УДК 577.114.3:591.111.1:[616.36-0.002:591.133.11-022.252] *https://doi.org/10.31861/biosystems2019.02.141*

ВМІСТ СІАЛОВИХ КИСЛОТ У ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ АЦЕТАМІНОФЕН-ІНДУКОВАНОЇ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТІ НА ТЛІ АЛІМЕНТАРНОЇ НЕСТАЧІ ПРОТЕЇНУ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. НИКОЛАЙЧУК*, М. В. ГАНУСЯК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
**e-mail: i.buchkovska@chnu.edu.ua*

Робота присвячена дослідженню фракційного розподілу сіалових кислот у плазмі крові щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну. У роботі досліджено вміст вільних, протеїнозв'язаних та олігозв'язаних сіалових кислот у плазмі крові тварин за даних експериментальних умов.

Дослідні тварини протягом експерименту споживали напівсинтетичний раціон відповідно до рекомендацій Американського інституту нутрієнтології. З метою моделювання аліментарної депривації протеїну щурі протягом 28 днів щоденно отримували низькопротеїновий раціон, що містив 1/3 загальноприйнятої норми добової потреби білка. Після чотиритижневого утримання тварин на експериментальній дієті моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном. Введення токсину здійснювали з розрахунку 1250 мг/кг маси тварини у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю один раз на день протягом 2 діб за допомогою спеціального зонда.

Фракційний розподіл різних форм сіалових кислот здійснювали за допомогою трихлороцтової кислоти. Визначення концентрації вільних, протеїно- та олігозв'язаних сіалових кислот проводили спектрофотометрично за кольоровою реакцією з тіобарбітуровою кислотою при 549 нм. Видалення хромогенів, які не характерні для сіалових кислот, здійснювали шляхом додавання н-бутанолу.

Показано, що підвищення вмісту загальних сіалових кислот у плазмі крові протеїнодефіцитних щурів (на 40 % порівняно з контролем) відбувається лише за рахунок зростання рівня олігозв'язаної фракції. Таким чином білкова недостатність виступає ключовим чинником встановлених змін, що, вірогідно, засвідчує інтенсифікацію процесів катаболізму внутрішньотканинних легкомобілізованих білків за умов дефіциту протеїну в харчовому раціоні.

Водночас надходження в організм токсину (ацетамінофену) незалежно від кількості спожитого екзогенного протеїну призводить до зростання концентрації загальних сіалових кислот в основному внаслідок збільшення вільної та протеїнозв'язаної фракцій, що свідчить про розвиток запально-деструктивних процесів у тканинах організму щурів.

Ключові слова: сіалові кислоти, глікокон'югати, токсичне ураження, ацетамінофен, аліментарна депривація протеїну

Вступ. Сіалові кислоти (СК) – ацильні похідні нейрамінової кислоти, які є структурними компонентами глікопротеїнів та гліколіпідів біомембран, протеогліканів сполучної тканини, олігосахаридів тощо (Маслак та ін., 2014). Займаючи кінцеві невідновлювальні позиції на олігосахаридних ланцюгах, сіалові кислоти впливають на фізико-хімічні властивості та біологічну активність глікокон'югатів (Varki et al., 2012).

У сучасних літературних джерелах (Schauer et al., 2018; Ibrahim et al., 2016) обговорюється, що сіаловмісні глікопротеїни беруть учать у процесах міжклітинних взаємодій, специфічної рецепції на поверхні клітин, передачі сигналів, транспорті іонів, забезпеченні антигенної специфічності та тканинної сумісності. Нативна структура вуглеводної частини глікопротеїнів є необхідною умовою реалізації функцій цих біомолекул.

За відомостями авторів (Davis et al., 2014) наявність сіалових кислот в складі білків плазми крові (церулоплазміну, кислого α_1-глікопротеїну) та деяких гормонів (хоріонічного гонадотропіну, фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормонів) визначає тривалість циркуляції цих сполук у кровоплині. Після відщеплення сіалової кислоти, коли кінцевим вуглеводом у молекулах глікопротеїнів стає галактоза, ці білки поглинаються клітинами печінки. Саме цим пояснюється втрата гормонами їх біологічної активності.

