

## Порушення амінокислотного пулу сироватки крові у хворих із цирозом печінки

О. П. Балаж

Ужгородський національний університет

## Blood serum amino acid pool violation of in patients with liver cirrhosis

O. P. Balazh

Uzhgorod National University

### Реферат

**Мета.** Дослідити зміни амінокислотного пулу сироватки крові у хворих із цирозом печінки.

**Матеріали і методи.** У дослідженні взяли участь 95 хворих із цирозом печінки. У 1-й групі (клас А тяжкості захворювання за Child–Pugh) було 18 (18,95%) хворих, у 2-й групі (клас В) – 25 (26,3%), у 3-й групі (клас С) – 52 (54,7%) хворих. Кількість вільних амінокислот у сироватці крові визначали за методом обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії в ізократичному режимі елювання з електрохімічним детектуванням.

**Результати.** У хворих із цирозом печінки виявили порушення резервів вільних амінокислот з переважним накопиченням ароматичних амінокислот: фенілаланіну – (162,45 ± 14,12) нмоль/мл, тирозину – (99,05 ± 10,07) нмоль/мл, триптофану – (76,10 ± 12,40) нмоль/мл, а також збільшення вмісту проліну, лізину, цистеїну (p < 0,05). Паралельно з цим спостерігали зниження рівнів вільних амінокислот сироватки крові з розгалуженим бічним ланцюгом: валіну – до (150,10 ± 8,92) нмоль/мл, лейцину – до (75,14 ± 5,12) нмоль/мл (p < 0,05) та ізoleyцину – до (80,40 ± 8,01) нмоль/мл.

**Висновки.** Встановлено залежність між II ступенем дисбіозу товстої кишки та збільшенням рівнів триптофану (r = 0,77; p < 0,01). Дисбіоз товстої кишки III ступеня корелював із збільшенням рівнів фенілаланіну (r = 0,71; p < 0,01). У пацієнтів 2-ї групи, зокрема, встановлена залежність між рівнями триптофану і II ступенем дисбіозу кишечника (r = 0,58; p < 0,01) та рівнями тирозину і фенілаланіну і III ступенем дисбіозу кишечника.

**Ключові слова:** цироз печінки; амінокислотний пул; дисбіоз кишечника.

### Abstract

**Objective.** To investigate serum amino acid pool changes in patients with liver cirrhosis.

**Materials and methods.** 95 patients with liver cirrhosis were participated in the study. In the 1st group (class A disease severity according to Child–Pugh score) there were 18 (18.95%) patients, in the 2nd group (class B) – 25 (26.3%), in the 3rd groups (class C) – 52 (54.7%) patients. The amount of free amino acids in blood serum was determined by reversed–phase high–performance liquid chromatography in isocratic elution mode with electrochemical detection.

**Results.** Violations of free amino acid reserves were revealed in patients with cirrhosis of the liver with a predominant accumulation of aromatic amino acids: phenylalanine – (162.45 ± 14.12) nmol/ml, tyrosine – (99.05 ± 10.07) nmol/ml, tryptophan – (76.10 ± 12.40) nmol/ml, as well as an increase in the content of proline, lysine, cysteine (p < 0.05). In parallel, the decreasing of free serum amino acids with branched side chain levels were observed: valine – up (150.10 ± 8.92) nmol/ml leucine – up (75.14 ± 5.12) nmol/ml (p < 0.05) and isoleucine – up to (80.40 ± 8.01) nmol/ml.

**Conclusions.** The correlation between the second degree of thick guts dysbiosis and increased levels of tryptophan was determined (r = 0.77; p < 0.01). III degree thick dysbiosis was correlated with increasing levels of phenylalanine (r = 0.71; p < 0.01). In patients of 2nd group the correlations between levels of tryptophan and II degree of intestinal dysbiosis (r = 0.58; p < 0.01) and the levels of tyrosine in phenylalanine in III stage intestinal dysbiosis were detected.

**Keywords:** liver cirrhosis; amino acid pool; intestinal dysbiosis.

На сьогодні однією з найактуальніших проблем гепатології є своєчасні діагностика та терапія хронічних захворювань печінки [1, 2]. Із гастроентерологічних захворювань терапевти, гастроентерологи і хірурги найчастіше стикаються саме з цирозом печінки (ЦП) та його ускладненнями [3, 4].

