

## АКТИВНІСТЬ NADH-УБІХІНОНРЕДУКТАЗИ ТА СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ, ІНДУКОВАНОГО АЦЕТОАМІНОФЕНОМ НА ТЛІ АЛІМЕНТАРНОЇ НЕСТАЧІ ПРОТЕЇНУ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, О. М. ВОЛОЩУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,  
Інститут біології, хімії та біоресурсів, Україна;  
e-mail: kopilchuk@gmail.com

У роботі досліджувались співвідношення редокс-форм нікотинамідних коензимів і ензиматична активність I та II комплексів дихального ланцюга мітохондрій клітин печінки щурів з ацетоамінофеніндукованим гепатитом за аліментарної нестачі протеїну. Встановлено, що за умов гепатиту, індукованого ацетоамінофеном після попереднього 4-тижневого утримання щурів на низькопротеїновій дієті, в мітохондріальній фракції клітин печінки спостерігається статистично вірогідне зниження величин активності NADH-убіхінонредуктази та сукцинатдегідрогенази з одночасним підвищенням співвідношення редокс-форм нікотинамідних коензимів ( $NAD^+/NADH$ ) порівняно з аналогічними показниками в клітинах печінки тварин з експериментальним гепатитом, які отримували харчовий раціон, збалансований за всіма нутрієнтами. Результати досліджень можуть стати базовими для біохімічного обґрунтування підходів до корекції й усунення порушень енергетичного обміну за токсичного гепатиту, індукованого ацетоамінофеном на фоні аліментарної нестачі протеїну.

**Ключові слова:** аліментарна нестача протеїну, ацетоамінофеніндуковане пошкодження печінки, NADH-убіхінонредуктаза, співвідношення редокс-форм нікотинамідних коензимів, сукцинатдегідрогеназа.

**З**а умов обмеженого надходження протеїну метаболічна адаптація спрямована на забезпечення органів і тканин енергією та структурними субстратами за рахунок утилізації власних запасів, що супроводжується розвитком стану гіперкатаболізму [1, 2]. Синдром гіперкатаболізму характеризується різким збільшенням потреби в донаторах енергії та пластичному матеріалі, наслідком чого є дисрегуляторні зміни метаболічних процесів, переважання катаболічного типу реакцій перетворення основних макромолекул організму [3]. Загальна реакція організму за умов аліментарної депривації протеїну зводиться до поетапного відключення низки енергозалежних процесів, спрямованих на мобілізацію наявних енергетичних ресурсів [4]. Проблема біохімічних механізмів формування дисбалансу системи біотрансформації енергії в умовах нестачі

есенціальних нутрієнтів на сьогодні залишається відкритою і потребує детального дослідження [5, 6]. Для розгляду біохімічних механізмів дисбалансу мітохондріальної системи енергозабезпечення у разі токсичного ураження печінки тварин, утримуваних на харчовому раціоні з різним забезпеченням протеїном, актуальним є визначення ланок, що лімітують її можливості. З одного боку, вирішальним у порушенні функціонування системи біотрансформації енергії можуть бути зміни на рівні структурно-функціональної організації ензиматичних комплексів дихального ланцюга мітохондрій, а з іншого – дефіцит субстратів окислення.

Мета роботи – дослідження активності NADH-убіхінонредуктази (1.6.5.3), сукцинатдегідрогенази (1.3.5.1) та співвідношення редокс-форм нікотинамідних коензимів ( $NAD^+/NADH$ ) у мітохондріальній

фракції клітин печінки щурів із токсичним гепатитом, індукованим ацетоамінофеном на фоні аліментарної нестачі протеїну.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 90–100 г, віком 2–2,5 місяці. Всі маніпуляції із тваринами проводили відповідно до вимог міжнародної конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей.

Щурів утримували по одному в пластмасових клітках із піщаною підстилкою, доступ до води *ad libitum*. Нормування добового раціону здійснювали з урахуванням принципу парного харчування.

Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи: I група – щури, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні (К); II група – щури з ацетоамінофеніндукованим ураженням печінки, які перебували на повноцінному раціоні (Г); III – щури з ацетоамінофеніндукованим ураженням печінки, які попередньо перебували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні (НПР+Г).

