



Дія L-глутамінової кислоти на зміни біохімічних показників щурів, інтоксикованих тетрахлорметаном

Н. О. Салига

ynosyt@yahoo.com

Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Наведено результати досліджень впливу введення L-глутамінової кислоти (L-Glu) на динаміку окремих біохімічних показників організму щурів за їх інтоксикації тетрахлорметаном (CCl_4). У тканинах і крові щурів досліджували зміни активностей аланін- та аспартат-амінотрансфераз (АлАТ, АсАТ). У крові дослідних тварин також визначали концентрації креатиніну, триацилгліцеролу та холестеролу. Внутрішньоочеревинне введення щурам дослідних груп CCl_4 призвело до змін у крові тварин досліджуваних показників — підвищення активностей амінотрансфераз, триацилгліцеролу та холестеролу. Водночас спостерігали зниження активностей АлАТ у тканинах міокарда та селезінки інтоксикованих тварин, АсАТ — у їхньому мозку, встановлено підвищення активності АлАТ у тканинах легень та підвищення активності АсАТ у тканинах селезінки. У свою чергу, за додаткового введення L-Glu тваринам, інтоксикованим тетрахлорметаном, спостерігали пом'якшення або відсутність змін більшості досліджуваних показників, а саме у крові активність АсАТ коливалася у межах контрольних значень, а концентрації триацилгліцеролу та холестеролу L-Glu не змінювались порівняно з контролем. Також за дії досліджуваної амінокислоти не було виявлено змін в активностях АлАТ у тканинах легень та АсАТ у тканинах селезінки. Отримані результати вказують на корегуючий вплив L-Glu на фізіолого-біохімічні параметри організму щурів за їх інтоксикації тетрахлорметаном.

Ключові слова: L-глутамінова кислота, щурі, кров, CCl_4 , АлАТ, АсАТ

Потенційна небезпека для організму ссавців від впливу техногенних чинників зумовлена, зокрема, активацією вільнорадикальних реакцій, виникненням тканинної гіпоксії та порушенням детоксикаційної функції печінки. Тетрахлорметан (CCl_4) — токсична органічна речовина штучного походження, добре відома у науковій практиці як модельна сполука для вивчення ураження паренхіматозних клітин печінки [7, 10, 12, 13]. За структурою це хлорований вуглеводень. Механізми токсичності CCl_4 значною мірою полягають в активізації процесів пероксидного окиснення ліпідів, інтенсивного утворення вільних радикалів і, як наслідок, порушення про-/антиоксидантної рівноваги [2, 15]. Вільні радикали зв'язуються з антиоксидантними ензимами, зокрема сульфгідрильними групами GSH. Зрештою вони призводять до пошкодження клітин, виснаження клітинного АТФ, гепатотоксичних пошкоджень, порушення гомеостазу кальцію, запалення, фіброзу тощо [5, 8].

Відомо, що CCl_4 метаболізується у печінці за допомогою цитохрому P450, перетворюючись на трихлор-

метильний радикал (CCl_3) [3, 6, 21, 22]. Згодом цей радикал реагує з нуклеїновими кислотами, протеїнами та ліпідами, тим самим впливаючи на ключові клітинні процеси. Внаслідок цього порушується ліпідний обмін, що може проявлятися у формі жирової дистрофії та стеатозу, відбувається зниження кількості протеїну [14, 18].

Впродовж останніх десятиліть досягнуто значного прогресу та отримано нові дані про важливу роль глутамінової кислоти у контролі різних клітинних функцій. L-Glu відіграє центральну роль в амінокислотному обміні, бере активну участь у метаболічних та біосинтетичних шляхах усіх живих організмів [11, 19, 20, 23]. Ця амінокислота є ключовим метаболітом клітинного енергетичного обміну [1, 4, 9, 16]. L-Glu необхідна для виведення надлишку аміаку, модуляції експресії генів, імунних реакцій, регулювання рівня глюкози в крові, сигналізації клітин, видалення надлишку азоту. З іншого боку, глутамінова кислота є попередником великої кількості біологічно активних компонентів — таких, як пуринові та піримідинові нуклео-