Незважаючи на різноманітність етіологічних чинників (вірусний, алкогольний, токсичний тощо), структурні і функціональні порушення в печінці дуже схожі, тому їх прогресування звичайно закінчується формуванням ЦП

та печінкової недостатності. Останні складно не тільки діагностувати, а й лікувати, оскільки печінка відіграє провідну роль у метаболічних процесах, її ураження відображається на функції інших органів [3 – 5].

Головними реакціями перетворення амінокислот (АК) в печінці є їх взаємоперетворення, розпад вуглеводного скелету з виділенням енергії та забезпечення глюконеогенезу реакціями трансамінування та окислювального дезамінування. Серед механізмів підтримки рівноваги між представниками «шкідливих» та «корисних» АК у хворих

із ЦП вирішальне значення має біосинтез сечовини, що цілком відбувається в печінці в циклі Кребса [6, 7].

Порушення детоксикаційної функції товстої кишки сприяє збільшенню рівнів азотовмісних АК в організмі, які, оминаючи порталну систему, безпосередньо потрапляють у клітини головного мозку і сприяють розвитку клінічних ознак печінкової енцефалопатії (ПЕ) [5, 6]. У лікуванні хворих із ЦП одне з центральних місць займають питання лікування та профілактики ускладнень хвороби, зокрема ПЕ, що виникає в результаті глибоких метаболічних порушень [8].

При різних біохімічних і функціональних змінах у хворих із ЦП в поєднанні з цитотоксичним впливом продуктів обміну на нейрони і гліальні клітини мозку при ПЕ закономірною має бути патологія церебрального кровообігу.

Своєчасне виявлення порушення співвідношення рівня АК сироватки крові на фоні дослідження мікробного складу товстої кишки та їх корекція важливі в першу чергу у лікуванні хворих із ЦП з метою профілактики розвитку ознак ПЕ [9, 10].

Мета дослідження: вивчити зміни амінокислотного пулу сироватки крові у хворих із ЦП.

### Матеріали і методи дослідження

У дослідженні взяли участь 95 хворих із ЦП, які перебували на стаціонарному лікуванні з 2018 до 2020 р. у відділенні анестезіології та інтенсивної терапії, хірургічному та гастроентерологічному відділеннях Закарпатської обласної клінічної лікарні імені Андрія Новака (м. Ужгород). Критеріями виключення з дослідження хворих були ЦП вірусної етіології, первинний біліарний цироз, рак печінки, хвороба Бадда–Кіарі. Вік обстежених хворих коливався від 28 до 65 років, середній вік становив  $(42,1 \pm 6,8)$  року. Контрольну групу склали 15 практично здорових осіб віком від 26 до 59 років, середній вік яких становив  $(42,2 \pm 3,4)$  року. Чоловіків було 9 (60,0%), жінок – 6 (40,0%). Хворих із ЦП розподілили на групи за класами тяжкості захворювання відповідно до класифікації Child–Pugh. У 1–шу групу (клас А – стадія компенсації) увійшло 18 (18,95%) хворих, у 2–гу групу (клас В – стадія субкомпенсації) – 25 (26,3%), у 3–тю групу (клас С – стадія декомпенсації) – 52 (54,7%) хворих.

Кількість вільних АК у сироватці крові визначали за методом обернено–фазової високоефективної рідинної хроматографії в ізократичному режимі елюювання з електрохімічним детектуванням [1 – 3].

Методика отримання похідних АК: для переведення досліджуваних сполук у похідні протягом 3 хв у пробірці для мікропроб змішували 25 мкл стандартної суміші АК, 15 мкл реагенту (орто–фталевий ангідрид + 2–меркаптоетанол) та 160 мкл 0,1 М розчину тетраборату натрію. У хроматографічну колонку вводили 20 мкл суміші.

Для отримання похідних із реагентом орто–фталевий ангідрид/сульфіт натрію протягом 25 хв у пробірці для мікропроб змішували 40 мкл стандартної суміші АК, 10 мкл

реагенту орто–фталевий ангідрид/сульфіт натрію і 150 мкл боратного буферу. У хроматографічну колонку вводили 10 мкл суміші.

З метою осадження білків у пробірках для мікропроб змішували 100 мкл сироватки крові та 400 мкл метанолу. Пробу центрифугували впродовж 5 хв при 10 000 обертів. Осад відкидали, а надосадну рідину, яка містила вільні АК, зберігали. Для переведення АК, які містились у сироватці крові, у похідні змішували 20 мкл надосадної рідини, 30 мкл відповідного реагенту та 150 мкл 0,1 М розчину тетраборату натрію. У хроматографічну колонку вводили 10 мкл суміші.

