



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048337

(51)^{2020.01} A61K 31/194; A61P 1/16; A61K 31/198 (13) B

(21) 1-2020-07605

(22) 02/04/2019

(86) PCT/IB2019/052694 02/04/2019

(87) WO 2020/003013 A1 02/01/2020

(30) 102018000006725 27/06/2018 IT

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/03/2021 396A

(73) Professional Dietetics S.p.A. (IT)

Via Ciro Menotti 1/A, 20129 Milano, Italy

(72) Paolo Luca Maria GIORGETTI (IT).

(74) Công ty TNHH Tư vấn đầu tư và chuyển giao công nghệ (INVESTCONSULT)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA AXIT AMIN SỬ DỤNG TRONG PHÒNG NGỪA VÀ ĐIỀU
TRỊ CÁC BỆNH VỀ GAN

(21) 1-2020-07605

(57) Chế phẩm chứa axit amin sử dụng trong phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh về gan ở một loài động vật có vú, chế phẩm bao gồm một hoạt chất, hoạt chất đó có chứa các axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin và các axit cacboxylic axit citric, axit succinic, axit malic.

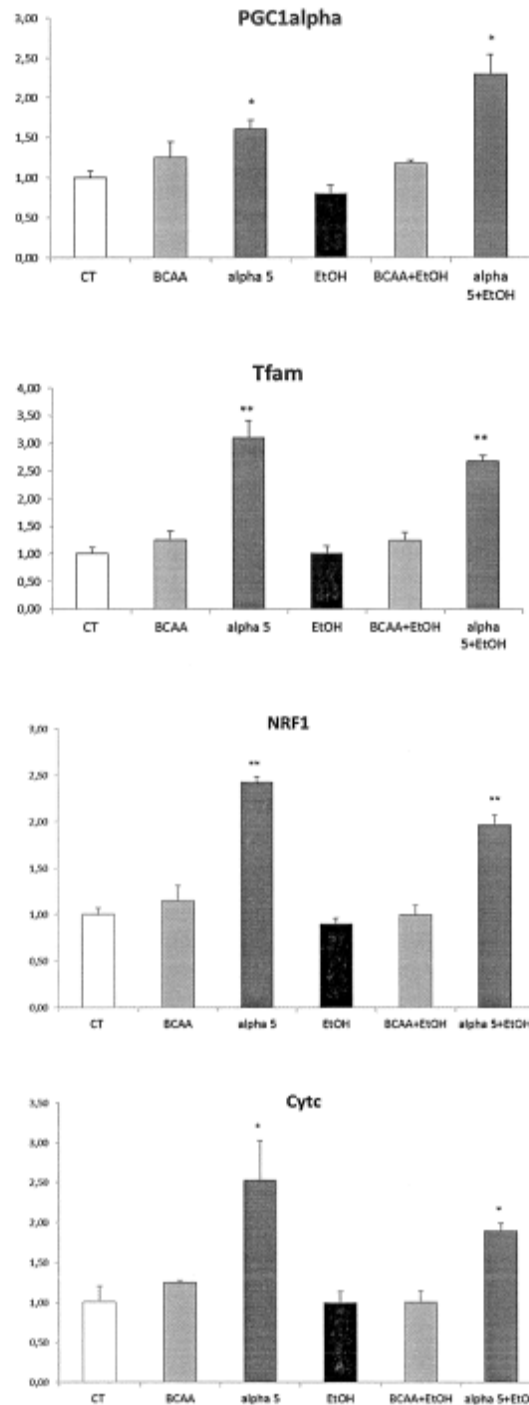


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến chế phẩm bao gồm axit amin. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm axit amin sử dụng trong phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh về gan.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh về gan là một trong những bệnh xảy ra thường xuyên nhất gây ra bởi những điều kiện môi trường không có lợi khác nhau, ví dụ như, ký sinh trùng và virút, chất gây nghiện, chất độc, chứng nghiện rượu, và hút thuốc lá. Các bệnh này thường là các bệnh mãn tính với các triệu chứng lâm sàng có diễn biến theo chiều hướng xấu đi. Các bệnh gan mãn tính có những biểu hiện về sự phá hủy từ từ của nhu mô gan qua thời gian, với các phản ứng viêm và sự tích mỡ, với các thương tổn hóa xơ và sự kích hoạt biến đổi tế bào dẫn tới việc phát triển thành ung thư trong rất nhiều trường hợp. Do đó, các bệnh về gan có thể bao gồm chứng gan thoái hóa mỡ, xơ gan, chai gan, và ung thư biểu mô tế bào gan do những chứng rối loạn lâm sàng nặng dần của gan. Chứng chai gan là hệ quả của bệnh gan cấp tính và mãn tính và có những biểu hiện như sự thay thế mô gan bởi xơ sẹo và các nốt u tái tạo dẫn tới việc dần dần mất đi chức năng gan. Chứng xơ gan và các nốt u tái tạo dẫn tới sự mất đi cấu trúc thông thường của tiểu thùy gan. Chứng xơ gan đặc trưng bởi sự phát triển của các mô sẹo bắt nguồn từ, ví dụ như nhiễm trùng, viêm, thương tổn và cả trong việc chữa lành. Qua thời gian, các xơ sẹo dần dần thay thế các mô gan chức năng bình thường, hậu quả từ sự giảm thiểu của lượng máu chảy vào gan khiến cho gan không đủ khả năng chuyển hóa hoàn toàn các chất dinh dưỡng, hóc môn, các loại thuốc và các chất độc hại có trong mạch máu. Các nguyên nhân thường thấy của chứng chai gan bao gồm chứng nghiện rượu, viêm gan siêu vi C, ăn phải độc tố, và nhiều nguyên nhân khác có thể xảy ra. Như đã đề cập bên dưới, chứng rối loạn dịch tễ thường gặp nhất liên quan tới chứng xơ gan và khả năng là ung thư, là sự tăng mỡ cơ thể và tích mỡ gan. Việc tích mỡ này có thể là do hai biểu hiện lâm sàng chủ yếu: lạm dụng rượu bia và bệnh béo phì.

Việc sử dụng rượu, bia thường xuyên và quá mức có thể gây ra bệnh lý gan do rượu bia (ALD), một mối đe dọa sức khỏe toàn cầu nghiêm trọng. Các đặc điểm bệnh lý của ALD phát triển trong một khoảng thời gian dài, bao gồm chứng gan thoái hóa mỡ, chứng viêm gan nhiễm mỡ, chứng chai gan cho đến giai đoạn ung thư.

Các chứng bệnh phát sinh ra bởi ethanol xuất phát từ nhiều yếu tố. Các biểu hiện ban đầu, ví dụ như tổn thương ty thể, sự sản sinh của gốc tự do ôxy hóa (ROS), và sự tích mỡ đường như là những hệ quả trực tiếp của sự chuyển hóa ethanol và có chung biểu hiện với bệnh ALD và bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu hay còn gọi là NAFLD (xem bên dưới) (Mantena et al. 2008).

Cơ chế bảo vệ tế bào khỏi tác hại của rượu bia thường bị hiểu sai. Tự thực bào, là một cơ chế thoái biến tế bào quan trọng mà trong đó việc tiêu hóa các tế bào protein và các cơ quan tế bào nhằm tạo ra năng lượng hoặc phân hủy những cấu trúc tế bào đã bị thương tổn, được đề xuất là một nguyên nhân dẫn tới ALD, mặc dù những hiểu biết về các cơ chế này vẫn còn rời rạc (Lin et al. 2015). Cơ chế tự thực bào đường như có những chức năng nhất định trong các tế bào nhu mô gan và các loại tế bào khác (tức là các đại thực bào và tế bào gốc ở gan), tác động tới sự nhạy cảm của insulin, sự tích tụ lipid, các thương tổn tế bào gan, và cả những phản ứng miễn dịch bẩm sinh.

Các nghiên cứu gần đây trên chuột và các mẫu tế bào cho thấy ngộ độc rượu cấp tính làm phát sinh cơ chế tự thực bào ở gan (Ding et al. 2010; Ni et al. 2013; Lin et al. 2013).