Саме тому десіалювання складних білково-вуглеводних або білково-ліпідних комплексів відіграє ключову роль в механізмі стрес-індукованих пошкоджень тканин (Büll et al., 2013; Пшежецкий и др., 2013). Сіалювання/десіалювання можна розглядати як динамічну модифікацію, яка регулюється

сіалілтрансферазами та сіалідазами у відповідь на зовнішні та внутрішні сигнали (Орехов и др., 2010).

Як прогностичний біохімічний маркер у лабораторній діагностиці використовують визначення вмісту сіалових кислот у плазмі крові. Підвищення рівня даного показника спостерігається за умов розвитку запальних процесів, які супроводжуються деградацією сполучної тканини або при посиленій проліферації тканин (наприклад, малігнізації). Також збільшення концентрації СК відзначається за умов захворювань, пов'язаних з ураженням паренхіми печінки та колагенозах. Водночас зниження вмісту СК у плазмі крові відбувається при перніціозній анемії, гіпохроматозі, що, ймовірно, пов'язано з порушенням біосинтезу вуглеводно-білкових комплексів (Wreden et al., 2005).

Слід відмітити, що загальні сіалові кислоти в організмі представлені двома формами: вільними та зв'язаними. Зв'язані, у свою чергу, поділяються на СК, зв'язані з протеїнами та олігосахаридами. Вони утворюються за дії нейрамінідаз, що гідролізують внутрішні або термінальні залишки сіалових кислот (Мицик та ін., 2015).

У зв'язку з вищевикладеним метою даної роботи стало дослідження фракційного розподілу сіалових кислот у плазмі крові щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 100-130 г. Постановку експерименту здійснювали відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на Шостому національному конгресі з біоетики (Київ, 2016), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург,1986).

Щурів утримували в пластмасових клітках із піщаною підстилкою та вільним доступом до води. Дослідні тварини протягом експерименту споживали напівсинтетичний раціон відповідно до рекомендацій Американського інституту нутрієнтології (Reeves et al., 1993).

З метою моделювання аліментарної депривації протеїну тварини протягом 28 днів щоденно отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон, що містив 1/3 загальноприйнятої норми добової потреби білка (Kopylchuk et al., 2017).

Після чотиритижневого утримання тварин на експериментальній дієті моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном. Введення токсину здійснювали з розрахунку 1250 мг/кг маси тварини у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю один раз на день протягом 2 діб за допомогою спеціального зонда (Стефанов, 2001).

Дослідних тварин було розділено на групи: К – контрольні тварини, які споживали повноцінний раціон; НПР – щурі, які перебували на низькопротеїновій дієті; ТУ – щурі з ацетамінофен-індукованим токсичним ураженням; НПР+ТУ – щурі з ацетамінофен-індукованим токсичним ураженням на тлі аліментарної депривації протеїну.

Цервікальну дислокацію дослідних тварин під легким ефірним наркозом проводили на 28 та 31 доби експерименту.

Фракційний розподіл різних форм сіалових кислот здійснювали за допомогою трихлороцтової кислоти (ТХО). Сіалові кислоти відщеплюються від глікокон'югатів під час нагрівання із ТХО. Для визначення кількісного вмісту сіалових фракцій використовували кольорову реакцію з тіобарбітуровою кислотою (Нетроніна, 2015). Видалення хромогенів, які не характерні для сіалових кислот, здійснювали шляхом додавання н-бутанолу. Після перемішування та центрифугування (3000 об/хв, 5–6 хв) шар бутанолу із суміші видаляли. Потім у пробірки додавали по 2 краплі 10,5 М сульфатної кислоти та знову екстрагували хромоген. Вміст вільних, олігозв'язаних та протеїнозв'язаних сіалових кислот визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 549 нм і виражали в ммоль/л.

