

АКТИВНІСТЬ NAD^+ -ЗАЛЕЖНИХ ФЕРМЕНТІВ ЦИКЛУ КРЕБСА ЗА УМОВ АЛІМЕНТАРНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ ПРОТЕЇНУ

О. М. ВОЛОЩУК, Г. П. КОПИЛЬЧУК, О. М. КОМІНКО

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58000
e-mail: oxbt@mail.ru

Робота присвячена вивченню ізоцитратдегідрогеназної, α -кетоглутаратдегідрогеназної, малатдегідрогеназної реакції циклу Кребса та співвідношенню $NAD^+/NADH$ у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов аліментарної депривації протеїну. Дослідження проведені на білих безпородних щурах масою 90 – 100 г, віком 2 – 2,5 місяці, поділених в залежності від кількості білка у раціоні на 2 групи: I група – щури, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні, збалансованому за усіма нутрієнтами; II група – щури, які перебували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні. Визначення активності NAD^+ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса проводили спектрофотометрично. Ферментативну активність NAD^+ -залежної ізоцитратдегідрогенази реєстрували за накопиченням $NADH$ при перетворенні ізоцитрату до α -кетоглутарату, активність NAD^+ -залежної малатдегідрогенази – за накопиченням $NADH$ при окисненні малату при $\lambda=340$ нм. Активність NAD^+ -залежної α -кетоглутаратдегідрогенази визначали спектрофотометрично за інтенсивністю окиснення α -кетоглутарату при $\lambda=417$ нм. Визначення ферментативних активностей проводили у мітохондріальній фракції печінки щурів, отриманій методом диференційного центрифугування. Встановлено, що у тварин, які утримувались за умов аліментарної депривації протеїну, не спостерігається достовірних змін ізоцитратдегідрогеназної та малатдегідрогеназної активностей порівняно із показниками контрольної групи тварин. Водночас у мітохондріальній фракції печінки дослідних тварин α -кетоглутаратдегідрогеназна активність знижується у 2,2 рази. Окрім того, показано, що за даних експериментальних умов спостерігається тенденція до підвищення співвідношення $NAD^+/NADH$, що є важливим показником енергетичного стану клітини та ключовим регулятором енергетичного метаболізму, оскільки визначає швидкість і напрям реакцій енергозабезпечення та контролює функціонування загальних метаболічних шляхів у клітині. Співвідношення між окисленою та відновленою формами нікотинамідних коферментів ($NAD^+/NADH$) визначали за константою рівноваги малатдегідрогеназної реакції. Наслідком встановлених змін, ймовірно, буде порушення надходження субстратів для I комплексу електронотранспортного ланцюга мітохондрій. Зроблено висновок, що виражене гальмування α -кетоглутаратдегідрогеназної активності та підвищення співвідношення $NAD^+/NADH$ у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов аліментарної депривації протеїну свідчить про порушення постачання інтермедіатів для роботи дихального ланцюга мітохондрій, та може розглядатися як один із механізмів дисбалансу роботи системи біотрансформації енергії у мітохондріях за умов недостатності білка у раціоні.

Ключові слова: печінка, ізоцитратдегідрогеназа, малатдегідрогеназа, α -кетоглутаратдегідрогеназа, співвідношення $NAD^+/NADH$, аліментарна депривація протеїну

Вступ. За умов обмеженого надходження білків та енергії метаболічна адаптація спрямована на забезпечення органів та тканин організму енергією і структурними субстратами за рахунок утилізації власних запасів, що супроводжується розвитком стану гіперкатаболізму (Антонов и др., 2006, Харченко и др., 2012). Синдром гіперкатаболізму характеризується різким збільшенням потреби у донаторах енергії та пластичному матеріалі, результатом чого є переважання катаболічного типу реакцій перетворення основних макромолекул організму (Дундаров, Майоров, 2009). Загальна реакція організму за умов білкового голодування зводиться до поетапного відключення ряду енергозалежних процесів, спрямованого на мобілізацію наявних енергетичних ресурсів для виконання життєво важливих функцій