Ngược lại, chứng ngộ độc rượu mãn tính lại dường như ngăn chặn cơ chế tự thực bào ở gan (Thomas et al. 2015; Cho et al. 2014). Sự ức chế tự thực bào được cho thấy có thể làm giảm chứng gan thoái hóa mỡ do ethanol và thương tổn gan ở chuột (Ding et al. 2010; Ni et al. 2013; Lin et al. 2013).

Ngược lại, sự đẩy mạnh cơ chế tự thực bào trong dược lý học dường như đã làm giảm bớt chứng gan thoái hóa mỡ do ethanol và thương tổn gan (Lin et al. 2013). Kết quả là tự thực bào được coi như là một cơ chế bảo vệ khỏi những tác động gây độc hại cho tế bào của ethanol và đã trở thành mục tiêu cho sự phát triển của phương pháp trị liệu trung gian cho bệnh ALD.

Như đã đề cập trước đó, nguyên nhân chủ yếu thứ hai gây ra chứng rối loạn về gan đó là bệnh béo phì, căn bệnh phổ biến rộng rãi ở các nước phát triển và qua nghiên cứu dịch tễ thì cũng đang tăng lên ở các nước đang phát triển, và gây ra căn bệnh gọi

là bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu hay NAFLD. Những tiến triển trong sự nhiễm bệnh viêm gan nhiễm mỡ, chứng chai gan, và ung thư biểu mô tế bào gan chính là tình trạng khẩn cấp ngày một gia tăng trên toàn cầu. Cơ chế hóa sinh và phân tử bao gồm trong tình trạng này có thể đặt chồng khít lên nhau với các cơ chế tương ứng thường được mô tả trong bệnh ALD.

Là sự chuyển hóa những axit amin bị biến đổi, là dấu hiệu phân biệt các bệnh về gan, có liên kết với cả việc tiêu thụ rượu và những tiến triển của bệnh béo phì, đặc biệt là có các đặc điểm của mức độ giảm thiểu của các axit amin trực phân nhánh (BCAAs) (Charlton, 2006), hiện các hướng tiếp cận nhằm chữa bệnh dựa trên sự bổ sung các axit amin như một liệu pháp điều trị cho gan đang ngày càng thu hút được sự quan tâm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Phần mô tả theo đây nhằm mục đích cung cấp các chế phẩm gốc axit amin mới hiệu quả trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về gan.

Theo mô tả hiện tại, mục đích trên đạt được nhờ vào đối tượng bảo hộ được nhắc lại trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo, được hiểu là một phần không thể thiếu trong bản bộc lộ này.

Một phương án theo bản mô tả hiện tại cung cấp một chế phẩm dùng trong điều trị bệnh gan ở loài động vật có vú, chế phẩm bao gồm hoạt chất, hoạt chất đó có chứa các axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin và các axit cacboxylic axit xitric, axit succinic, axit malic.

Theo một hoặc nhiều phương án, hoạt chất của chế phẩm có chứa một hoặc nhiều axit amin được chọn trong nhóm bao gồm histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, cystein và tyrosin.

Theo một phương án được ưu tiên, bệnh gan có thể được chọn trong nhóm bao gồm bệnh gan do rượu (ADL), bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD) loạn dưỡng mỡ, viêm gan, chai gan, ung thư biểu mô tế bào gan (HCC).

Một phương án khác của bản bộc lộ hiện tại cung cấp một phương pháp điều trị các bệnh về gan ở động vật có vú, phương pháp bao gồm việc lựa chọn chế phẩm bao gồm hoạt chất, hoạt chất đó bao gồm axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin

và các axit cacboxylic axit xitric, axit succinic, và axit malic, cấu thành nên chế phẩm điều trị bệnh gan ở động vật có vú.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả hoàn toàn bằng ví dụ có tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo, trong đó:

- Fig. 1 thể hiện sự biểu hiện gen dưới dạng mức độ mRNA trong các tế bào HepG2 được xử lý qua các chế phẩm gốc axit amin khác nhau và etanol (EtOH) trong 9 ngày (*giá trị $P < 0,05$ và ** $P < 0,01$ so với các tế bào CTRL).

- Fig. 2 thể hiện mức độ protein p62 trong các tế bào HepG2 được xử lý qua các chế phẩm gốc axit amin khác nhau và EtOH trong 9 ngày (*giá trị $P < 0,05$ và ** $P < 0,01$ so với các tế bào CTRL; #giá trị $P < 0,05$ so với các tế bào được xử lý qua EtOH).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phần mô tả sau đây, nhiều chi tiết cụ thể được đưa ra để giúp hiểu rõ về các phương án. Các phương án có thể được thực hiện mà không có một hoặc nhiều chi tiết cụ thể, hoặc với các phương pháp, thành phần, vật liệu khác, v.v. Trong các trường hợp khác, các cấu trúc, vật liệu hoặc hoạt động đã được biết đến rộng rãi không được thể hiện hoặc mô tả chi tiết để tránh gây phân tán khi tìm hiểu các khía cạnh của các phương án.

Xuyên suốt bản mô tả, các dấu hiệu “một phương án” hoặc “phương án”, có nghĩa là một tính năng, cấu trúc hoặc đặc tính cụ thể được mô tả liên quan đến phương án được bao gồm trong ít nhất một phương án. Do đó, sự xuất hiện của các cụm từ “theo một phương án” hoặc “theo phương án” ở nhiều chỗ trong bản mô tả này không nhất thiết là đang đề cập đến cùng một phương án. Thêm vào đó, các tính năng, cấu trúc hoặc đặc tính cụ thể có thể được kết hợp theo bất kỳ cách thức phù hợp nào trong một hoặc nhiều phương án. Các tiêu đề được cung cấp ở đây chỉ nhằm tiện đối chiếu và không diễn giải phạm vi hay ý nghĩa của các phương án.

Bệnh gan do rượu (ALD) cũng như bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD) là những mối đe dọa sức khỏe toàn cầu nghiêm trọng. Các đặc điểm bệnh lý của ALD phát triển trong một khoảng thời gian dài, bao gồm chứng gan thoái hóa mỡ, chứng viêm gan nhiễm mỡ, chứng chai gan cho đến khi bị ung thư.

Các biểu hiện ban đầu, ví dụ như tổn thương ty thể, sự sản sinh của gốc tự do oxy hóa (ROS), và sự tích mỡ có chung biểu hiện với bệnh ALD và bệnh NAFLD.

Ngoài ra, sự chuyển hóa những axit amin bị biến đổi là đặc điểm phân biệt của bệnh gan, có các đặc điểm của mức độ thấp của các axit amin trực phân nhánh (BCAAs), và sự bổ sung thêm BCAAs xem ra là có liên quan tới việc giảm tần số của các biến chứng của chứng chai gan khi được kê đơn như một liệu pháp duy trì (Charlton 2006).

Tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng bằng việc thêm một axit cacboxylic cụ thể vào một chế phẩm bao gồm hỗn hợp của leuxin, isoleuxin, valin, threonin và lysin, hiệu quả cao trong việc chữa trị các bệnh về gan, ví dụ như ALD và NAFLD, là có thể đạt được.

Chế phẩm được bộc lộ - bao gồm hoạt chất các axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin hóa hợp với ba axit cacboxylic mà là các chất nền của chu trình axit tricacboxylic, bao gồm axit citric, axit succinic, và axit malic theo lượng cụ thể - được chỉ ra là có thể hồi phục sự chuyển hóa các axit amin bị biến đổi gây ra bởi etanol và do đó có thể ngăn ngừa cơ chế tự thực bào. Chu trình axit tricacboxylic, (chu trình ATC), hay còn gọi là chu trình Krebs và chu trình axit citric, thường được thực hiện trong ma trận ty thể, là giai đoạn thứ hai của hô hấp tế bào, một quá trình gồm ba giai đoạn mà trong đó các tế bào sống phân nhỏ các phân tử từ nhiên liệu hữu cơ hiện hữu trong khí oxy để thu nạp năng lượng chúng cần để có thể phát triển và phân tách.

Các chế phẩm bao gồm hoạt chất nói trên cũng như các chế phẩm bao gồm hoạt chất trên gồm thêm các axit amin cụ thể (được liệt kê trong Bảng 1 dưới đây) có hiệu quả đáng kể hơn một chế phẩm axit amin tương tự không bao gồm các axit cacboxylic cụ thể đó.