Тварини I та II групи отримували раціон, що містив 14% протеїну (у вигляді казеїну), 10% жирів, 76% вуглеводів, збалансований за всіма нутрієнтами. Тварини III групи отримували ізоенергетичний раціон, що містив 4,7% протеїну, 10% жирів та 85,3% вуглеводів, розрахований згідно з рекомендаціями American Institute of Nutrition [6, 7].

Після чотириденного утримання тварин на експериментальній дієті моделювання ацетоамінофеніндукованого ураження печінки здійснювали шляхом введення *per os* ацетоамінофену в дозі 1 г/кг маси тварин у 2%-й крохмальній суспензії протягом 2 діб через 24 год за допомогою спеціального зонда [8].

Цервікальну дислокацію тварин проводили під легким ефірним наркозом на 31-шу добу експерименту.

Виділення мітохондріальної фракції здійснювали методом диференційного центрифугування в середовищі гомогенізації: 250 мМ сахароза, 1 мМ ЕДТА, 10 мМ трис-НСl, рН 7,4 при 0–3 °С [9].

Активність NADH-убіхінонредуктази визначали спектрофотометрично і розра-

ховували з використанням коефіцієнта молярного поглинання  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [10]. Активність NADH: фериціанідредуктази визначали фериціанідним методом за швидкістю відновлення гексаціаноферату калію [11]; сукцинатдегідрогенази – за інтенсивністю відновлення фериціаніду калію [12]; вміст протеїну – за методом Лоурі [13].

Співвідношення між окисленою та відновленою формами нікотинамідних коензимів NAD<sup>+</sup>/NADH розраховували за константою рівноваги малатдегідрогеназної реакції [14]:

$$\begin{aligned} \frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}+\text{H}^+]} &= \\ &= (1/2,78 \times 10^{-5}) \times [\text{оксалоацетат}]/[\text{малат}]. \end{aligned}$$

Концентрацію оксалоацетату встановлювали колориметричним методом, який базується на взаємодії оксалоацетату з *n*-нітроаналіном з утворенням NN'-біс-(*n*-нітрофеніл)-С-оксалілформазау, максимум поглинання якого  $\lambda = 450 \text{ нм}$  [15], а концентрацію малату – спектрофотометричним методом за накопиченням NADH, еквімолярного кількості окисленого малату, при  $\lambda = 340 \text{ нм}$  [16].

Одержані дані статистично обробляли за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Excel». Результати представляли як середнє значення 9 незалежних визначень  $\pm$  похибка середнього. Статистичну значимість різниці середніх показників оцінювали, використовуючи стандартний *t*-критерій Стьюдента.

### Результати та обговорення

Результатами наших досліджень встановлено зниження активності NADH-убіхінонредуктази мітохондріальної фракції печінки щурів з ацетоамінофеніндукованим гепатитом вдвічі порівняно з показниками контролю. Ймовірно, причиною встановленого факту може бути порушення структурно-функціональної організації комплексу I дихального ланцюга в цих експериментальних умовах. Слід відмітити, що одним із механізмів гепатотоксичної дії ацетоамінофену є зв'язування його метаболіту – N-ацетил-*n*-бензохіноніміну (NAPQI), утворюваного за участю цитохрому P450, – із протеїнами дихального ланцюга через залишки цистеїну. Враховуючи, що структурними компонентами NADH-убіхінонредуктазного комплексу є залізо-сірчані кластери, збагачені залишками

цистеїну, ймовірно, одним із механізмів порушення функціональної активності досліджуваного ензиму є утворення комплексів NARQI-протеїн. На сьогодні утворення ковалентних комплексів метаболітів ацетоамінофену з мітохондріальними протеїнами розглядається як тригер первинної мітохондріальної дисфункції, що визначає дисбаланс процесів енергозабезпечення [17, 18].

Водночас слід зазначити, що в щурів з гепатопатологією в умовах аліментарної нестачі протеїну спостерігається тенденція до подальшого зниження активності досліджуваного ензиму (рис. 1). Оскільки структурними компонентами NADH-убіхінонредуктази є субодиниці мітохондріального кодування ND1-ND6 та ND4L, то, ймовірно, за нестачі протеїну в харчовому раціоні спостерігається порушення синтезу зазначених субодиниць.