Для статичного опрацювання даних кількісні показники обробляли математичними методами, що використовуються в біології, на персональному комп'ютері з використанням пакета аналізу даних *Microsoft Excel*. Оцінювали середнє значення (*M*) та стандартну похибку середнього (*m*). Для параметричних даних використовували t-критерій Стьюдента. Результати вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати досліджень показали підвищення концентрації загальних сіалових кислот у плазмі крові усіх дослідних груп щурів (рис. 1). Так, у білок-дефіцитних тварин рівень СК в 1,4 рази перевищує значення контролю, тоді як найвищі показниками вмісту сіалових кислот зареєстровані нами за умов введення токсичних доз ацетамінофену щурам, що напередодні споживали повноцінний та низькопротеїновий раціони (приблизно вдвічі порівняно з контрольною групою). Рівень загальних сіалових кислот – це сума двох фракцій: зв'язаної з глікокон'югатами та вільно циркулюючої в кровоплині.

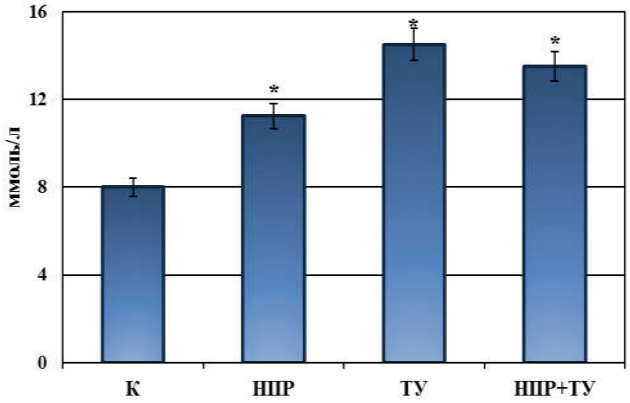

Рис. 1. Концентрація загальних сіалових кислот у плазмі крові тварин за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну

Fig. 1. The concentration of total sialic acids in the blood plasma of animals under the conditions of toxic damage after alimentary protein deprivation

*Примітка (тут і надалі): К – тварини, які отримували повноцінний раціон (контроль); НПР – тварини, які перебували на низькопротеїновій дієті; ТУ – тварини, яким викликали токсичне ураження; НПР+ТУ – тварини, яким на тлі низькопротеїнового раціону моделювали токсичне ураження; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.*

*Note (hereinafter): C – animals that received a full semi-synthetic diet; LPD – animals that consumed a low-protein diet, TD – animals that simulated acute toxic damage; LPD+TD – animals with induced toxic damage after low-protein dieting; * – statistically significant difference compared with the control, $P \leq 0.05$.*

Дослідження концентрації зв'язаних та вільної форм сіалових кислот у плазмі крові дає інформацію переважно про активність процесів сіалування/десіалування білків та ліпідів в організмі (Thaysen-Andersen et al., 2013). Тому підвищення концентрації загальних СК у плазмі крові щурів може бути пов'язане з посиленням біосинтезу та виходом у кров різних глікопротеїнів, які містять сіалові кислоти. До цих білків належать імуноглобуліни, церулоплазмін, фактори зсідання крові тощо (Тетелютина и др., 2015).

Відомо, що синтез, катаболізм і приєднання сіалових кислот до олігосахаридних ланцюгів відбувається у печінці (Varki et al., 2012). Тому нами висловлено припущення, що залежно від функціонального стану печінки може змінюватись концентрація протеїнозв'язаних, олігозв'язаних та вільних сіалових кислот у плазмі крові. Збільшення концентрації загальних сіалових кислот у крові може бути наслідком посиленого біосинтезу глікопротеїнів у печінці як відповідь на мезенхімально-запальну реакцію.

Як видно з рис. 2, вірогідні зміни концентрації вільних сіалових кислот у плазмі крові порівняно зі значеннями контролю спостерігаються лише за умов моделювання гострого токсичного ураження незалежно від кількості протеїну в харчовому раціоні. Отримані нами результати дають можливість припустити, що підвищення концентрації загальних сіалових кислот за даних експериментальних умов (рис. 1) відбувається внаслідок зростання фракції вільних СК (рис. 2).