Theo một hoặc nhiều phương án, trong chế phẩm được bộc lộ tỷ lệ trọng lượng giữa tổng lượng axit citric, axit succinic và axit malic và tổng lượng các axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,3, tốt nhất là từ 0,1 đến 0,25.

Theo một hoặc nhiều phương án, hoạt chất có thể bao gồm thêm một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm bao gồm histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, cystein, và tyrosin.

Theo một hoặc nhiều phương án, các axit cacboxylic chứa trong chế phẩm gồm có axit citric, axit succinic, và axit malic.

Theo một phương án khác, hoạt chất trong chế phẩm được bọc lộ có thể bao gồm axit aspartic và/hoặc ornithin L-alpha ketoglutarat (OKG).

Theo một phương án, chế phẩm bao gồm một hoạt chất, hoạt chất đó bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin, histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, cystein, và tyrosin không bắt buộc, cũng như axit citric, axit succinic, và axit malic, các axit amin đã được đề cập là các axit amin duy nhất chứa chế phẩm này. Axit citric, axit succinic, và axit malic có thể là các axit cacboxylic duy nhất chứa trong chế phẩm này.

Theo một phương án khác, chế phẩm có thể bao gồm các axit amin isoleuxin, leuxin, và valin với lượng từ 35% đến 65% trọng lượng, tốt nhất là từ 42% đến 56% trọng lượng so với trọng lượng của hoạt chất.

Theo một hoặc nhiều phương án, tỷ lệ trọng lượng giữa leuxin và axit xitric nằm trong khoảng từ 5 đến 1, tốt nhất là trong khoảng từ 2,5 đến 3,5.

Theo một phương án khác, trọng lượng hoặc số mol axit xitric cao hơn trọng lượng hoặc số mol riêng của axit malic và axit succinic. Tốt hơn là, trọng lượng hoặc số mol của axit xitric cao hơn trọng lượng hoặc tổng số mol của axit malic cộng với axit succinic. Theo một phương án khác, tỷ lệ trọng lượng giữa axit xitric và tổng axit malic và axit succinic nằm trong khoảng từ 1,0 đến 4,0, tốt nhất là từ 1,5 đến 2,5. Theo phương án được ưu tiên, tỷ lệ trọng lượng axit xitric:axit malic:axit succinic nằm trong khoảng từ 10:1:1 đến 2:1,5:1,5, tốt hơn là trong khoảng từ 7:1:1 đến 1,5:1:1, tốt nhất là trong khoảng 5:1:1 và 3:1:1. Theo một phương án được ưu tiên tỷ lệ trọng lượng axit xitric:axit malic:axit succinic là 4:1:1.

Theo một số phương án được bọc lộ trong tài liệu này, tỷ lệ mol isoleuxin:leuxin được ưu tiên nằm trong khoảng 0,2-0,7, tốt nhất là trong khoảng 0,30-0,60 và/hoặc tỷ lệ trọng lượng valin: leuxin được ưu tiên nằm trong khoảng 0,2-0,70, tốt nhất là trong khoảng 0,30-0,65.

Theo một phương án khác, tỷ lệ mol threonin:leuxin nằm trong khoảng 0,10-0,90 tốt nhất là trong khoảng 0,20-0,70 và/hoặc tỷ lệ trọng lượng lysin:leuxin nằm trong khoảng 0,20-1,00, tốt nhất là trong khoảng 0,40-0,90.

Theo một phương án được ưu tiên, tỷ lệ giữa tổng số mol axit xitric, axit malic, axit succinic và tổng số mol của methionin, phenylalanin, histidin và tryptophan cao hơn 1,35.

Theo một hoặc nhiều phương án, tỷ lệ trọng lượng giữa tổng axit xitric, axit malic, axit succinic và tổng axit amin chuỗi nhánh leuxin, isoleuxin, valin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,4, tốt nhất là từ 0,15 đến 0,35.

Theo một phương án khác, tổng khối lượng của các axit amin chuỗi nhánh leuxin, isoleuxin, valin cộng với threonin và lysin cao hơn tổng khối lượng của ba axit cacboxylic, như axit xitric, axit malic và axit succinic. Tốt hơn là, trọng lượng của các axit đơn (axit xitric, axit succinic hoặc axit malic) nhỏ hơn khối lượng của từng loại axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin và lysin.

Theo một phương án khác, tổng số mol của lysin và threonin cao hơn tổng số mol của ba axit cacboxylic axit xitric, axit succinic, axit malic. Tốt hơn là, tỷ lệ giữa tổng số mol của ba axit cacboxylic axit citric, axit succinic, axit malic và tổng số mol của lysin và threonin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,7, tốt nhất là từ 0,15 đến 0,55.

Theo một hoặc nhiều phương án, chế phẩm được bộc lộ trong tài liệu này còn bao gồm các vitamin, tốt nhất là được chọn trong nhóm vitamin B, chẳng hạn như vitamin B1 và/hoặc vitamin B6.

Theo một phương án khác trong bản bộc lộ này, chế phẩm có thể bao gồm cacbohydrat, chất phụ gia và/hoặc các chất tạo hương vị.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm nhằm phòng ngừa và/hoặc điều trị một bệnh về gan trong một nhóm bao gồm bệnh gan nhiễm mỡ, bệnh loạn dưỡng mỡ, bệnh viêm gan, bệnh chai gan, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC).

Theo một hoặc nhiều phương án, bệnh gan là một chứng bệnh gan nhiễm mỡ. Bệnh gan nhiễm mỡ có thể bị gây ra bởi việc sử dụng rượu bia (bệnh gan nhiễm mỡ do rượu, ALD).

Theo một hoặc nhiều phương án, bệnh gan nhiễm mỡ có thể là bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD).

Ở một hoặc nhiều phương án, bệnh gan nhiễm mỡ có thể bị gây ra bởi các loại thuốc và các chất độc hại, ví dụ như amidoron, methotrexat, diltiazem, liệu pháp kháng retrovirus có hoạt tính cao, thuốc glucocorticoid, thuốc tamoxifen, ngộ độc nấm độc.

Hơn nữa, đặc biệt là khi điều chế các chế phẩm bột ló theo đây, cụ thể là với hoạt chất, tốt nhất nên tránh dùng axit amin arginin. Thêm vào đó, trong thành phần được nêu trong tài liệu này tốt nhất nên loại trừ các loại axit amin là serin, prolin, alanin. Các axit amin trên có thể phản tác dụng hoặc thậm chí có hại khi ở một số nồng độ hoặc tỷ lệ cân bằng hóa học trong chế phẩm.

Các axit amin được bột ló trong phần mô tả tại đây có thể được thay thế bằng các dẫn xuất được phẩm tương ứng, cụ thể là muối.

Như sẽ nêu rõ sau đây, việc sử dụng các chế phẩm được bột ló là đặc biệt hiệu quả trong phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh về gan.

Theo phương án được ưu tiên, các chế phẩm được bột ló có thể được sử dụng trong điều trị bệnh gan do rượu (ALD).

Theo một phương án khác, các chế phẩm axit amin có thể bao gồm các tá dược được phẩm, như protein, vitamin, cacbohydrat, chất làm ngọt tự nhiên và nhân tạo và/hoặc các chất tạo hương vị. Theo một phương án được ưu tiên, các tá dược phẩm có thể được lựa chọn từ đậm vãng sữa, maltodextrin, fructoza, canxi caseinat, dầu cá, sucraloza, este sucroza, vitamin D3, vitamin nhóm B.

Để dùng cho đường uống, các chế phẩm theo mô tả có thể ở dạng viên nén, viên nang, hạt, gel, bột gel, hoặc bột.

Các thông số kỹ thuật khác về số lượng và tỷ lệ giữa các axit amin khác nhau cung cấp cho các chế phẩm sẽ được bao hàm trong yêu cầu bảo hộ kèm theo, là một phần không thể thiếu của hướng dẫn kỹ thuật cung cấp theo đây liên quan đến sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Bảng 1 thể hiện hai chế phẩm gốc axit amin khác nhau được thử nghiệm bằng phương pháp trong ống nghiệm in vitro trên các tế bào gan (các tế bào HepG2) và phương pháp thử nghiệm sử dụng động vật thí nghiệm in vivo trên chuột sử dụng etanol, như được bột ló dưới đây.