тиди, γ -аміномасляна кислота, відновлений глутатіон. Гомеостаз відновленого глутатіону (GSH) життєво важливий для клітинного захисту від оксидативного стресу, оскільки GSH регулює окисно-відновний стан клітин і бере участь у процесі детоксикації у всіх типах клітин [11, 17]. Попри велику кількість робіт та отриманих нових даних щодо різних аспектів дії L-Glu, багато питань щодо впливу цієї амінокислоти залишаються недослідженими. Тому вивчення впливу L-Glu на організм тварин з метою пом'якшення наслідків дії CCl_4 було предметом наших досліджень.

Матеріали і методи

Дослідження було проведено на самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар масою 200–220 г. Тварин утримували в клітках за стандартизованих лабораторних умовах з 12-годинним циклом освітлення. Всім щурам було забезпечено вільний доступ (*ad libitum*) до стандартного збалансованого гранульованого корму для гризунів і води. Через 1 тиждень акліматизації щурів розподілили на три групи — дві експериментальні й одну контрольну. Тривалість періоду дослідження становила 24 год. Тваринам першої (Д1) та другої (Д2) дослідних груп внутрішньоочеревинно вводили CCl_4 в дозі 3,5 мг/кг. Після цього щурі другої дослідної групи додатково отримували внутрішньоочеревинно водний розчин L-Glu в дозі 750 мг/кг. Щурам контрольної групи вводили відповідну кількість фізіологічного розчину. Після закінчення експериментального періоду здійснювали евтаназію, після чого тварин декапітували. Протягом проведення усіх досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Матеріалом для досліджень були кров та тканини нирок, селезінки, мозку, печінки, легень і міокарду лабораторних щурів. У плазмі/сироватці крові визначали концентрацію загального протеїну, креатиніну, триацилгліцеролу, холестеролу, що здійснювали за допомогою біохімічного аналізатора *Humalyzer 2000*. Активність аспартатамінотрансферази (АсАТ) (КФ 2.6.1.1) та аланінамінотрансферази (АлАТ) (КФ 2.6.1.2) у тканинах визначали уніфікованим динітрофенілгідрозинним методом Райтмана-Френкеля, застосовуючи стандартні набори реактивів фірми *Simko Ltd.* (Чехія). Цей метод базується на тому, що після додавання до сироватки крові 2,4-дифенілгідрозинового реактиву відбувається переамінування, утворення глутамінової та піровиноградної кислот (АсАТ) або глутамінової та щавлевооцтової кислот (АлАТ) і субстрат забарвлюється у відповідний колір, інтенсивність якого пропорційна активності ензиму. Інтенсивність забарвлення

субстрату визначали за допомогою спектрофотометра *Unico* (США).

Отримані експериментальні дані були проаналізовані з використанням статистичних методів ANOVA. У всіх випадках вірогідні відмінності розглядалися за значенням $P < 0,05$.

Результати й обговорення

АлАТ та АсАТ є основними ензимами, які беруть участь у протеїновому обміні. Водночас їх також вважають важливою ланкою між вуглеводневими та протеїновими обмінними процесами. Амінотрансферази каталізують взаємоперетворення амінокислот і α -кетокислот переносом аміногрупи. L-Glu посідає центральне місце у цих взаємоперетвореннях, оскільки ця амінокислота у тканинах ссавців може найшвидше піддаватися окиснювальному дезамінуванню. Про функціональний стан печінки можна судити, зокрема, за змінами активності АлАТ. Цей ензим каталізує реакцію між L-аланіном і 2-оксоглутаратом, у результаті якої вони перетворюються в L-глутамат і сіль піровиноградної кислоти.