Для хроматографії використовували рідинний хроматограф («Міліхром», Росія) з електрохімічним детектором. Потенціал електрода  $+0,75$  та  $+0,85$  В. Металева колонка ( $250 \times 4,0$  мм) була наповнена сорбентом сферисорб ОДС зернистістю 5 мкм. Рухома фаза містила 18 об. % метанолу, 0,01 М гідрофосфату натрію, 0,01 М дигідрофосфату натрію, 0,002 М ЕДТА (рН 7,0). Коефіцієнт кореляції визначали за допомогою парного методу Пірсона для виявлення зв'язків між отриманими показниками у програмі Jamovi 1.6.14.

### Результати

У хворих із ЦП на фоні змін кількісного та якісного складу мікрофлори товстої кишки спостерігали порушення співвідношення резервів вільних АК у сироватці крові.

При дослідженні амінокислотного пулу у хворих із ЦП виявили порушення співвідношення резервів вільних АК з переважним накопиченням ароматичних амінокислот: фенілаланіну – до  $(162,45 \pm 14,12)$  нмоль/мл, тирозину – до  $(99,05 \pm 10,07)$  нмоль/мл, триптофану – до  $(76,10 \pm 12,40)$  нмоль/мл, збільшення вмісту проліну до  $(244,00 \pm 30,01)$  нмоль/мл, лізину до  $(379,12 \pm 25,41)$  нмоль/мл, цистеїну до  $(234,77 \pm 23,56)$  нмоль/мл ( $p < 0,05$ ), а також метіоніну до  $(35,55 \pm 4,57)$  нмоль/мл.

Паралельно з цим спостерігали зниження рівнів вільних АК сироватки крові з розгалуженим бічним ланцюгом: валіну – до  $(150,10 \pm 8,92)$  нмоль/мл, лейцину – до  $(75,14 \pm 5,12)$  нмоль/мл ( $p < 0,05$ ) та ізолейцину – до  $(80,40 \pm 8,01)$  нмоль/мл. Також спостерігали статистично значуще зменшення вмісту серіну до  $(83,66 \pm 5,71)$  нмоль/мл, глутаміну – до  $(476,20 \pm 44,00)$  нмоль/мл, аланіну – до  $(324,77 \pm 23,25)$  нмоль/мл ( $p < 0,05$ ) та гістидіну, аргініну, аспарагіну, гліцину, треоніну ( $p > 0,05$ ) в сироватці крові.

Ці зміни пояснюються вираженим зниженням індивідуальної деградації АК, включенням їх у біосинтез білка в тканинах, особливо в синтез альбуміну в тканинах печінки, а також зменшенням ролі аргініну в сечовиноутворенні у хворих із ЦП.

Найбільш виражені зміни амінокислотного пулу крові виявили у хворих 2–ї і 3–ї груп, а саме переважне зменшення вмісту АК з розгалуженим бічним ланцюгом, що позитивно впливають на організм людини (табл. 1).

Найменші рівні валіну, лейцину й ізолейцину реєстрували у хворих 3–ї групи:  $(137,77 \pm 10,52)$  нмоль/

Таблиця 1. Резерви вільних АК сироватки крові у хворих із ЦП

Амінокислота, нмоль/мл	Група хворих із ЦП		
	1-ша (n=18)	2-га (n=25)	3-тя (n=52)
Орнітин	225,30±21,41	200,05±17,50	199,27±9,15*
Лізин	351,41±33,15	389,21±30,6*	393,15±34,5*
Цистеїн	232,11±28,72	257,12±12,15	261,45±15,1*
Гістидин	78,20±4,41	60,01±5,52*	57,11±3,12*
Аргінін	73,22±4,47	70,11±5,52	69,26±11,10
Аспарагін	7,36±1,45	6,92±0,12	6,85±0,98
Серін	80,50±9,25	85,00±4,40	80,12±9,20
Гліцин	252,10±12,14	231,50±15,00	228,00±15,75
Глутамін	500,36±25,10	462,10±32,5*	458,20±25,5*
Треонін	152,41±9,15	114,50±3,51*	111,26±8,85*
Аланін	333,15±19,82	311,00±10,10	309,11±7,75
Пролін	232,10±41,15	266,17±25,0*	271,10±15,4*
Тирозин	90,00±7,04	108,13±5,56*	112,00±7,75*
Триптофан	69,00±7,70	91,15±4,41*	93,15±6,50*
Метіонін	33,44±7,23	40,25±5,12*	40,41±7,77*
Валін	144,00±9,25	139,45±23,74	137,77±10,52
Фенілаланін	155,50±18,12	178,44±20,20	180,11±32,15
Лейцин	80,80±14,99	63,70±15,41*	61,00±10,5*
Ізолейцин	83,26±7,41	78,02±4,04	77,10±15,44