Chế phẩm có tên “BCAAem” bao gồm một hoạt chất có chứa các axit amin leuxin, lysin, isoleuxin, valin, threonin, cystein, histidin, phenylalanin, methionin, tyrosin, tryptophan.

Chế phẩm có tên “alpha 5m ($\alpha 5m$)” bao gồm một hoạt chất có chứa các axit amin giống vậy cộng với axit citric, axit succinic, và axit malic.

Chế phẩm (%)	BCAAem	$\alpha 5$
L-Leuxin	30,01	31,0885
L-Lysin HCl clohydrat	19,58	16,903
L-Isoleuxin	15	10,3628
L-Valin	15	10,3628
L-Threonin	8,4	7,254
L-Cystein	3,6	3,1089
L-Histidin	3,6	3,1089
L-Phenylalanin	2,4	2,0726
L-Methionin	1,2	1,0363
L-Tyrosin	0,72	0,6218
L-Tryptophan	0,48	2,0726
OKG (ocnithin L- α ketoglutarat)	-	-
Vitamin B1 (thiamin clohydrat)	-	0,004
Vitamin B6 (piridoxin clohydrat)	-	0,0038
Axit xitric khan	-	8,0000
Axit malic	-	2,0000
Axit L-aspactic	-	-
Axit Succinic	-	2,0000
Tỷ lệ Leuxin:Isoleuxin:Valin	2:1:1	3:1:1

Bảng 1

Các chế phẩm trong Bảng 1 như trên có thể chuẩn bị trước bằng cách sàng tất cả các thành phần bằng lưới 0,8. Hỗn hợp thô được tạo ra bằng cách lấy mỗi thành phần (với lượng <10% tính theo tổng khối lượng) cho vào túi polyetylen với một phần L-lysine HCl sao cho đạt được 10% khối lượng của cả chế phẩm. Sau đó lắc túi này trong 5 phút. Sau đó đổ hỗn hợp thô này vào một máy trộn (chân không) với các thành phần còn lại và trộn trong khoảng thời gian 15 phút với tốc độ 120 vòng/phút để thu được chế phẩm thành phẩm đồng nhất.

PHƯƠNG PHÁP

Động vật và phương pháp xử lý

Giao thức thực nghiệm được phê chuẩn và điều khiển thực hiện theo Chỉ thị của Hội đồng cộng đồng Châu Âu ngày 24/11/1986 (86/609/EEC), và Bộ Y tế Ý, và tuân theo các đường lối chỉ đạo bảo vệ động vật quốc gia.

Chuột Wistar đực (3 tháng tuổi) từ Phòng thí nghiệm Charles River (Calco, Como, Ý) được sử dụng trong phân tích thực nghiệm được bộc lộ trong tài liệu này.

Động vật được nuôi riêng biệt trong các lồng nhựa polypropylene và được chia ra thành sáu nhóm:

1) Nhóm được nuôi theo cặp (CTRL nuôi theo cặp, $n = 6$) được cho ăn theo chế độ ăn uống hạn chế chất lỏng, trong đó etanol (EtOH) được thay thế bởi dextran mantoza có cùng một lượng calo;

2) Nhóm EtOH (EtOH, $n = 7$) được cho ăn theo chế độ ăn lỏng Lieber-DeCarli có chứa EtOH tùy thích [tăng dần lượng EtOH, đạt tới 36% lượng calo nạp vào sau 1 tuần, tương ứng với nồng độ cuối cùng là 6,2% (vol/vol)];

3) Nhóm BCAAem (BCAAem, $n = 6$) được cho ăn theo chế độ ăn uống hạn chế chất lỏng, trong đó EtOH được thay thế bởi dextran mantoza có cùng một lượng calo, và được bổ sung với chế phẩm axit amin chuỗi nhánh ("BCAAem" trong Bảng 1) mà cung cấp BCAAem 1,5 g/kg/ngày;

4) Nhóm alpha 5 ($\alpha 5m$, $n = 6$) được cho ăn theo chế độ ăn uống hạn chế chất lỏng, trong đó EtOH được thay thế bởi dextran mantoza có cùng một lượng calo, và được bổ sung với chế phẩm axit amin (" $\alpha 5m$ " trong Bảng 1) mà cung cấp BCAAem 1,5 g/kg/ngày;

5) Nhóm EtOH cộng với BCAAem (EtOH + BCAAem, $n = 7$) được cho ăn theo chế độ ăn lỏng Lieber-DeCarli có chứa EtOH và chế phẩm BCAAem tùy thích; và

6) Nhóm EtOH cộng với $\alpha 5m$ (EtOH + $\alpha 5m$, $n = 7$), được cho ăn theo chế độ ăn lỏng Lieber-DeCarli có chứa EtOH và chế phẩm $\alpha 5m$ tùy thích.

Mẫu thử của chế phẩm

Gan ($n = 4$ động vật/nhóm) được xử lý vô cơ cho nặng thêm, được đồng nhất trong tỉ lệ methanol lạnh:nước (v/v, 1:1), và phân chiết theo như Want et al. (Want et al. 2013). Các mẫu thử được chưng cất chân không không dùng hơi nước được thả nổi

lơ lửng trong 120 μ l/50 mg mô của metanol:1 mM TDFHA = 1:1 và được ly tâm ở 16.000 g trong 10 phút ở 4°C. Hai μ l của dung dịch chiết được đặt trực tiếp lên phổ kế và được phân tích như báo cáo bên dưới. Bốn bản sao kỹ thuật của mỗi mẫu thử được thực hiện sử dụng ba phương pháp khác nhau.

Phương pháp sắc ký và việc xác định số lượng axit amin trong gan

Các axit amin tiêu chuẩn được mua từ Sigma (Milan, Ý). Mỗi dung dịch gốc của axit amin được pha chế ở 1 mg/ml nước, được pha loãng tới nồng độ cuối cùng là 3pmol/ μ l, và được truyền trực tiếp 10 μ l/min bằng ống tiêm vào khối phổ kế TripleTOF 5600+ (Hệ thống AB Sciex, Milan, Ý). Do đó, thể phân nhóm (DP) và năng lượng va chạm (CE) được tối ưu hóa cho mỗi axit amin.

Tiếp theo, ba hỗn hợp axit amin được pha chế trên cơ sở thông số DP và CE: Hỗn hợp 1, có chứa threonine, asparagin, tyrosin, và serin, và được phân tích với thông số DP: 30 V, CE: 15 V; Hỗn hợp 2, có chứa glyxin, alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, histidine, methionine, axit aspatic, glutamin, và phenylalanine, và được phân tích với thông số DP: 40 V, CE: 15 V; và Hỗn hợp 3, có chứa axit glutamic, lysin, arginin, và tryptophan, và được phân tích với thông số DP: 80 V, CE: 18 V.

Các tham số ban đầu là: khí 1: 33 psi, khí 2: 58 psi, màng chắn khí: 25 psi, nhiệt độ: 500°C, và ISVF (Điện áp trôi IonSpray): 5500 V.

Để làm được đồ thị thử nghiệm, bốn bản sao kỹ thuật với các lượng khác nhau (10, 33, 50, 100, 200, 400 pmol) của ba hỗn hợp phải được bơm vào khối phổ kế bằng việc phân tách UPLC, sử dụng UPLC 1290 (Agilent Technologies Italia, Cernusco sul Naviglio, Milan, Ý). Cột sắc ký là từ Waters, Acquity HSS T3 C18 2,1 x 100 mm, 1,7 μ m, trong khi giai đoạn biến động là A: 1 mM TDFHA (axit tridecafluoroheptanoic) trong nước; B: 1 mM TDFHA trong acetonitrile. A chênh lệch với B từ 12,5% tới 26,5% trong 4 phút, theo sau là một sự tăng vọt từ 25,5 tới 92% trong 3,5 phút được sử dụng để phân tách tất cả các axit amin, với lưu lượng 0,35 ml/phút và cột nhiệt độ 65°C như mô tả (Le et al., 2014).