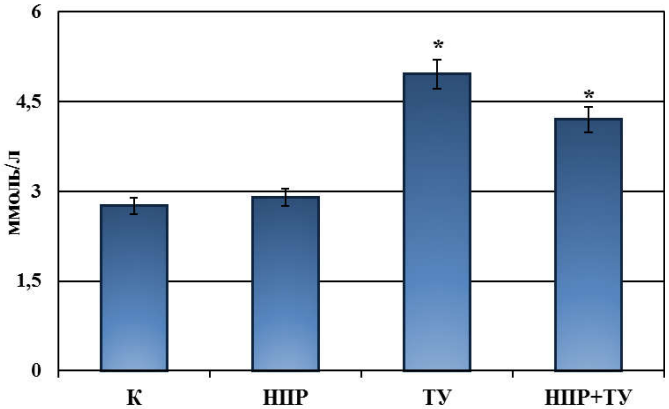

Рис.2. Вміст вільних сіалових кислот у плазмі крові тварин за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну

Fig. 2. The free sialic acids content in the blood plasma of animals under the conditions of toxic damage after alimentary protein deprivation

У вільному вигляді в нормі сіалові кислоти зустрічаються в мінімальних кількостях, оскільки входять до складу глікокон'югатів. Поява значної кількості вільних сіалових кислот у плазмі крові частіше за все відбувається внаслідок активації ензимів, що каталізують відповідно реакції відщеплення та перенесення залишків сіалових кислот – сіалідаз і сіалілтрансфераз (Wang et al., 2016). З іншого боку, за умов токсичного ураження, як підтверджено попередніми дослідженнями (Копильчук та ін., 2015) внаслідок пошкодження гепатоцитів відбувається порушення синтетичної функції печінки. Внаслідок цього знижується інтенсивність синтезу білків, тому вільні сіалові кислоти можуть посилено надходити у кров. Водночас надмірне утворення реакційного метаболіту ацетамінофену – N-ацетилбензохіноніміну може викликати руйнування клітинних мембран органів з посиленим катаболізмом глікопротеїнів та гліколіпідів, що також можна розглядати як ще один чинник появи вільних СК у крові.

Відомо, що на мембранах гепатоцитів наявні рецептори, які зв'язують D-сіалоглікопротеїни. Залишки галактози упізнаються та зв'язуються з рецепторами гепатоцитів та купферівських клітин, забезпечуючи захоплення та подальше розщеплення «старих» білків. У печінці ці білки плазми руйнуються шляхом ендоцитозу (Thaysen-Andersen et al., 2013). Саме тому концентрація вільних СК може корелювати зі ступенем важкості патологічного процесу в стромі печінки, оскільки за умов токсичного ураження часто відбувається дезорганізація сполучнотканинних структур даного органу.

Щодо вмісту протеїнозв'язаних сіалових кислот в плазмі крові щурів, то за даних експериментальних умов спостерігається аналогічна тенденція змін даного показника (в 3 (ТУ) та 2,3 рази (НПР+ТУ) відповідно) порівняно зі значеннями, отриманими в контрольної групи тварин (рис. 3).

Як відомо більшість білків плазми крові, зокрема, різні фракції глобулінів переважно з'єднані з сіаловою кислотою. Утворення таких білків відбувається переважно в печінці з наступним виходом їх у кровоплин для здійснення різних функцій. Переважно сіальованими є білки гострої фази, зокрема, С-реактивний білок, церулоплазмін, гаптоглобін, α_1-кислий глікопротеїн, фібриноген тощо (Uslu et al., 2003). З розвитком запалення відбувається істотне порушення протеїнового обміну, що проявляється зростанням вмісту гострофазних білків у крові внаслідок їх конкурентного синтезу в печінці а також як результат елімінації їх з ушкоджених тканин у вигляді білково-вуглеводних сполук (Eckersall et al., 2001).

Тому таке підвищення концентрації протеїнозв'язаних сіалових кислот за умов токсичного ураження може бути пов'язане зі збільшенням концентрації білків гострої фази, наприклад, С-реактивного білка під час запальних процесів у печінці, як було встановлено раніше (Волощук и др., 2014).

Аналіз результатів досліджень вмісту олігозв'язаної фракції сіалових кислот засвідчує достовірні зміни підвищення вказаного показника лише в групах тварин, які споживали низькопротеїновий раціон (рис. 4).