*Примітка.* \* - відмінності між зазначеним параметром у 1-й та інших групах статистично значущі (p<0,05).

мл, (61,00 ± 10,5) нмоль/мл та (77,10 ± 15,44) нмоль/мл відповідно і у хворих 2-ї групи: (139,45 ± 23,74 нмоль/мл, (63,70 ± 15,41) нмоль/мл та (78,02 ± 4,04) нмоль/мл відповідно. Ці зміни супроводжувалися збільшенням рівнів фенілаланіну, тирозину і триптофану з максимальними показниками у хворих 3-ї групи – до (180,11 ± 32,15) нмоль/мл, (112,00 ± 7,75) нмоль/мл та (93,15 ± 6,50) нмоль/мл відповідно. Процеси обміну АК найменше страждали у хворих 1-ї групи, але у них теж можна було простежити наведену вище закономірність, тобто зменшення рівнів АК з розгалуженим бічним ланцюгом та збільшення рівнів ароматичних АК, що токсично впливають на організм хворих із ЦП, призводячи через різні механізми до формування клінічних проявів ПЕ.

Зниження рівнів АК з розгалуженим бічним ланцюгом пояснюється їх підвищеним руйнуванням у м'язовій і жировій тканинах. Клінічним віддзеркаленням цього є характерне порушення трофологічного статусу у хворих із ЦП: зниження м'язової маси і зменшення жирової тканини, типова для ЦП гіпотрофія м'язів плечового поясу, стоншення шкіри, ураження слизових оболонок, гіпоальбумінемія.

Провівши кореляційний аналіз, ми виявили залежність між II і III ступенями дисбіозу товстої кишки та збільшенням рівнів переважно ароматичних АК у сироватці крові (триптофану, тирозину і фенілаланіну) у хворих із ЦП (табл. 2).

Дослідивши зв'язок між вираженістю амінокислотного дисбалансу та дисбіотичними порушеннями у хворих із ЦП різних груп, відповідну залежність простежили тільки у пацієнтів 2-ї і 3-ї груп. Як у пацієнтів із ЦП загалом,

Таблиця 2. Залежність між показниками вмісту АК у сироватці крові та вираженістю дисбіотичних порушень товстої кишки у хворих із ЦП

Амінокислота	Ступінь дисбіозу товстої кишки	
	II	III
Триптофан	r=0,77; p<0,01	–
Тирозин	–	r=0,51; p<0,02
Фенілаланін	–	r=0,71; p<0,01

так і у пацієнтів 2-ї групи зокрема залежність встановили між рівнем триптофану і II ступенем та рівнями тирозину і фенілаланіну і III ступенем дисбіозу товстої кишки. У хворих 3-ї групи була ідентична залежність між рівнями триптофану і тирозину та дисбіотичними порушеннями, а між рівнями фенілаланіну та дисбіозом II ступеня виявлено характерний зворотний кореляційний зв'язок (табл. 3).

### Обговорення

Організм людини має два основні детоксикаційні органи – печінку, яка захищає організм за допомогою окислювальних реакцій, і травний канал, мікрофлора якого використовує з метою детоксикації гідролітичні відновні процеси. Порушення взаємодії цих систем призводить до взаємних функціональних і структурних змін у них самих і в організмі загалом. Тому гепатоентеральну циркуляцію різних органічних і неорганічних сполук можна без перебільшення зарахувати до основних гомеостатичних механізмів [1 – 3].