Tiêm mẫu tự động được đặt ở 4°C. Các phạm vi mũi tín hiệu và các hồi quy có trọng lượng (1/x cho tất cả các chế phẩm ngoại trừ asparagin, tyrosin, valin, và axit glutamic, đã được điều chỉnh phù hợp thành 1/x²) bằng phương pháp phần mềm MultiQuant phiên bản 2.1 (SCIEX) được sử dụng để vẽ các đồ thị thử nghiệm. Các thông số định lượng cho mỗi axit amin (pmol) ở các mẫu thử trên gan chuột đạt được

từ việc liên kết các phạm vi mũi tín hiệu với các phạm vi bắt nguồn từ các thử nghiệm tiêu chuẩn đang được vận hành bên ngoài và được bình thường hóa thành các mô (mg).

Nuôi cấy tế bào và cách xử lý

Các tế bào HCC HepG2 ở người được mua từ Hệ thống Chung chuẩn của Hoa Kỳ (HB-8065; ATCC, Manassas, VA). Các tế bào được nuôi cấy thông thường trong môi trường RPMI-1640, được bổ sung 10% huyết thanh thai bò, penicillin (100 U/mL), và streptomycin (100 µg/mL), trong môi trường có 5% khí CO₂ ở 37°C. Hai triệu tế bào HepG2 được nuôi cấy mỗi 75 cm² bình (Corning Inc., Corning, NY).

Sau sáu tiếng nuôi cấy, 75 mM (0.34 %) EtOH và 1% BCAAem hoặc α5m được thêm vào, một mình hoặc theo hỗn hợp. Các tế bào chưa được xử lý được bọc vào làm các mẫu đối chứng. Mỗi 24 giờ, môi trường sẽ được thay thế bởi cả các bình đối chứng và các bình đang được xử lý, với môi trường sạch, có hoặc không có lần lượt EtOH và BCAAem hoặc α5m. Bốn ngày sau khi được nuôi cấy, các tế bào được phân ly bằng cách sử dụng trypsin và được nuôi cấy vào các bình mới, hai triệu tế bào có thể phát triển được trong mỗi bình, với sự thay đổi môi trường hàng ngày, như được mô tả trước đó (Pochareddy et al. 2012). Năm ngày sau quá trình phân tách (tổng cộng 9 ngày có hoặc không có lần lượt EtOH, BCAAem hoặc α5m), các tế bào này thu được kết quả như được báo cáo bên dưới cho nhiều xét nghiệm khác nhau.

Phân tích định lượng RT-PCR

Các phản ứng định lượng RT-PCR được thực hiện như mô tả (Tedesco et al. 2008) và hoạt động bằng iQ SybrGreenI SuperMix (Bio-Rad; Segrate, Ý) trên một hệ thống phát hiện iCycler iQ Real-Time PCR (Bio-Rad).

Nói ngắn gọn, ARN bị tách ra khỏi mô bằng bộ công cụ mô mini RNeasy® (Qiagen, Milan, Ý). cDNA được tổng hợp sử dụng bộ công cụ tổng hợp iScript™ cDNA (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Ý).

Các đoạn mồi được thiết kế bằng phần mềm Beacon 2.6 từ Premier Biosoft International (trình tự được báo cáo trong Bảng 2 bên dưới). Các số chu kỳ mà trong đó có thể phát hiện ra các bản sao chép lại khác nhau (ngưỡng chu kỳ, CT) được so sánh với các số của TBP, được xem là ΔCT. Các mức gen tương đối được thể hiện là 2-(ΔΔCT), trong đó ΔΔCT bằng ΔCT của EtOH – hoặc BCAAem – hoặc chuột sử

dụng hỗn hợp CAA (hoặc sử dụng các tế bào HepG2) trừ đi Δ CT của chuột đối chứng (hoặc các tế bào HepG2 không được xử lý).

Gen	Đoạn mồi	Trình tự	Ký hiệu	T _a
PGC-1α	Sense 5'-3'	5'-GACCCCAGAGTCACCAAATGAC-3'	Số 1	60
	Antisense 5'-3'	5'-TTGGTTGGCTTTATGAGGAGGA-3'	Số 2	
Tfam	Sense 5'-3'	5'-AGATTGGGGTCGGGTCAC-3'	Số 3	60
	Antisense 5'-3'	5'-GACAACCTTGCCAAGACAGATG-3'	Số 4	
NRF1	Sense 5'-3'	5'-ACTCGTGTGGGACAGCAAGC-3'	Số 5	60
	Antisense 5'-3'	5'-ATGGTGAGAGGCGGCAGTTC-3'	Số 6	
Cyt c	Sense 5'-3'	5'-CGTTGTGCCAGCGACTAAAAA-3'	Số 7	60
	Antisense 5'-3'	5'-TTCCGCCCAAAGAGACCA-3'	No.8	
TBP	Sense 5'-3'	5'-AGGCACCACAGCTCTTCCAC-3'	Số 9	60
	Antisense 5'-3'	5'-CCCAGAACTCTCCGAAGCTG-3'	Số 10	

Bảng 2

T_a nhiệt độ ủ (°C); Mã số truy cập PGC-1 α : NM_013261; Mã số truy cập Tfam: NM_009360.4; Mã số truy cập NRF1: NM_005011; Mã số truy cập Cytv: JF919224.1; Mã số truy cập TBP: NG_051572 được sử dụng để chuẩn hóa sự biểu hiện gen.

Phân tích thâm tách miễn dịch

Chiết xuất protein được lấy từ gan với thuốc thử chiết xuất protein từ động vật có vú T-PER (Piercem ThermoScientific, Rockford, Hoa Kỳ) như được mô tả bởi nhà sản xuất, cùng với dung dịch chất gây ức chế proteaza và photphataza (Sigma Aldrich, Milan, Ý). Thành phần protein được đo bởi xét nghiệm protein axit bicinchoninic (BCA, Pierce, Euroclone, Milan, Ý), và 50 μ g protein được phân tách sử dụng kỹ thuật điện di đứng SDS-PAGE trong điều kiện khử. Các protein được phân tách sau đó được di chuyển điện di tới màng nitro xenlulozơ (Phòng thí nghiệm Bio-Rad, Segrate, Ý). Các protein quan trọng được tiết lộ với các kháng thể riêng biệt: anti-p62 và anti- α -actin (tất cả là từ Cell Signaling, Euroclone, Milan, Ý), ở tỉ lệ pha loãng 1:1000. Hóa mô miễn dịch được phát hiện ra sử dụng cây cải ngựa liên hợp peroxidazơ không sử dụng được trên thỏ hoặc các globulin miễn dịch không sử dụng được trên chuột trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Lượng protein được đo bằng cách sử dụng chất nền SuperSignal (Pierce, Euroclone, Milan, Ý), và được xác định số lượng bằng tỷ trọng kế với phần mềm phân tích hình ảnh IMAGEJ.

Phân tích thống kê

Đối với tất cả dữ liệu biểu hiện gen, các thử nghiệm t với các biến số theo cặp về hai phía được sử dụng để so sánh giá trị giữa tế bào đối chứng và tế bào xử lý. Giá trị $p < 0,05$ thì được coi là có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ

Chế phẩm $\alpha 5m$ có hiệu quả hơn chế phẩm BCAAem trong việc hồi phục các tăng sinh ty thể gan và các chức năng bị suy yếu do sử dụng EtOH

Dung tích của các chế phẩm BCAAem và $\alpha 5m$ nhằm cải thiện các tăng sinh ty thể bị suy yếu và chức năng do tiếp xúc với EtOH được ước lượng. Nhằm nghiên cứu các cơ chế phân tử bao gồm các ảnh hưởng gây ra bởi các chế phẩm BCAAem và $\alpha 5m$ trong một mẫu thử về độ độc của EtOH ở gan dùng phương pháp trong ống nghiệm in vitro được sử dụng.

Để đạt được điều này, các tế bào gan HepG2 được tiếp xúc với 75 mM EtOH có hoặc không có chế phẩm BCAAem $\alpha 5m$, trong 9 ngày. Chất đồng hoạt hóa γ thụ thể kích hoạt tăng sinh vi thể 1α (PGC- 1α), các yếu tố hô hấp hạt nhân-1 (NRF-1), nhân tổ phiên mã ADN ty thể A (Tfam), và các mức mRNA cyt c là không đổi hoặc thấp hơn một chút ở các tế bào HepG2 tiếp xúc với 75 mM EtOH trong 9 ngày, so với các tế bào đối chứng không được xử lý (Fig. 1).