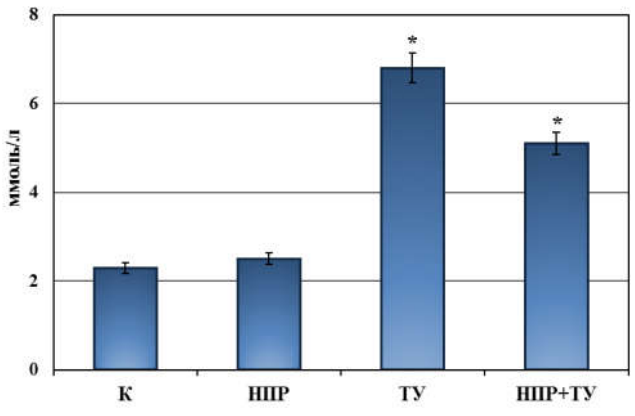

Рис. 3. Вміст протеїнозв'язаних сіалових кислот у плазмі крові тварин за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну

Fig. 3. The protein-bound sialic acids content in the blood plasma of animals under conditions of toxic damage after alimentary protein deprivation

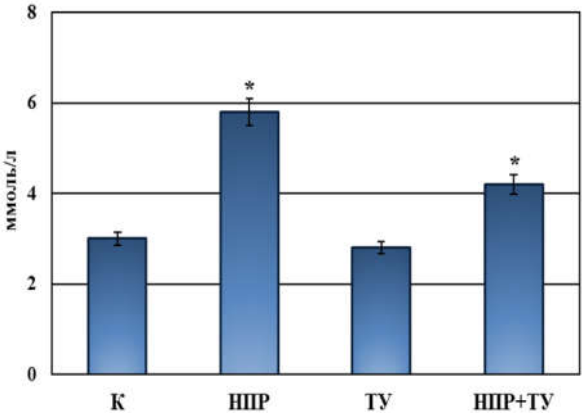

Рис. 4. Вміст олігозв'язаних сіалових кислот у плазмі крові тварин за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну

Fig. 4. The oligo-bound sialic acids content in the blood plasma of animals under the conditions of toxic damage after alimentary protein deprivation

Вільні олігосахариди, не зв'язані з білками або ліпідами аналоги гліканів, являють собою побічні продукти ендоплазматичного синтезу, клітинного фолдингу і лізосомального розпаду глікокон'югатів. Аналіз будови гліканів плазми виявляє аналогію з внутрішньоклітинними вільними олігосахаридами. Відповідно, вони можуть відображати стан внутрішньоклітинних органел – ендоплазматичного ретикулума і лізосом (Malik et al., 2015).

Такі вільні олігосахариди утворюються на початкових етапах синтезу глікопротеїнів і гліколіпідів при зборці глікану-попередника в ЕПР. Якщо в ході синтезу глікокон'югатів з'являються аберантні молекули, клітина їх виявляє і руйнує шляхом спеціального механізму – асоційованої з ендоплазматичним ретикулумом деградації. При цьому також утворюються вільні олігосахариди. Тому гідроліз глікокон'югатів в лізосомах – це ще одне джерело вільних олігосахаридів (Suzuki et al., 2006). Ймовірно, за даних експериментальних умов у плазмі крові олігозв'язані сіалові кислоти можуть виявлятися внаслідок посиленого катаболізму внутрішньотканинних легкомобілізованих білків за умов дефіциту протеїну в харчовому раціоні.

Висновки. Отже, підвищення вмісту загальних сіалових кислот внаслідок збільшення вільної та протеїнозв'язаної фракцій за умов токсичного ураження на тлі аліментарної депривації протеїну свідчить про розвиток запально-деструктивних процесів у тканинах організму щурів. Водночас білкова недостатність виступає ключовим чинником підвищення олігозв'язаної фракції сіалових кислот у плазмі крові щурів, що вказує на інтенсифікацію процесів катаболізму внутрішньоклітинних глікокон'югатів.