Як видно з отриманих результатів (рис. 1), активність АлАТ у тканинах селезінки тварин Д1 була нижчою ($P \leq 0,05$) порівняно з тваринами контрольної групи. Варто відзначити вірогідне підвищення активності цього ензиму у тканині легень тварин цієї ж дослідної групи, яка зазнала інтоксикації CCl_4 без додаткового застосування L-Glu.

АсАТ є одним з важливих маркерів функціонального стану серцевого м'яза. Як видно з результатів наших досліджень, представлених на рис. 2, активність АсАТ, яка каталізує реакцію між L-аспартатом і 2-оксоглутаратом, у результаті якої вони перетворюються в L-глутамат і оксалоацетат, також зазнала вірогідних змін у відповідь на введення досліджуваного токсиканту. Зокрема, активність АсАТ знижувалась у тканинах мозку тварин обох дослідних груп ($P \leq 0,05$). При гострих ураженнях тканин печінки АсАТ швидко зростає. Проте через 24–48 год., особливо якщо патологічний процес продовжує травмувати печінку, рівень АлАТ стає вищим, ніж АсАТ, через тривалий період його напіввиведення. Зниження активності АсАТ може бути пов'язане зокрема з дефіцитом вітаміну B_6 , який активно використовується, коли організм зазнає оксидативного стресу. Варто зауважити вірогідне зростання ($P \leq 0,05$) активності цього ензиму в тканині селезінки тварин CCl_4 -інтоксикованої групи порівняно з контролем. Підвищений рівень АсАТ за стресу може бути ознакою інтенсифікації шляхів перетворення токсичних метаболітів у циклі трикарбонових кислот. Що стосується тварин Д2, які додатково отримували L-Glu, активність АсАТ у їхніх тканинах була практично на одному рівні з контрольною групою тварин. Можна припустити, що досліджувана амінокислота допомагає згладити негативний

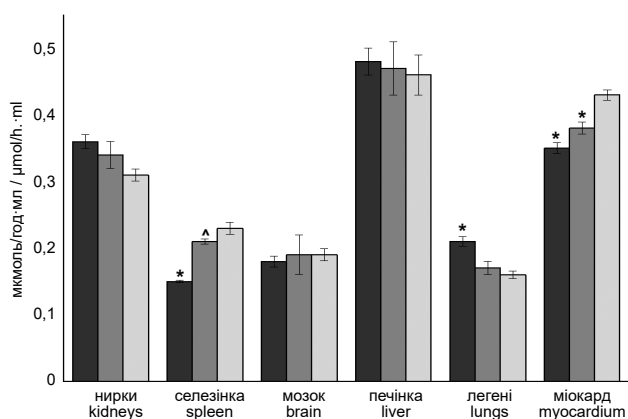


Рис. 1. Вплив L-Glu на активність АлАТ у тканинах щурів за дії CCl_4
Fig. 1 Effect of L-Glu on the ALAT activity in tissues of rats treated with CCl_4

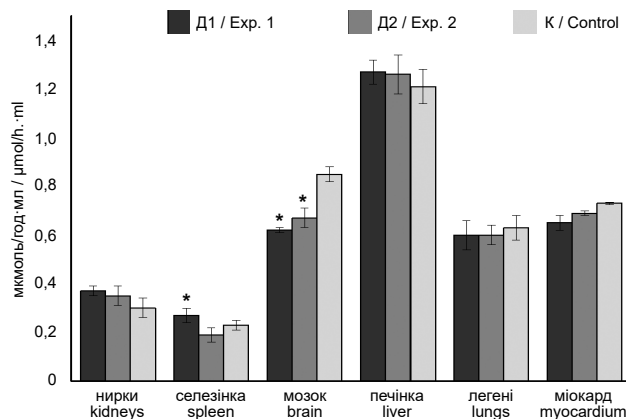


Рис. 2. Вплив L-Glu на активність АсАТ у тканинах щурів за дії CCl_4
Fig. 2 Effect of L-Glu on the ASAT activity in tissues of rats treated with CCl_4