Таблиця 3. Залежність між показниками вмісту АК у сироватці крові та вираженістю дисбіотичних порушень у хворих із ЦП 2-ї і 3-ї груп

Амінокислота	Ступінь дисбіозу товстої кишки у хворих 2-ї групи		Ступінь дисбіозу товстої кишки у хворих 3-ї групи	
	II	III	II	III
Триптофан	r=0,58; p<0,01	–	r=0,55; p<0,02	–
Тирозин	–	r=0,43; p<0,02	–	r=0,56; p<0,02
Фенілаланін	–	r=0,61; p<0,05	r=-0,77; p<0,02	–

Пацієнти з ЦП і портальною гіпертензією внаслідок порушення перистальтики, сповільнення швидкості ороцекального транзиту, венозного застою в стінці кишки схильні до розвитку синдрому надмірного бактеріального росту [4, 8, 9].

Зниження здатності до імунного захисту призводить до руйнування ланок захисного слизового бар'єра і підвищення проникності кишкової стінки для мікроорганізмів і компонентів їх стінки [5, 10].

Отже, дисбіоз кишечника розвивається паралельно з дисбалансом АК сироватки крові і в першу чергу проявляється підвищенням вмісту їх ароматичних представників.

#### Висновки

1. Встановлено залежність між II ступенем дисбіозу товстої кишки та збільшенням рівнів триптофану в сироватці крові (r=0,77; p<0,01). Дисбіоз товстої кишки III ступеня корелює із збільшенням рівнів фенілаланіну (r=0,71; p<0,01).

2. У хворих із ЦП загалом і у хворих 2-ї групи зокрема встановлена залежність між рівнями триптофану і II ступенем дисбіозу товстої кишки (r=0,58; p<0,01) та між рівнями тирозину і фенілаланіну і III ступенем дисбіозу товстої кишки.

**Фінансування.** Автори гарантують, що вони не отримували жодних винагород у будь-якій формі, здатних вплинути на результати роботи.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при виконанні наукового дослідження та підготовці даної статті.

#### References

- Chen Y, Guo J, Qian G, Fang D, Shi D, Guo L, Li L. Gut dysbiosis in acute–chronic liver failure and its predictive value for mortality. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Sep;30(9):1429–37. doi: 10.1111/jgh.12932. PMID: 25711972.
- Bajaj JS, Sikaroodi M, Shamsaddini A, Henseler Z, Santiago-Rodriguez T, Acharya C, et al. Interaction of bacterial metagenome and virome in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Gut.* 2020 Sep 30;gutjnl–2020–322470. doi: 10.1136/gutjnl–2020–322470. Epub ahead of print. PMID: 32998876.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):209–18. doi: 10.1172/JCI24282. Erratum in: *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):1100. PMID: 15690074; PMCID: PMC546435.
- Orloff MJ, Bell RH Jr, Orloff MS, Hardison WG, Greenburg AG. Prospective randomized trial of emergency portacaval shunt and emergency medical therapy in unselected cirrhotic patients with bleeding varices. *Hepatology.* 1994 Oct;20(4 Pt 1):863–72. doi: 10.1002/hep.1840200414. PMID: 7927227.
- Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol.* 2014 Dec;61(6):1385–96. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.010. Epub 2014 Aug 15. PMID: 25135860.
- Nedashkivskyi SM. Drug-induced liver damage: principles of diagnosis, pathological changes and treatment approaches. *Emergency Medicine.* 2019;(2):63–70. Ukrainian. DOI: 10.22141/2224–0586.2.97.2019.161644.
- Meldekhanov TT, Imanbekova JA, Kuttybaev AD, Terlikbaeva GA. Hepatic encephalopathy: cognitive dysfunction, clinical manifestations, pathogenesis, pathophysiological principles of therapy. *Vestnik KazNMU.* 2019;(1):261–6. Kazakh.
- Dam-Larsen S, Franzmann M, Christoffersen P, Larsen K, Becker U, Bendtsen F. Histology and prognosis in fatty liver patients. *J Hepatol.* 2004;40(Suppl 1):170. doi:10.1016/S0168–8278(04)90581–8.
- Rusyn VI, Sirchak EU, Koval GM, Malyar–Gazda NM, Petrychko OI. Hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. Kharkiv: Golden Pages; 2015. 165 p. Ukrainian. ISBN 978–966–400–328–2.
- Sirchak YeS, Griga VI, Pichkar YoI, Gema–Bagina NM. Correction of Colon Dysbiosis in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Ukr J Med Biol Sport.* 2019;4(5):186–91. Ukrainian. doi: 10.26693/jmbs04.05.186.

Надійшла 17.12.2020