Список літератури:

1. Волощук О. Н, Копыльчук Г. П., Аврам И. И. Особенности острофазового ответа при токсическом гепатите, развивающемся на фоне алиментарной депривации протеина. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук.* 2014; 6-1: 33–35.
2. Копильчук Г. П., Бучковська І. М., Ніколаєв Р. О. Вміст білкових фракцій плазми крові за умов білкової недостатності. *Біологічні системи.* 2015; 7(3): 16–20.
3. Маслак Г. С., Костюк О. В., Мінченко Д. О., Бразалук О. З., Шевцова А. І., Мінченко О. Г. Сіальованість глікопротеїнів і рівень експресії нейрамінідази NEU1 та сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію. *Фізіол. журн.* 2014; 60(5): 14–22. DOI: https://doi.org/10.15407/fz60.05.
4. Мицик Н. Й., Ольхович Н. В., Горовенко Н. Г. Диференціація норми та патології за селективного біохімічного скринінгу лізосомних хвороб накопичення, що супроводжуються підвищеною екскрецією олігосахаридів. *Ukr. Biochem. J.* 2015; 87(3): 107–115. DOI: 10,15407/ ubj87.03.107.
5. Нетроніна О. В. Вільні та зв'язані форми сіалових кислот у плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина.* 2015; 6(2): 108–112. DOI: 10.15421/021520
6. Орехов А. Н., Карагодин В. П., Мельниченко А. А., Кириченко Т. В., Смутова В. А., Чернова У. В., Сафонова В. М., Калабушев С. Н., Пшежецкий А. В. Сиаломика и атеросклероз. *Фундаментальные науки и практика*. 2010. 1(4). С. 59–65.
7. Пшежецкий А. В., Ашмарина Л. И. Десиалирование поверхностных рецепторов: новое направление в регуляции клеточных сигнальных систем. *Биохимия.* 2013; 78(7). 949–961.
8. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Київ: Авіцена, 2001. 527 с.
9. Тетелютина Ф. К., Сахабутдинова Е. П. Показатели обмена сиалосодержащих гликопротеинов у беременных женщин с плацентарной недостаточностью на фоне преэлампсии. *Современные проблемы науки и образования.* 2015; 6: 1–6.
10. Büll C., Boltje T. J., Wassink M., de Graaf A. M., van Delft F. L., den Brok M. H., Adema G. J. Targeting aberrant sialylation in cancer cells using a fluorinated sialic acid analog impairs adhesion, migration, and in vivo tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2013; 12(10): 1935–1946. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0279.
11. Davis J., Kumar R., May J., Bousfield G. Naturally Occurring Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation Variants. *Journal of Glycomics & Lipidomics.* 2014; 4(1): 1–5. DOI: 10.4172/2153-0637.1000e117.
12. Eckersall P. D., Young F. J., McComb C., Hogarth C. J., Safi S., Weber A., McDonald T., Nolan A. M., Fitzpatrick J. L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec.* 2001;148(2): 35–41. DOI: 10.1136/vr.148.2.35.
13. Ibrahim M. A., Abdulkadir A., Onojah A., Sani L., Adamu A., Abdullahi H. Modulation of sialic acid levels among some organs during insulin resistance or hyperglycemic states. *Mol Cell Biochem.* 2016; 411(1-2): 235–239. doi: 10.1007/s11010-015-2585-x.
14. Kopylchuk H. P., Nykolaichuk I. M., Zhuretska O. M. Rat liver arginase system under acetaminophen-induced toxic injury and protein deprivation. *Ukr. Biochem. J.* 2017; 89(2): 92–98.
15. Malik K., Chugh K., Gupta G., Dahyia K., Deepak G., Tiwari R. Significance of Protein Bound Sialic Acid In Alcoholic Liver Disease. *International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies.* 2015; 2(6): 8–12.
16. 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.* 1993; 123(11): 1939–1951.

17. Schauer R., Kamerling J. P. Exploration of the Sialic Acid World. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2018; 75: 1-213. doi: 10.1016/bs.accb.2018.09.001.
18. Suzuki T., Funakoshi Y. Free N-linked oligosaccharide chains: formation and degradation. *Glycoconj J.* 2006; 23(5-6): 291–302. DOI: 10.1007/s10719-006-6975-x.
19. Thaysen-Andersen M., Larsen M., Packera N., Palmisano G.Structural analysis of glycoprotein sialylation – Part I: pre-LC-MS analytical strategies. *RSC Advances.* 2013; 3: 22683–22705.
20. Uslu C., Taysi S., Akcay F., Sutbeyaz M. Y., Bakan N. Serum free and bound sialic acid and alpha-1-acid glycoprotein in patients with laryngeal cancer. *Ann Clin Lab Sci.* 2003; 33(2): 156–159.
21. Varki A., Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1253: 16–36. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x.
22. Wang L., Liu Y., Wu L., Sun X. L. Sialyltransferase inhibition and recent advances. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1864(1): 143-153. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.07.007.
23. Wreden C. C., Wlizla M., Reimer R. J. Varied mechanisms underlie the free sialic acid storage disorders. *J Biol Chem.* 2005; 280(2): 1408–1416. DOI: 10.1074/jbc.M411295200.