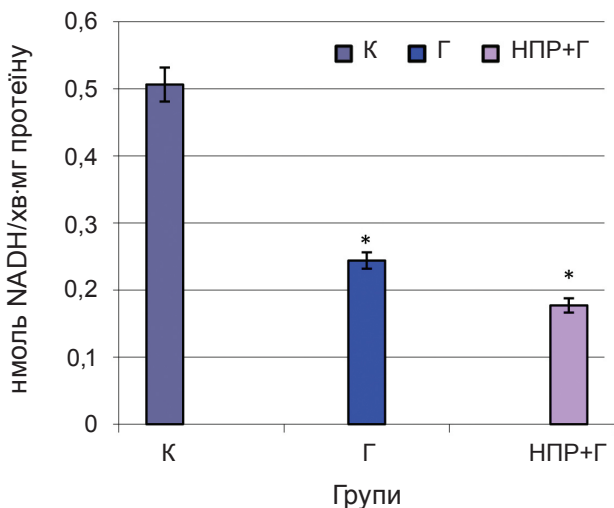


Рис. 1. Активність NADH-убіхінонредуктази мітохондріальної фракції печінки щурів за токсичного гепатиту, індукованого ацетоамінофеном на фоні аліментарної нестачі протеїну. Тут і на рис. 2–4: К – контроль; Г – щурі з ацетоамінофеніндукованим ураженням печінки, які перебували на повноцінному раціоні; НПП+Г – щури з ацетоамінофеніндукованим ураженням печінки, які перебували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні. \* Різниця порівняно з контролем вірогідна ( $n = 9, P < 0,05$ ); \*\* різниця порівняно з тваринами з ацетоамінофеніндукованим ураженням печінки, які перебували на повноцінному раціоні, вірогідна ( $n = 9, P < 0,05$ )

Ще одним маркером функціональної активності комплексу I вважається NADH-фериціанідредуктазна реакція. Використання штучного акцептора електронів – фериціаніду, здатного взаємодіяти з гідрофільною частиною комплексу I дихального ланцюга і ефективно перехоплювати електрони [10], дозволяє визначити критичні ділянки в його роботі. Результати проведених досліджень показали, що в щурів з ацетоамінофеніндукованим гепатитом спостерігається зниження активності NADH:фериціанідредуктази в 3 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 2).

Встановлений факт свідчить, що за токсичного ураження печінки відбувається порушення транспорту електронів у дихальний ланцюг від NADH-залежних субстратів. Враховуючи, що фериціанідредуктазна активність властива лише для невеликого фрагмента комплексу I, до якого входять 3 субодиниці, два залізо-сірчані кластери [19], а також FMN – первинний акцептор електронів від NADH, то, вірогідно, встановлений нами факт зниження активності NADH-убіхінонредуктази значною мірою пов'язаний з порушенням функціональної здатності саме цього фрагмента досліджуваного ензиматичного комплексу.

Водночас у групах тварин з ацетоамінофеніндукованим ураженням печінки, які утримувалися за різних режимів протеїнового харчування, вірогідних відмінностей рівня активності NADH:фериціанідредуктази не встановлено.

Дослідження мітохондріального співвідношення окислених і відновлених форм нікотинамідних коензимів, розрахованих з урахуванням константи рівноваги малатдегідрогеназної активності показало, що в мітохондріях клітин печінки щурів з ацетоамінофеніндукованим гепатитом вірогідної різниці досліджуваного показника порівняно з контролем не спостерігається (рис. 3).

Одержані результати вказують, що зниження активності NADH-убіхінонредуктази за ацетоамінофеніндукованого гепатиту спричинене порушенням структурно-функціональної організації комплексу I дихального ланцюга, а не дефіцитом субстрату для його роботи. Водночас у мітохондріальній фракції печінки щурів із токсичним гепатитом, що утримувалися в умовах