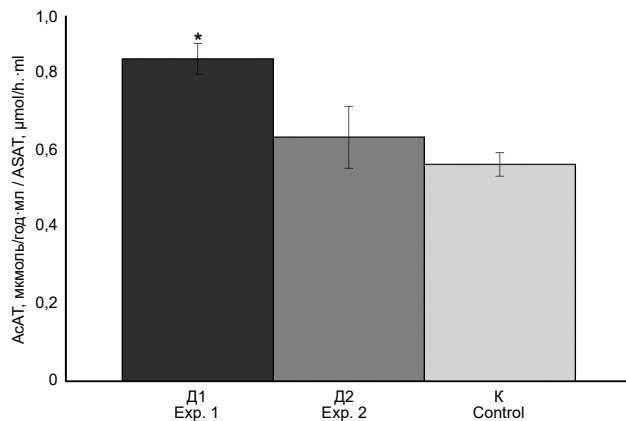
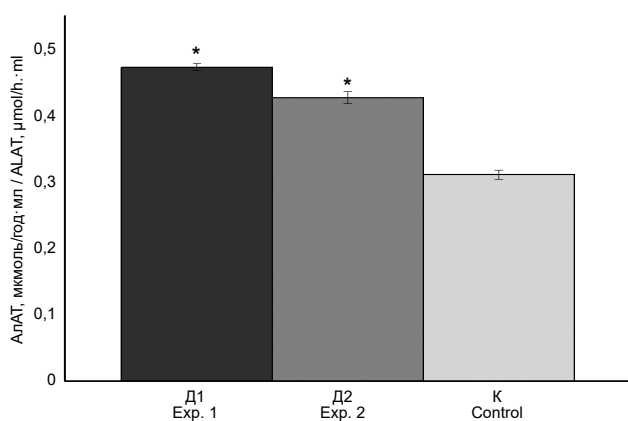


Рис. 3. Вплив L-Glu на активність АлАТ та АсАТ у крові щурів за дії CCl_4
Fig. 3 Effect of L-Glu on the ALAT and ASAT activity in the blood of rats treated with CCl_4

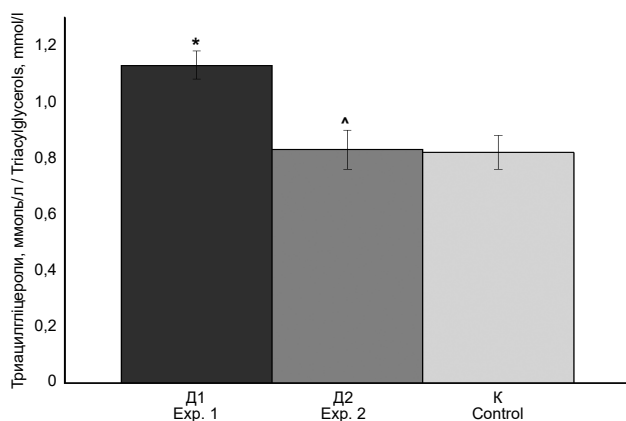
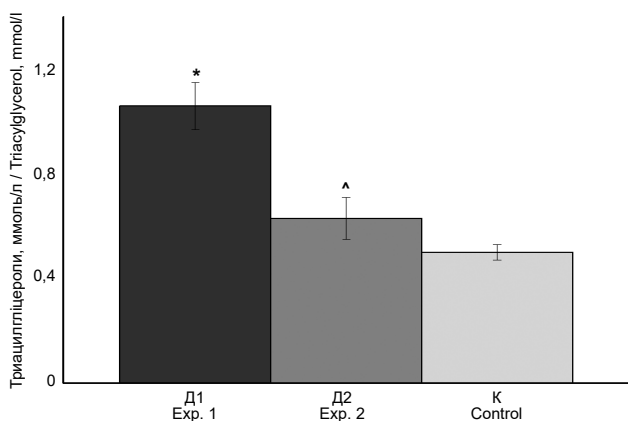


Рис. 4. Вплив L-Glu на концентрацію триацилгліцеролу та холестеролу у крові щурів за дії CCl_4
Fig. 4. Effect of L-Glu on the concentration of triacylglycerol and cholesterol in the blood of rats treated with CCl_4

Примітка. * — вірогідність відмінностей у значеннях показників між контрольною та дослідними групами тварин ($P < 0.05$);
 ^ — вірогідність відмінностей у значеннях показників між першою дослідною та дослідними групами тварин ($P < 0.05$).