References:

1. Voloschuk O. N, Kopyilchuk G. P., Avram I. I. Osobennosti ostrofazovogo otveta pri toksicheskom gepatite, razvivayuschemsya na fone alimentarnoy deprivatsii proteina. *Aktualnyie problemyi gumanitarnyih i estestvennyih nauk.* 2014; 6-1: 33–35. (in Russian)
2. Kopylchuk H. P., Buchkovska I. M., Nikolaev R. O. Content of protein fractions of blood plasma in animals under the conditions of protein deficiency. *Biological systems.* 2015; 7(3): 16–20. (in Ukrainian).
3. Maslak H. S., Kostiuk O. V., Minchenko D. O., Brazaluk O. Z., Shevtsova A. I., Minchenko O. H. Glicoprotein sialylation and NEU1 and ST6GAl1 expressions in erythremia disease. *Fiziologichnyi Zhurnal.* 2014; 60(5): 14–22. DOI: https://doi.org/10.15407/fz60.05. (in Ukrainian)
4. Mytsyk N. Y., Olkhovych N. V., Gorovenko N. G. Differentiation of norm and pathology during selective biochemical skreening of lysosomal storage diseases with increased excretion of oligosaccharides. *Ukr. Biochem. J.* 2015; 87(3): 107–115. DOI: 10,15407 / ubj87.03.107. (in Ukrainian)
5. Netronina O.V. Free and bound forms of sialic acid in blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Vìsn. Dnìpropetr. Unìv. Ser. Bìol. Med.* 2015; 6(2): 108–112. doi:10.15421/021520. (in Ukrainian).
6. Orehov A. N., Karagodin V. P., Melnichenko A. A., Kirichenko T. V., Smutova V. A., Chernova U. V., Safonova V. M., Kalabushev S. N., Pshezhetskiy A. V. Sialomika i ateroskleroz. *Fundamentalnyie nauki i praktika*. 2010. 1(4). C. 59–65. (in Russian)
7. Pshezhetskiy A. V., Ashmarina L. I. Desialirovanie poverhnostnyih retseptorov: novoe napravlenie v regulyatsii kletochnyih signalnyih sistem. *Biohimiya.* 2013; 78(7). 949–961. (in Russian)
8. Stefanov O. V. Preclinical studies of drugs. Kyiv: Avicenna, 2001. 527 s. (in Ukrainian).
9. Tetelyutina F. K., Sahabutdinova E. P. Pokazateli obmena sialosoderzhaschih glikoproteinov u beremennyih zhenschin s platsentarnoy nedostatochnostyu na fone preeelampsii. *Sovremennyie problemyi nauki i obrazovaniya.* 2015; 6: 1–6. (in Russian)
10. Büll C., Boltje T. J., Wassink M., de Graaf A. M., van Delft F. L., den Brok M. H., Adema G. J. Targeting aberrant sialylation in cancer cells using a fluorinated sialic acid analog impairs adhesion, migration, and in vivo tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2013; 12(10): 1935–1946. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0279.
11. Davis J., Kumar R., May J., Bousfield G. Naturally Occurring Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation Variants. *Journal of Glycomics & Lipidomics.* 2014; 4(1): 1–5. DOI: 10.4172/2153-0637.1000e117.
12. Eckersall P. D., Young F. J., McComb C., Hogarth C. J., Safi S., Weber A., McDonald T., Nolan A. M., Fitzpatrick J. L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec.* 2001;148(2): 35–41. DOI: 10.1136/vr.148.2.35.
13. Ibrahim M. A., Abdulkadir A., Onojah A., Sani L., Adamu A., Abdullahi H. Modulation of sialic acid levels among some organs during insulin resistance or hyperglycemic states. *Mol Cell Biochem.* 2016; 411(1-2): 235–239. doi: 10.1007/s11010-015-2585-x.
14. Kopylchuk H. P., Nykolaichuk I. M., Zhuretska O. M. Rat liver arginase system under acetaminophen-induced toxic injury and protein deprivation. *Ukr. Biochem. J.* 2017; 89(2): 92–98.
15. Malik K., Chugh K., Gupta G., Dahyia K., Deepak G., Tiwari R. Significance of Protein Bound Sialic Acid In Alcoholic Liver Disease. *International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies.* 2015; 2(6): 8–12.
16. 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.* 1993; 123(11): 1939–1951.
17. Schauer R., Kamerling J. P. Exploration of the Sialic Acid World. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2018; 75: 1-213. doi: 10.1016/bs.accb.2018.09.001.
18. Suzuki T., Funakoshi Y. Free N-linked oligosaccharide chains: formation and degradation. *Glycoconj J.* 2006; 23(5-6): 291–302. DOI: 10.1007/s10719-006-6975-x.
19. Thaysen-Andersen M., Larsen M., Packera N., Palmisano G.Structural analysis of glycoprotein sialylation – Part I: pre-LC-MS analytical strategies. *RSC Advances.* 2013; 3: 22683–22705.
20. Uslu C., Taysi S., Akcay F., Sutbeyaz M. Y., Bakan N. Serum free and bound sialic acid and alpha-1-acid glycoprotein in patients with laryngeal cancer. *Ann Clin Lab Sci.* 2003; 33(2): 156–159.
21. Varki A., Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1253: 16–36. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x.