(Кашуров и др., 2010). Цей стан лежить в основі численних функціональних та метаболічних порушень, проте послідовність біохімічних реакцій, які визначають розвиток та реалізацію енергетичного дисбалансу в організмі за умов нестачі протеїну в раціоні, залишається відкритим питанням та потребує детального вивчення. З одного боку, визначальними у порушенні функціонування системи біотрансформації енергії можуть бути зміни на рівні структурно-функціональної організації ферментативних комплексів дихального ланцюга мітохондрій, а з іншого – дефіцит субстратів окислення. Тому метою нашої роботи було визначення активності NAD^+ -залежних ферментів циклу Кребса – ізоцитратдегідрогенази, α -кетоглутарат-дегідрогенази та малатдегідрогенази і співвідношення $NAD^+/NADH$ у мітохонд-

ріальній фракції печінки щурів за умов аліментарної депривації протеїну.

Матеріали і методи. Дослідження проводились на білих безпородних щурах масою 90 – 100 г, віком 2 – 2,5 місяці. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до вимог міжнародної конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей. Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи: I група – щури, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні (К); II група – щури, які перебували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні (НПР) (Reeves, 1993). Нормування добового раціону здійснювали з урахуванням принципу парного харчування. Тривалість експерименту становила 28 днів. Цервікальну дислокацію тварин проводили під легким ефірним наркозом.

Мітохондріальну фракцію з гомогенату печінки отримували методом диференційного центрифугування (Максимчук та ін., 2010). Визначення активності дегідрогеназ циклу Кребса у мітохондріальній фракції проводили спектрофотометрично. Активність NAD^+ -залежної ізоцитратдегідрогенази реєстрували за накопиченням НАДН при перетворенні ізоцитрату до α -кетоглутарату (Андреєшева и др., 2006), а активність NAD^+ -залежної малатдегідрогенази – за накопиченням НАДН при окисленні малату (Cetica, 2003) при $\lambda=340$ нм. Активність NAD^+ -залежної α -кетоглутаратдегідрогенази визначали спектрофотометрично за інтенсивністю окиснення α -кетоглутарату при $\lambda=417$ нм та виражали у нмоль/хв·мг білка (Kiss, 2013). Вміст білка визначали за методом Лоурі (Lowry, 1951). Співвідношення між окисленою та відновленою формами нікотинамідних коферментів ($NAD^+/NADH$)

визначали за константою рівноваги малатдегідрогеназної реакції (Jang, 2012).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності між групами при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення. Результати проведених досліджень показали, що у тварин, які утримувались за умов аліментарної депривації протеїну, не спостерігається достовірних змін ізоцитратдегідрогеназної та малатдегідрогеназної активностей порівняно із показниками контрольної групи тварин (рис. 1, 2). Враховуючи, що ізоцитратдегідрогеназна реакція є лімітуючою у циклі Кребса (Chang et al., 2011), то підтримання досліджуваної ферментативної активності на рівні контролю за умов білкової недостатності, імовірно, відображає збереження функціональної активності основного метаболічного шляху клітини за даних експериментальних умов. Водночас підтримання активності мітохондріальної малатдегідрогенази, що каталізує термінальну реакцію циклу Кребса (Shi, 2008), на рівні значень контролю, може бути пов'язано з посиленням надходженням у мітохондрії із цитозолю малату за участі малат-аспартатного шунта або фумарату із орнітинового циклу. Водночас у мітохондріальній фракції печінки дослідних тварин α -кетоглутаратдегідрогеназна активність знижується у 2,2 рази (рис. 3). Зниження α -кетоглутаратдегідрогеназної активності за умов аліментарної депривації протеїну, з одного боку, може бути пов'язане із посиленням потоком α -кетоглутарату на використання у метаболічних шляхах перетворення амінокислот (McCammon et al., 2003).

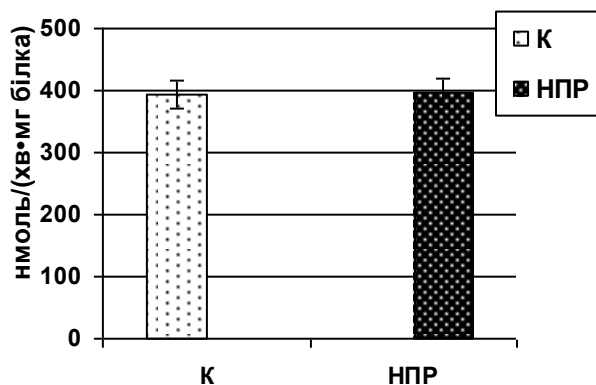


Рис. 1. Ізоцитратдегідрогеназна активність за умов аліментарної депривації протеїну.