Note. * — significantly different from the respective control group with $P < 0.05$;
 ^ — significantly different from the respective first experimental group with $P < 0.05$.

вплив CCl_4 . Варто вказати на відсутність змін активностей АлАТ і АсАТ у тканинах печінки.

Було виявлено вищу активність АлАТ ($P \leq 0,05$) у крові тварин обох дослідних груп у відповідь на введення CCl_4 стосовно контролю (рис. 3). Можна припустити, що зростання активності досліджуваного ензиму може свідчити про ймовірний вихід ензимів у кров'яне русло з пошкоджених клітин тканин організму внаслідок деструктивної дії CCl_4 на фосфоліпідні клітинних мембран.

Відомо, що протеїновий обмін є інтеграційною ланкою всіх систем організму. Результати наших досліджень показали, що вміст загального протеїну у плазмі крові щурів двох дослідних груп вірогідно не змінювався у порівнянні з контролем (табл.). Концентрація креатиніну в плазмі крові є важливим показником функції нирок. Це кінцевий продукт обміну протеїнів, який виводиться з організму з сечею. Креатинін бере активну участь в енергетичному обміні м'язової та інших тканин. Як показали результати досліджень (табл.), концентрація креатиніну, подібно до загального протеїну, не зазнавала змін у дослідних групах тварин стосовно контролю.

Таблиця. Концентрація загального протеїну та креатиніну у крові щурів за дії L-Glu

Table. The concentration of total protein and creatinine in the blood of rats under the action of L-Glu

Група тварин Groups of animals	Загальний протеїн, г/л Total protein, g/l	Креатинін, мкмоль/л Creatinine, $\mu\text{mol/l}$
Д1 / Exp. 1	55,78 \pm 2,10	70,65 \pm 2,34
Д2 / Exp. 2	54,62 \pm 1,87	72,47 \pm 2,42
К / Control	57,45 \pm 1,37	74,05 \pm 2,92

Ліпіди є головними структурними компонентами біомембран клітин, а також виконують в організмі інші важливі функції. До нейтральних ліпідів відносять, зокрема, триацилгліцероли. Як показали результати наших досліджень (рис. 4), концентрація триацилгліцеролу у плазмі крові щурів першої дослідної групи, які зазнали інтоксикації CCl_4 була вірогідно вищою ($P \leq 0,05$) порівняно з тваринами контрольної та другої дослідної групи.

Холестерол виконує важливі структурні та регуляторні функції, входячи до складу біомембран та виступаючи попередником у синтезі фізіологічно активних сполук різних класів. Відомо, що вільний холестерол впливає на проникність мембран, забезпечує їхню ультраструктуру і функціональну активність. Збільшення кількості холестеролу (рис. 4), яке спостерігали за дії CCl_4 у тварин першої дослідної групи ($P \leq 0,05$), переважно супроводжується зниженням проникності мембрани, інгібуванням більшості ліполітичних ензимів.

Висновки

Узагальнюючи викладені вище результати, варто зазначити про виражені зміни окремих біохімічних показників у крові білих щурів за впливу інтоксикації CCl_4 . Зокрема, вірогідно зростала активність АлАТ та АсАТ, вміст триацилгліцеролів та холестеролу у крові тварин Д1 щодо контролю. Наші результати показують, що застосований ксенобіотик впливає на мозок, міокард, селезінку та легені, змінюючи у ту чи іншу сторону активність АлАТ та АсАТ порівняно з контрольною групою тварин. L-Glu проявляла пом'якшувальний ефект на досліджувані показники, наближаючи їх до рівня контрольних значень.