Tuy nhiên, việc xử lý chế phẩm BCAAem và $\alpha 5m$ trong 9 ngày đã làm tăng mức PGC- 1α và Tfam mRNA đối với cả các tế bào EtOH được xử lý và không được xử lý (Fig. 1).

Đáng chú ý, tính hiệu quả của chế phẩm $\alpha 5m$ nhằm cải thiện chất đánh dấu tăng sinh ty thể có thông số cao hơn so với tính hiệu quả của BCAAem.

Phân tích cơ chế tự thực bào

Thông lượng tự thực bào có thể được suy ra từ việc kết hợp vài chất đánh dấu, bao gồm mức protein của p62/SQSTM1 cùng với tỷ lệ LC3II/LC3I, Beclin1, và photphorin hóa 4EBP1 (Klionsky et al., 2016). p62/SQSTM1 được cho thấy đã được hợp thành trong các autophagosome và bị suy biến trong các autolysosome. Do đó, mức protein p62/SQSTM1 suy giảm chính là sự lý giải cho việc tự thực bào gia tăng (Klionsky et al. 2016).

Như thể hiện trong Fig. 2 của sáng chế, mức protein p62 trong các tế bào HepG2 tiếp xúc với 75 mM EtOH trong 9 ngày thì thấp hơn mức đó trong các tế bào đối chứng chưa được xử lý.

Tuy nhiên, sau 9 ngày xử lý các chế phẩm BCAAem hoặc $\alpha 5m$, mức protein p62 đã cao hơn đối với mức p62 của cả các tế bào không được xử lý và được xử lý với EtOH.

Cũng trong trường hợp này, tính hiệu quả của chế phẩm $\alpha 5m$ có thông số cao hơn tính hiệu quả của chế phẩm BCAAem.

Sự xác định số lượng axit amin ở gan

Như đã bộc lộ bên trên, sự chuyển hóa một axin amin bị biến đổi – chính xác là các mức độ thấp của việc tuần hoàn các BCAA – đã được cho thấy là một đặc điểm nhằm phân biệt các bệnh gan do rượu (Charlton, 2006).

Dữ liệu được cung cấp sau đây nhắc đến ảnh hưởng của các chế phẩm BCAAem hoặc $\alpha 5m$ lên sự chuyển hóa axit amin trong gan của chuột sử dụng EtOH kinh niên.

Để đạt được mục đích này, các mức axit amin tự do được đo bằng việc sử dụng phân tích sắc ký trong mô gan ở chuột chỉ sử dụng EtOH hoặc kết hợp với các chế phẩm thuốc thử.

Như được báo cáo trong Bảng 3, việc bổ sung các chế phẩm BCAAem và $\alpha 5m$ vào Arginin, Leuxin và Tryptophan là không hiệu quả. Ngược lại, việc sử dụng EtOH đã dẫn tới sự giảm thiểu trong mức axit amin ở gan.

Đặc biệt, việc xử lý các chế phẩm BCAAem và $\alpha 5m$ ở chuột sử dụng EtOH đã ngăn chặn việc giảm thiểu Arginin, Leuxin, và Tryptophan.

Ngoài ra, các nồng độ Isoleuxin, Serin, Tyrosin, và Valin thấp hơn trong gan của chuột sử dụng chế độ ăn uống có chứa EtOH.

Mặc dù việc bổ sung BCAAem không thể ngăn chặn sự sụt giảm của các chế phẩm này, sự bổ sung $\alpha 5m$ thì ngược lại khi có hiệu quả trong việc ngăn chặn sự giảm thiểu sử dụng EtOH của isoleuxin và valin.

Các nồng độ của các axit amin còn lại không khác nhau về mặt thông số trong các nhóm.

Các kết quả này nhất quán với khả năng cụ thể của chế phẩm $\alpha 5m$ so sánh với chế phẩm BCAAem trong mức tái chuẩn hóa của các BCAA trong các mẫu thử gan của chuột sử dụng EtOH.

	CTRL	BCAAem	$\alpha 5m$	EtOH	EtOH + BCAAem	EtOH + $\alpha 5m$
Alanin	670.1 $\pm$ 65.7	832.0 $\pm$ 25.0	932.0 $\pm$ 34.0	691.2 $\pm$ 128.0	679.0 $\pm$ 110.0	703.0 $\pm$ 90.0
Arginin	6.6 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 0.8	5.3 $\pm$ 0.7	2.46 $\pm$ 0.5*	4.3 $\pm$ 0.7#	4.6 $\pm$ 0.5#
Asparagin	8.9 $\pm$ 2.4	7.9 $\pm$ 2.7	9.1 $\pm$ 1.7	8.1 $\pm$ 2.1	6.9 $\pm$ 2.8	7.8 $\pm$ 2.3
Glyxin	409.8 $\pm$ 78.2	479.8 $\pm$ 32.0	442.8 $\pm$ 54.0	424.1 $\pm$ 52.0	440.7 $\pm$ 67.2	416.7 $\pm$ 59.2
Axit glutamic	5232.0 $\pm$ 430.0	5394.0 $\pm$ 438.0	5193.0 $\pm$ 328.0	5970.5 $\pm$ 832.0	4717.70 $\pm$ 850	4928.67 $\pm$ 550
Histidin	527.9 $\cdot 10^3 \pm$ 80.3 $\cdot 10^3$	606.8 $\cdot 10^3$ $\pm 10.8 \cdot 10^3$	705.8 $\cdot 10^3$ $\pm 10.5 \cdot 10^3$	461.1 $\cdot 10^3$ $\pm 44.6 \cdot 10^3$	406.0 $\cdot 10^3$ $\pm 19.3 \cdot 10^3$	606.0 $\cdot 10^3$ $\pm 11.3 \cdot 10^3$
Isoleuxin	141.9 $\pm$ 29.7	144.4 $\pm$ 4.5	153.4 $\pm$ 3.4	92.9 $\pm$ 16.6*	93.2 $\pm$ 17.9*	143.1 $\pm$ 16.4#
Leuxin	195.0 $\pm$ 56.4	189.1 $\pm$ 81.9	197.1 $\pm$ 71.6	110.2 $\pm$ 18.8 *	188.9 $\pm$ 92.4#	195.8 $\pm$ 82.3#
Lysin	72.2 $\pm$ 16.8	90.5 $\pm$ 19.7	87.5 $\pm$ 17.8	62.3 $\pm$ 9.6	53.3 $\pm$ 6.4	67.2 $\pm$ 7.3
Methion.	12.9 $\pm$ 5.5	17.9 $\pm$ 5.3	16.5 $\pm$ 3.9	11.9 $\pm$ 3.9	17.8 $\pm$ 4.7	15.9 $\pm$ 5.1
Phenylal.	32.0 $\pm$ 13.2	36.4 $\pm$ 4.8	39.2 $\pm$ 3.3	27.7 $\pm$ 10.2	28.8 $\pm$ 5.2	35.6 $\pm$ 4.5
Prolin	33.7 $\pm$ 5.2	33.5 $\pm$ 1.3	33.9 $\pm$ 2.3	27.2 $\pm$ 8.7	24.6 $\pm$ 4.2	31.7 $\pm$ 3.9
Serin	348.7 $\pm$ 33.9	362.4 $\pm$ 9.9	385.4 $\pm$ 10.9	220.7 $\pm$ 58.4*	215.4 $\pm$ 43.0*	342.4 $\pm$ 39.1*
Threonin	55.5 $\pm$ 2.41	52.2 $\pm$ 2.0	51.2 $\pm$ 1.7	52.9 $\pm$ 2.5	51.5 $\pm$ 2.2	53.5 $\pm$ 1.7
Tryptop.	1252.8 $\cdot 10^3$ $\pm$ 226.4 $\cdot 10^3$	1350.4 $\cdot 10^3$ $\pm$ 74.54 $\cdot 10^3$	1299.4 $\cdot 10^3$ $\pm 99.4 \cdot 10^3$	787.1 $\cdot 10^3$ $\pm$ 112.7 $\cdot 10^3$ *	1038.2 $\cdot 10^3$ $\pm$ 169.9 $\cdot 10^3$ #	1178.2 $\cdot 10^3$ $\pm$ 178.9 $\cdot 10^3$ #

Tyrosin	514.5 ± 63.3	382.6 ± 19.7	472.6 ± 29.7	311.7 ± 71.89 *	274.6 ± 39.7*	354.8 ± 35.6*
Valin	429.9 ± 46.7	455.3 ± 17.7	564.3 ± 20.7	291.9 ± 61.1	290.8 ± 48.9	450.8 ± 62.7#

Bảng 3

Các thông số được báo cáo như một cách thức $\pm$ SD (pmol/mg của mô), $n = 4$ loài động vật/nhóm; * $P < 0.05$ so với nhóm CTRL; #giá trị $P < 0.05$ so với nhóm EtOH.