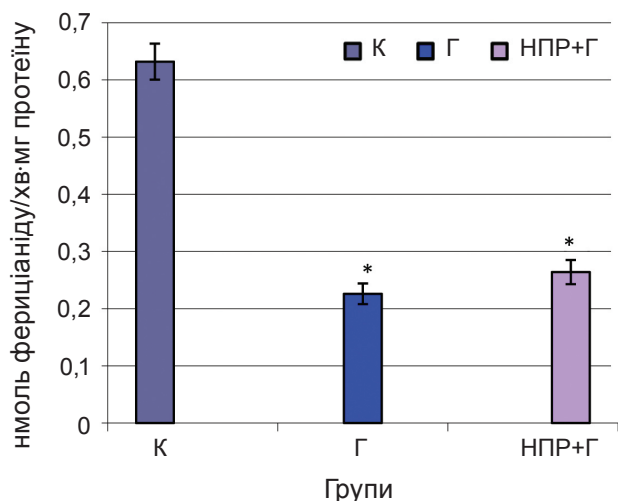


Рис. 2. Активність *NADH:ферриціанідредуктази* в мітохондріальній фракції печінки щурів за ацетоамінофеніндукованого гепатиту на фоні аліментарної нестачі протеїну

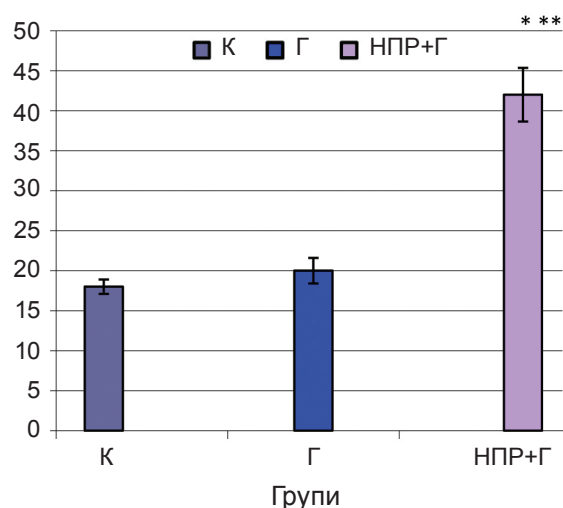


Рис. 3. Співвідношення  $NAD^+/NADH$  у мітохондріальній фракції печінки щурів за ацетоамінофеніндукованого гепатиту на фоні аліментарної нестачі протеїну

аліментарної нестачі протеїну, зареєстровано підвищення співвідношення  $NAD^+/NADH$  більше ніж у 2 рази. Наслідком встановлених змін, ймовірно, буде порушення постачання інтермедіатів для роботи комплексу I електронотransпортного ланцюга. Враховуючи, що співвідношення  $NAD^+/NADH$  у мітохондріях є показником енергетичного стану клітини та ключовим регулятором енергетичного метаболізму, визначаючи швидкість і напрям реакцій енергозабезпечення та контроль функціонування загальних метаболічних шляхів у клітині [20], відхилення співвідношення  $NAD^+/NADH$  від контролю може розглядатися як один із механізмів порушення клітинної біоенергетики в умовах аліментарної нестачі протеїну.

Слід зазначити, що за токсичного гепатиту, індукованого ацетоамінофеном на фоні аліментарної нестачі протеїну, в мітохондріях печінки щурів спостерігається зниження активності сукцинатдегідрогенази – ключового ензиму комплексу II дихального ланцюга, що виконує роль посередника між FAD-залежними субстратами і електронотransпортним ланцюгом [21]. Результати наших досліджень засвідчили зниження активності сукцинатдегідрогенази у 2,4 рази порівняно з контролем і в 1,5 рази порівняно з показниками в тварин із токсичним гепатитом, що утримувались на повноцінному харчовому раціоні (рис. 4).

Отже, встановлене зниження *NADH-убіхінонредуктазної* і *сукцинатдегідрогеназної* активності відповідно I і II комплексів дихального ланцюга та підвищення співвідношення редокс-форм нікотинамідних коензимів у мітохондріях печінки щурів можуть розглядатися як один із механізмів порушення роботи біотрансформації енергії за