Перспективи подальших досліджень

Експериментальні дослідження щодо дії L-Glu розкривають перспективи подальшого вивчення впливу цієї амінокислоти на організм за дії токсичних чинників, здатних викликати оксидативний стрес.

- Albaracin SL, Baldeon ME, Sangronis E, Petruschina AC, Reyes FGR. L-glutamate: a key amino acid for sensory and metabolic functions. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2016; 66 (2): 101–112. PMID: 29737666.
- Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Faddah LM, Mohamed AM, Mohammad RA, Al-Amin M. Potential impact of silymarin in combination with chlorogenic acid and/or melatonin in combating cardiomyopathy induced by carbon tetrachloride. *Saudi J. Biol. Sci.* 2014; 21 (3): 265–274. DOI: 10.1016/j.sjbs.2013.09.006.
- Boll M, Weber LW, Becker E, Stampfl AZ. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z. Naturforsch.* 2001; 56 (7–8): 649–659. DOI: 10.1515/znc-2001-7-826.
- Cynober L. Metabolism of dietary glutamate in adults. *Ann. Nutr. Metab.* 2018; 73 (5): 5–14. DOI: 10.1159/000494776.
- Deniz GY, Laloglu E, Koc K, Geyikoglu F. Hepatoprotective potential of *Ferula communis* extract for carbon tetrachloride induced hepatotoxicity and oxidative damage in rats. *Biotech Histochem.* 2019; 94 (5): 334–340. DOI: 10.1080/10520295.2019.1566831.
- Dutta S, Chakraborty AK, Dey P, Kar P, Guha P, Sen S, Kumar A, Sen A, Chaudhuri TK. Amelioration of CCl_4 induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. *PLoS One.* 2018; 3 (4): e0196411. DOI: 10.1371/journal.pone.0196411.
- Ernst L, Zieglerowski L, Schulz M, Moss M, Meyer M, Weiskirchen R, Palme R, Hamann M, Talbot SR, Tolba RH. Severity assessment in mice subjected to carbon tetrachloride. *Sci. Rep.* 2020; 10: 15790. DOI: 10.1038/s41598-020-72801-1.
- Hamed H, Gargouri M, Bellassoued K, Ghannoudi Z, Elfeki A, Gargouri A. Cardioprotective effects of camel milk against carbon tetrachloride induced oxidative stress, biochemical and histological alterations in mice. *Arch. Physiol. Biochem.* 2018; 124 (3): 253–260. DOI: 10.1080/13813455.2017.1395889.
- Hou Y, Wu G. L-glutamate nutrition and metabolism in swine. *Amino Acids.* 2018; 50: 1497–1510. DOI: 10.1007/s00726-018-2634-3.
- Li R, Zhang P, Li C, Yang W, Yin Y, Tao K. Tert-butylhydroquinone mitigates carbon tetrachloride induced hepatic injury in mice. *Int. J. Med. Sci.* 2020; 17 (14): 2095–2103. DOI: 10.1515/ijms.45842.
- Magi S, Piccirillo S, Amoroso S. The dual face of glutamate: from a neurotoxin to a potential survival factor — metabolic implications