Tổng kết lại, kết quả của phương pháp trong ống nghiệm *in vitro* và phương pháp thử nghiệm sử dụng động vật thí nghiệm *in vivo* cho thấy chế độ ăn uống bổ sung một chế phẩm bao gồm một hoạt chất, hoạt chất đó chứa hỗn hợp của leuxin, isoleuxin, valin, threonine, lysin, axit citric, axit succinic, và axit malic có hiệu quả đáng kể trong việc phòng ngừa các tổn thương ty thể của các tế bào nhu mô gan tiếp xúc với EtOH.

Sự tác động này thường đi kèm với sự sụt giảm của cơ chế tự thực bào (tức là, sự gia tăng mức protein p62) mà gia tăng (tức là, sự sụt giảm mức protein p62) do tiếp xúc với EtOH.

EtOH *thực chất* có thể làm tăng cơ chế tự thực bào nhằm đền bù cho độ độc của EtOH và, nói cụ thể, các tổn thương ty thể mà rõ ràng trong các tế bào nhu mô gan tiếp xúc với cồn và trong gan của các động vật tiêu thụ cồn.

Thực chất, tự thực bào là một cơ chế tế bào nhằm mục đích loại trừ những trục trặc trong các cơ quan tế bào, bao gồm ty thể. Khi các tế bào nhu mô gan tiếp xúc với cồn và các chức năng ty thể bị sụt giảm, cơ chế tự thực bào gia tăng, cũng được bộc lộ trong sáng chế này, là hữu ích trong việc loại trừ những trục trặc ty thể.

Các chế phẩm axit amin được bộc lộ, bao gồm hỗn hợp của leuxin, isoleuxin, valin, threonine, lysin, cùng với axit citric, axit succinic, và axit malic, có thể phòng ngừa tổn thương ty thể, do đó các tế bào không cần cơ chế tự thực bào để duy trì chức năng hoạt động của nó. Vì vậy, cơ chế tự thực bào suy giảm (như được thể hiện trong mức protein p62 gia tăng, thể hiện trong sáng chế này).

Hơn nữa, và quan trọng nhất là, chế phẩm được bộc lộ đã được phát hiện là rất hiệu quả trong việc phục hồi các nồng độ BCAA tự do, Arginin, và Tryptophan trong gan của chuột sử dụng EtOH.

Đáng chú ý, các kết quả sơ bộ cho thấy các chế phẩm axit amin được bọc lộ bao gồm hỗn hợp của leuxin, isoleuxin, valin, threonine, lysin, cùng với axit citric, axit succinic, và axit malic cũng có thể làm giảm đường kính của các giọt nhỏ lipid trong các tế bào nhu mô gan của chuột mà sử dụng chế độ ăn uống nhiều chất béo trong vòng 6 tháng (HFD, 60% calo từ chất béo), một mẫu chuột được sử dụng rộng rãi của bệnh NAFLD. Nhìn chung các kết quả này đã chứng minh rõ ràng khái niệm rằng các chế phẩm axit amin được bọc lộ và có trong độ độc của gan phụ thuộc vào rượu, có thể có lợi cho sức khỏe trong việc phòng ngừa sự phát triển và tình trạng tệ đi của bệnh NAFLD.

Như đã đề cập trước đó, có thể thấy một điểm rõ ràng vô cùng nổi bật đó là các chế phẩm theo như bản bọc lộ này có ích trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh về gan trên toàn thế giới và có ảnh hưởng tới số lượng lớn dân số là người trưởng thành, cùng với những chi phí xã hội ngày một gia tăng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Charlton M. (2006) Thành phần bổ sung hương vị có axit amin chuỗi nhánh như một liệu pháp chữa bệnh gan. Tạp chí về Dinh dưỡng số 136: 295S-298S.

Cho HI, Choi JW, Lee SM (2014) Sự suy yếu của phản ứng tổng hợp autophagosome-lysosome dẫn tới các thương tổn ở gan gây ra do sử dụng etanol kinh niên. Tạp chí Ancol số 48:717-725.

Cooper GM and Hausman RE (2009) Tế bào. Một cách tiếp cận từ phân tử. Năng lượng sinh học và sự trao đổi chất. Ty thể, lục lạp và vi thể perôxixôm. Tạp chí nhỏ số 11: 432-468.

Ding WX, Li M, Chen X, Ni HM, Lin CW, Gao W, Lu B, Stolz DB, Clemens DL, Yin XM (2010) Cơ chế tự thực bào làm giảm độc tố cấp tính gây ra bởi etanol và chứng gan thoái hóa mỡ ở chuột. Nghiên cứu về tiêu hóa số 139:1740-1752.

Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H (2010) Sự điều tiết mTOR của cơ chế tự thực bào. Tạp chí phi lợi nhuận FEBS Letter số 584:1287-1295.

Klionsky DJ et al (2016) Nguyên tắc sử dụng và giải thích các thí nghiệm giám sát cơ chế tự thực bào (Phiên bản thứ 3). Về cơ chế tự thực bào số 12:1-222.

Lin CW, Zhang H, Li M, Xiong X, Chen X, Chen X, Dong XC, Yin XM (2013) Những khuyến khích mang tính dược lý về việc sử dụng cơ chế tự thực bào làm giảm nhẹ chứng gan thoái hóa mỡ và các thương tổn trong các tình trạng gan nhiễm mỡ do rượu và không do rượu ở chuột. Tạp chí nghiên cứu về gan số 58:993-999.

Lin Wang, Bilon Khambu, Hao Zhang, Xiao-Ming Yin (2015) Cơ chế tự thực bào trong bệnh gan do rượu, chứng tự thực gây ra bởi uống rượu bia. Các bài giảng lâm sàng và nghiên cứu về gan và dạ dày số 39, S2-S6.

Le A, Ng A, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Cowan TM. (2014) Một phương pháp nhạy và nhanh chóng trong phân tích định lượng các axit amin kém hoạt động bằng phương pháp sắc ký lỏng - phổ khối lượng (LC-MS/MS). Tạp chí về Sắc ký lỏng B Công nghệ nghiên cứu trong y sinh học và khoa học đời sống số 944: 166-174.

Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB and Bailey SM (2008) Hoạt động khác thường của ty thể và sự mất cân bằng oxy hóa trong sự phát bệnh do rượu - và các bệnh gan nhiễm mỡ gây ra bởi béo phì. Nguồn gốc phong phú của Sinh học và y học số 44: 1259-1272.

Ni H-M, Du K, You M, Ding W-X (2013) Vai trò quan trọng của FoxO3a trong cơ chế tự thực bào gây ra bởi rượu và độ độc trong gan. Tạp chí của Mỹ về nghiên cứu bệnh lý số 183:1815–1825.

Pochareddy S, Edenberg HJ. (2012) Sử dụng rượu bia kinh niên làm thay đổi các biểu hiện gen ở tế bào HepG2. Tạp chí khoa học về Chứng nghiện rượu: Các nghiên cứu về phương pháp chữa bệnh và thí nghiệm số 36: 1021-1033.

Tedesco L, Valerio A, Cervino C, Cardile A, Pagano C, Vettor R, Pasquali R, Carruba MO, Marsicano G, Lutz B, Pagotto U, and Nisoli E. (2008) Tác nghẽn thụ thể CB1 gây ra sự tăng sinh ty thể thông qua các biểu hiện của men eNOS ở mỡ trắng. Về bệnh tiểu đường số 57: 2028-2036.