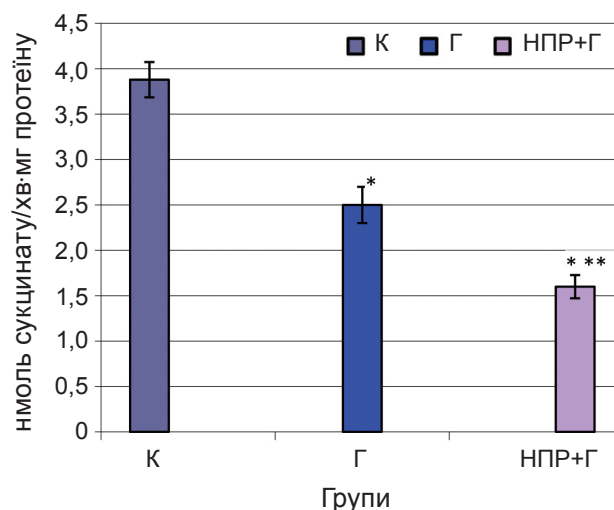


Рис. 4. Активність *сукцинатдегідрогенази* в мітохондріальній фракції печінки щурів за ацетоамінофеніндукованого гепатиту на фоні аліментарної нестачі протеїну



ацетоамінофеніндукованого гепатиту на фоні аліментарної нестачі протеїну.

Результати досліджень можуть стати базовими для біохімічного обґрунтування підходів до корекції та усунення наслідків порушення енергетичного обміну за токсичного гепатиту, індукованого ацетоамінофеном на фоні дефіциту харчового протеїну.

**АКТИВНОСТЬ NADH-УБИХИНОНРЕДУКТАЗЫ И СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ АЦЕТАМИНОФЕНОМ НА ФОНЕ АЛИМЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРОТЕИНА**

*Г. П. Копильчук, О. Н. Волощук*

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, Институт биологии, химии и биоресурсов, Украина; e-mail: kopilchuk@gmail.com

В работе исследовано соотношение редокс-форм никотинамидных коэнзимов наряду с ключевой энзиматической активностью I и II комплексов дыхательной цепи митохондрий клеток печени крыс с ацетаминофеніндуцированным гепатитом в условиях алиментарной депривации протеина. Установлено, что в условиях гепатита, индуцированного ацетаминофеном, после предварительного 4-недельного содержания крыс на низкопротеиновой диете, в митохондриальной фракции клеток печени наблюдается статистически достоверное снижение NADH-убихинонредуктазной и сукцинатдегидрогеназной активности с одновременным увеличением соотношения редокс-форм никотинамидных коэнзимов (NAD<sup>+</sup>/NADH) по сравнению с аналогичными показателями в клетках печени животных с экспериментальным гепатитом, содержащихся на сбалансированном по всем нутриентам пищевом рационе. Результаты исследований могут стать базовыми для биохимического обоснования подходов к коррекции и устранению последствий нарушения энергетического обмена при токсическом гепатите, индуцированном на фоне алиментарной протеиновой недостаточности.

**Ключевые слова:** алиментарная депривация протеина, ацетаминофеніндуцированное повреждение печени, NADH-убихинонредуктаза, соотношение редокс-форм никотинамидных коэнзимов, сукцинатдегидрогеназа.

**NADH:UBIQUINONE REDUCTASE AND SUCCINATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN THE LIVER OF RATS WITH ACETAMINOPHEN-INDUCED TOXIC HEPATITIS ON THE BACKGROUND OF ALIMENTARY PROTEIN DEFICIENCY**

*G. P. Kopylchuk, O. M. Voloshchuk*

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Institute of Biology, Chemistry and Life, Ukraine; e-mail: kopilchuk@gmail.com

The ratio between the redox forms of the nicotinamide coenzymes and key enzymatic activity of the I and II respiratory chain complexes in the liver cells mitochondria of rats with acetaminophen-induced hepatitis under the conditions of alimentary deprivation of protein was studied. It was estimated, that under the conditions of acute acetaminophen-induced hepatitis of rats kept on a low-protein diet during 4 weeks a significant decrease of the NADH:ubiquinone reductase and succinate dehydrogenase activity with simultaneous increase of the ratio between redox forms of the nicotinamide coenzymes (NAD<sup>+</sup>/NADH) is observed compared to the same indices in the liver cells of animals with experimental hepatitis kept on the ration balanced by all nutrients. Results of research may become basic ones for the biochemical rationale for the approaches directed to the correction and elimination of the consequences of energy exchange in the toxic hepatitis, induced on the background of protein deficiency.