- in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019; 76: 1473–1488. DOI: 10.1007/s00018-018-3002-x.
12. McGill MR, Jaeschke H. Animal models of drug-induced liver injury. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019; 1865 (5): 1031–1039. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.08.037.
 13. Nevzorova YA, Boyer-Diaz Z, Cubero FJ, Gracia-Sancho J. Animal models for liver disease — A practical approach for translational research. *J. Hepatol.* 2020; 73 (2): 423–440. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.04.011.
 14. Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Kuwagata M, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y. Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl₄. *Toxicol. Rep.* 2020; 7: 685–692. DOI: 10.1016/j.toxrep.2020.05.002.
 15. Pergel A, Tümkaya L, Çolakoğlu MK, Demiral G, Kalcan S, Özdemir A, Mercantepe T, Yılmaz A. Effects of infliximab against carbon tetrachloride-induced intestinal injury via lipid peroxidation and apoptosis. *Hum. Exp. Toxicol.* 2019; 38 (11): 1275–1282. DOI: 10.1177/0960327119867758.
 16. Salyha N. Effects of L-glutamic acid and pyridoxine on glutathione depletion and lipid peroxidation generated by epinephrine-induced stress in rats. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90 (4): 102–110. DOI: 10.15407/ubj90.04.102.
 17. Salyha NO. Effect of glutamic acid and cysteine on oxidative stress markers in rats. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92 (6): 165–172. DOI: 10.15407/ubj92.06.165.
 18. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab. Anim.* 2015; 49 (1): 4–11. DOI: 10.1177/0023677215571192.
 19. Tabassum S, Ahmad S, Madiha S, Shahzad S, Batool Z, Sadir S, Haider S. Free L-glutamate-induced modulation in oxidative and neurochemical profile contributes to enhancement in locomotor and memory performance in male rats. *Sci. Rep.* 2020; 10: 11206. DOI: 10.1038/s41598-020-68041-y.
 20. Tomé D. The roles of dietary glutamate in the intestine. *Ann. Nutr. Metab.* 2018; 73 (5): 15–20. DOI: 10.1159/000494777.
 21. Ustuner D, Colak E, Dincer M, Tekin N, Burukoglu Donmez D, Akyuz F, Colak E, Kolaç U, Entok E, Ustuner MC. Posttreatment effects of *Olea europaea* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress in rats. *J. Med. Food.* 2018; 21 (9). DOI: 10.1089/jmf.2017.0143.
 22. Li X, Liu X, Zhang Y, Cheng C, Fan J, Zhou J, Garstka MA, Li Z. Hepatoprotective effect of apolipoprotein A4 against carbon tetrachloride induced acute liver injury through mediating hepatic antioxidant and inflammation response in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021; 534: 659–665. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.11.024.
 23. Xue H, Field CJ. New role of glutamate as an immunoregulator via glutamate receptors and transporters. *Front Biosci.* 2011; 3 (3): 1007–1020. DOI: 10.2741/205.

L-glutamic acid effect on changes in biochemical parameters of rats intoxicated by carbon tetrachloride

N. O. Salyha

ynosyt@yahoo.com

Institute of Animal Biology NAAS,
38 V. Stus str., Lviv, 79034, Ukraine

This study aims to explore the ameliorative effects of L-glutamic acid (L-Glu) against carbon tetrachloride (CCl₄) toxicity in male rats. Changes in the activities of alanine and aspartate aminotransferases (ALAT, ASAT) were studied in the tissues and blood of rats. Concentrations of creatinine, triacylglycerol and cholesterol were also determined in the blood of experimental animals. Intraperitoneal administration of CCl₄ to rats led to changes in the blood of animals of the studied parameters — an increase of the activities of aminotransferases, triacylglycerol and cholesterol levels. At the same time, a decrease of ALAT activity was observed in the tissues of the myocardium and spleen of intoxicated animals, ASAT in their brain, and in the tissues of the lungs there was an increase in the activity of ALAT and the growth of ASAT in the tissues of the spleen. In turn, with additional administration to animals intoxicated with tetrachloromethane L-Glu mitigation or no change in most of the studied indicators was observed, namely, in the blood the activity of ASAT fluctuated within the control values, and the concentrations of triacylglycerol and cholesterol did not change compared to the control. Also under the action of the studied aminoacid, no changes were detected in the activities of ALAT in lung tissue and ASAT in spleen tissue. The obtained results indicate a corrective effect of L-Glu on the physiological and biochemical parameters of rats in their intoxication with carbon tetrachloride.

Keywords: L-glutamic acid, rats, blood, CCl₄, ALAT, ASAT