22. Wang L., Liu Y., Wu L., Sun X. L. Sialyltransferase inhibition and recent advances. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1864(1): 143-153. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.07.007.
23. Wreden C. C., Wlizla M., Reimer R. J. Varied mechanisms underlie the free sialic acid storage disorders. *J Biol Chem.* 2005; 280(2): 1408–1416. DOI: 10.1074/jbc.M411295200.

THE CONTENT OF SIALIC ACIDS IN BLOOD PLASMA OF RATS UNDER THE CONDITIONS OF ACETAMINOPHEN-INDUCED HEPATOTOXICITY AFTER ALIMENTARY PROTEIN DEPRIVATION

H. P. Kopylchuk, I. M. Nykolaichuk, M. V. Hanusiak

The work is devoted to the study of the fractional distribution of sialic acids in the blood plasma of rats under the conditions of toxic damage with acetaminophen after alimentary protein deprivation. The content of free, protein-bound and oligo-bound sialic acids in the blood plasma of animals was investigated under experimental conditions.

The animals consumed a semi-synthetic diet during the experiment according to the recommendations of the American Institute of Nutrition. In order to simulate alimentary protein deprivation, rats received a low-protein diet containing 1/3 of the standard daily protein requirement daily for 28 days. The animals were modeled acute toxic damage with acetaminophen after four weeks of experimental diet. The administration of the toxin was carried out at doses of 1250 mg/kg animal body weight in suspension in 2 % starch gel solution once a day for 2 days by gavage.

Fractional distribution of sialic acids was carried out using trichloroacetic acid. The concentration of free, protein- and oligo-bound sialic acids was determined spectrophotometrically at 549 nm by color reaction with thiobarbituric acid. Removal of non-sialic acid specific chromogens were performed by the addition of n-butanol.

It has been shown that the increase of total sialic acids in the blood plasma of protein-deficient rats (by 40% compared to control) is due only to the increase in the level of the oligo-bound fraction. Thus, protein deficiency is a key factor in the established changes, which probably indicates the intensification of catabolism processes of intracellular easily mobilized proteins under the conditions of protein deficiency in the diet.

At the same time, toxin (acetaminophen) intake, leads to an increase in the concentration of total sialic acids, mainly due to the increase of free and protein-bound fractions, which indicates the development of inflammatory processes in the tissues of the body, regardless of the amount of exogenous protein consumed.

Keywords: sialic acid, glicoconjugados, acetaminophen, toxic injury, alimentary deprivation of protein

Отримано редколегією 18.09.2019