**Key words:** alimentary deprivation of protein, acetaminophen-induced hepatitis, NADH:ubiquinone reductase, the ratio between the redox forms of the nicotinamide coenzymes, succinate dehydrogenase.

References

1. Kharchenko N. V., Anokhina G. A., Kravchenko V. V. Optimization of the parenteral nutrition of patient during the postoperative period. *Suchasna Gastroenterologia*. 2012;(4(66)):76-79. (In Russian).
2. Antonov A. P., Batalova Ye. Yu., Novoselov Ya. B. The peculiarities of the catabolic syndrome course in persons with decreased body weight against the background functional nutrition. *Biomed. Journ.* 2006;7(2):427-434. (In Russian).
3. Pasini E., Aquilani R., Dioguardi F. S., D'Antona G., Gheorghiadu M., Taegtmeyer H. Hypercatabolic syndrome: Molecular basis and effects of nutritional supplements with aminoacids. *Am. J. Cardiol.* 2008;101(1):11E-15E.
4. Kashuro V. A., Dolgo-Saburov V. B., Bashrin V. A. Some mechanisms of the bioenergetics disturbances and optimization of approaches to their pharmacotherapy. *Biomed. Journ.* – 2010;11(4):611-634. (In Russian).
5. Theys N., Bouckenooghe T., Ahn M. T., Remacle C., Reusens B. Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009;297:1516-1525.
6. Voloshchuk O. N., Kopylchuk G. P., Kadayskaia T. G. State of the energy-supply system of the liver mitochondria under the conditions of alimentary deficiency of protein. *Vopr. Pitaniia*. 2014;(3):12-16. (In Russian).
7. Reeves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C. 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;(5):1939-1951.
8. Kuvandik G., Duru M., Nacar A. Effects of erdosteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol. Pathology*. 2008;36:714-719.
9. Marchenko M. M., Kopyl'chuk G. P., Voloshchuk O. M. The influence of the low-level irradiation on the fractional content of the mitochondria proteins and mtDNA of Guerins' carcinoma. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2008;80(4):114-119. (In Ukrainian).
10. Sharova I. V., Vekshin N. L. Rotenone-insensitive NADH oxydation in mitochondrial suspension occurs by NADH dehydrogenase of respiratory chain fragments. *Biophysic.* 2004;49(5):814-821.
11. Sokolova I. B., Vekshin N. L. Loss of the flavin NADH-dehydrogenase by the mitochondria complex. *Biofizika*. 2008;53(1):73-77. (In Russian).
12. Marchenko M. M., Kopyl'chuk G. P., Voloshchuk O. M. Energy-producing enzymes activity of Guerin's carcinoma, transplanted on the low doses irradiation background. *Doklady NAN Ukrainy*. 2011;(1):153-156. (In Ukrainian).
13. Lowry O. H., Rosenbrough M. J., Farr A. L., Randal R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1):265-275.
14. Williamson D. H., Lund P., Krebs H.A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem. J.* 1967;103:514-527.
15. Kalnitsky G., Tapley D. F. A sensitive method for estimation of oxaloacetate. *Biochem. J.* 1958;70:28-34.
16. Prokhorova M. I. Metody biokhimicheskikh issledovaniy (lipidnyi i energeticheskiy obmen). L.: Izdatel'stvo Leningradskogo universiteta, 1982. 272 p. (In Russian).
17. Andringa K. K., Bajt M. L., Jaeschke H., Bailey S. M. Mitochondrial Protein Thiol Modifications in Acetaminophen Hepatotoxicity: Effect on HMG-CoA Synthase. *Toxicol. Lett.* 2008;177(3):188-197.
18. Heard K. J., Green J. L., James L. P., Judge B. S., Zolot L., Rhyee S., Dart R. C. Acetaminophen-cysteine adducts during therapeutic dosing and following overdose. *BMC Gastroenterology*. 2011;11:20-29.
19. Grivennikova V. G., Vinogradov A. D. Mitochondrial complex I. *Uspekhi Biol. Khimii*. 2003;43:19-58. (In Russian).
20. Stein L. R., Imai S.-I. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(9):420-428.
21. Miles B. The electron Transport Chain. *LSM*. 2003;2:1-11.

Отримано 12.09.2014