне зниження вмісту фенілаланіну в колагені I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена, незалежно від забезпеченості раціону білком, було цікавим з'ясування залежності цього параметра від екзогенного навантаження фенілаланіном.

Результати вивчення впливу навантаження фенілаланіном на фоні безбілкового раціону на амінокислотний склад колагену I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена (дослідна група III) свідчать, що введення підвищених кількостей даної амінокислоти приводить до суттєвої нормалізації якісного складу даного сполучнотканинного білка. Вірогідні відмінності відмічено лише за вмістом 3 амінокислот: знижувався вміст серину (на 23 %) і фенілаланіну (на 18 %), одночасно зростав вміст проліну (на 11 %). До того ж, введення фенілаланіну вело до вірогідного послаблення змін щодо серину порівняно з дослідною групою II.

Такий характер змін свідчить, що навантаження фенілаланіном на фоні безбілкового раціону здатне нормалізувати якісні зміни в амінокислотному складі колагену I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена. Той факт, що екзогенним введенням фенілаланіну не вдається компенсувати зміни вмісту даної амінокислоти у складі колагену, цілком узгоджується з даними інших авторів щодо великого ступеня незалежності кількості вільного внутрішньоклітинного фенілаланіну, який використовується для синтезу білка, від факторів харчування [5], на відміну від вмісту інших амінокислот.

Таким чином, екзогенний фенілаланін здатний виступати в якості регулятора якісних змін у структурі сполучнотканинних білків за умов розвитку неопластичного процесу.

Висновки. 1. Проведені дослідження показали здатність навантаження раціону фенілаланіном суттєво нормалізувати якісні зміни у колагені I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена. 2. Екзогенне навантаження раціону фенілаланіном у ході формування пухлин не дозволяло повністю компенсувати зниження вмісту даної амінокислоти в складі колагену за умов розвитку неопластичного процесу.

1. Нефедов Л.И., Угляница К.Н., Солдатов В.С. и др. // Весті АН Бєларусі. Сер. біял. наук. – 1998. – № 4. – С. 61–69.
2. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Заутка М.У., Безверхая И.С. Аминокислоты в медицине. – Киев, 1982.
3. Donlon J., Fallon B., Barrett P. et al. // Biochem. Soc. Trans. – 1998. – Vol. 26, № 1. – S. 64.
4. Thorpe J.M., Roberts S.A., Ball R.O., Penchatz P.B. // FASEB J. – 1997. – Vol. 11, № 3. – P. 149.
5. Zhang X.-J., Chinkes D.L., Doyle D., Wolfe R.R. // Amer. J. Physiol. – 1998. – Vol. 274, № 3, Pt. 1. – P. 484–492.
6. Trelstad R.L., Catanese V.M., Rubin D.T. // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 71, № 1. – P. 114–118.
7. Маурер Г. Диск-электрофорез. – М., 1971.
8. Бенсон Д.В., Патерсон Д.А. // Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. – М., 1974. – С. 9–84.
9. Ramachandran G.N. Biochemistry of collagen. – New York; London, 1976.
10. Loeser R.F., Walling R. // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266, № 14. – P. 9459–9462.
11. Kofford M.W., Schwartz L.B., Schechter N.M. et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, № 11. – P. 7127–7131.

Надійшла до редколегії 29.09.04