Thomes PG, Trambly CS, Fox HS, Tuma DJ, Donohue TM Jr (2015) Việc ít và thường xuyên sử dụng etanol đã có những điều chỉnh khác nhau về chứng tự thực bào ở gan và các yếu tố phiên mã EB. Tạp chí khoa học về Chứng nghiện rượu: Các nghiên cứu về phương pháp chữa bệnh và thí nghiệm số 39:2354–2363. <https://doi.org/10.1111/acer.12904>.

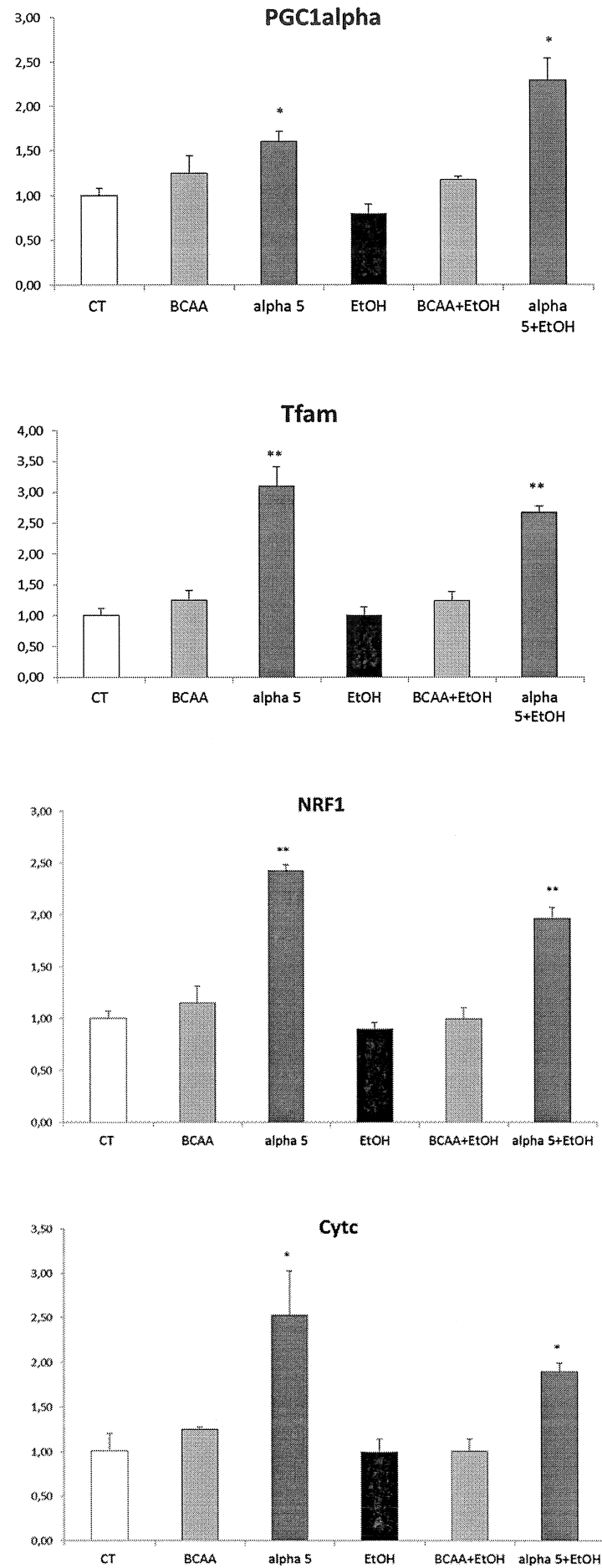
Valerio A, D'Antona G, Nisoli E. (2011) Các axit amin chuỗi nhánh, tăng sinh ty thể, và sự kéo dài chất lượng sức khỏe: Một thuyết tiến hóa. Về sự lão hóa số 3: 464-478.

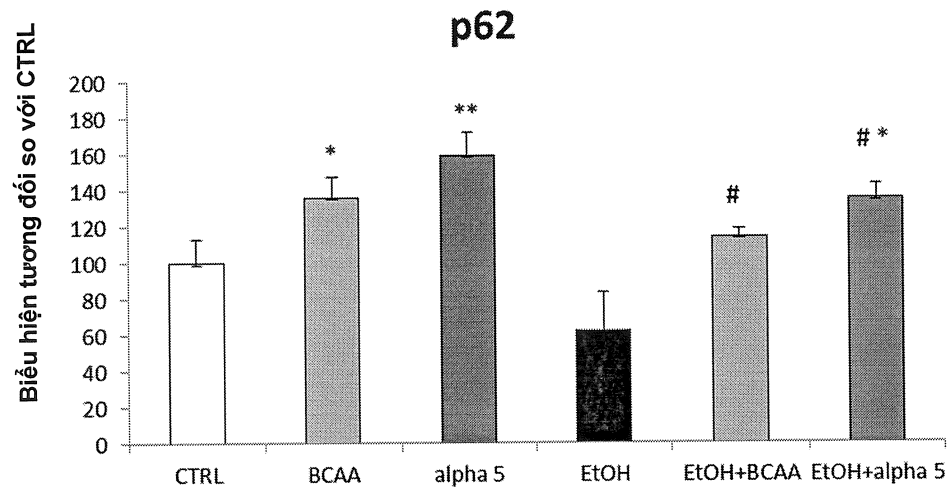
Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. (2013) Định hình biến thể toàn bộ của mô ở động vật và mô ở người thông qua UPLC-MS. Tạp chí Giao thức tự nhiên số 8: 17-32.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa axit amin sử dụng trong phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh gan ở loài động vật có vú, chế phẩm bao gồm hoạt chất, hoạt chất đó có chứa các axit amin leucin, isoleucin, valin, threonin, lysin và các axit cacboxylic bao gồm axit citric, axit succinic, axit malic, trong đó chế phẩm không chứa arginin.
2. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm 1, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa tổng lượng axit xitric, axit malic, axit succinic, và tổng lượng leucin, isoleucin, valin, lysin, threonin nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,3, tốt nhất là từ 0,1 đến 0,25.
3. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa tổng lượng axit xitric, axit malic, axit succinic và tổng lượng leucin, isoleucin, valin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,4, tốt nhất là từ 0,15 đến 0,35.
4. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa axit citric và tổng axit malic và axit succinic nằm trong khoảng từ 1,0 đến 4,0, tốt nhất là từ 1,5 đến 2,5.
5. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó tỷ lệ trọng lượng axit xitric:axit malic:axit succinic nằm trong khoảng từ 10:1:1 đến 2:1,5:1,5, tốt hơn là trong khoảng từ 7:1:1 đến 1,5:1:1, tốt thêm vào đó là trong khoảng từ 5:1:1 đến 3:1:1.
6. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó hoạt chất đã nêu bao gồm thêm ít nhất một axit amin được chọn trong nhóm bao gồm histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, tyrosin, cystein.
7. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó hoạt chất đã nêu bao gồm thêm histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, cystein và có thể thêm tyrosin.

8. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó tỷ lệ giữa tổng số mol axit xitric, axit malic, axit succinic và tổng số mol của methionin, phenylalanin, histidin và tryptophan cao hơn 1,35.
9. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó tỷ lệ giữa tổng số mol của ba axit cacboxylic axit xitric, axit succinic, axit malic và tổng số mol của lysin và threonin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,7, tốt nhất là từ 0,15 đến 0,55.
10. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó trọng lượng hoặc số mol của axit xitric cao hơn tổng trọng lượng hoặc tổng số mol của cả axit malic và axit succinic.
11. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa leucin và axit xitric nằm trong khoảng từ 5 đến 1, tốt nhất là trong khoảng từ 2,50 đến 3,50.
12. Chế phẩm cho việc sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm đã nêu, trong đó chế phẩm còn bao gồm thêm một hoặc nhiều vitamin, tốt nhất là được chọn trong nhóm vitamin B, chẳng hạn như vitamin B1 và/hoặc vitamin B6.

**Fig. 1**

**Fig. 2**