Fig. 1. Isocitrate dehydrogenase activity under conditions of nutritional deprivation of protein.

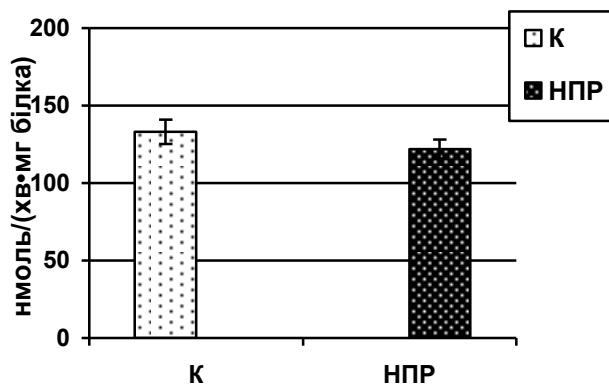


Рис. 2. Малатдегідрогеназна активність за умов аліментарної депривації протеїну.

Fig. 2. Malate dehydrogenase activity under conditions of nutritional deprivation of protein.

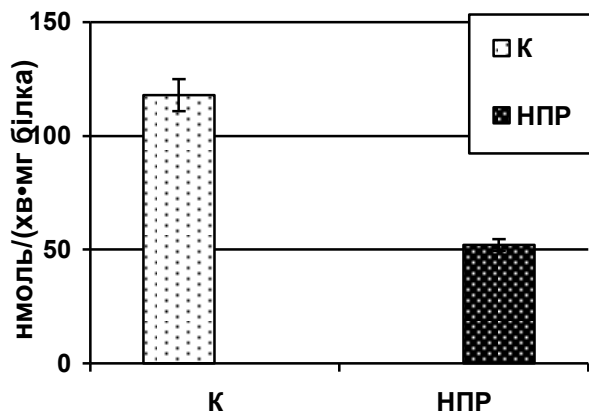


Рис. 3. α -Кетоглутаратдегідрогеназна активність за умов аліментарної депривації протеїну.
Fig. 3. α -Ketoglutarate dehydrogenase activity under conditions of nutritional deprivation of protein.

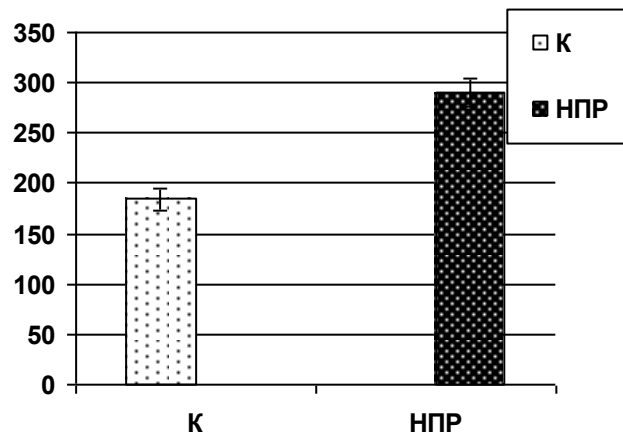


Рис. 4. Співвідношення $NAD^+/NADH$ за умов аліментарної депривації протеїну.
Fig. 4. $NAD^+/NADH$ ratio under conditions of nutritional deprivation of protein.

З іншого боку, зниження досліджуваної ферментативної активності може бути зумовлене порушеннями функціональної активності безпосередньо α -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу, оскільки відомо (Starkov et al., 2004), що цей ферментний комплекс є продуцентом активних форм кисню і сам може інактивуватися за їх дії.

Враховуючи, що продуктом ізоцитратдегідрогеназної, α -кетоглутаратдегідрогеназної та малатдегідрогеназної реакцій є $NADH$, біологічна роль якого полягає у постачанні протонів та електронів для роботи дихального ланцюга мітохондрій, то надалі актуальним було визначення співвідношення $NAD^+/NADH$ у мітохондріях, що є важливим показником енергетичного стану клітини та ключовим регулятором енергетичного метаболізму, оскільки визначає швидкість і напрям реакцій енергозабезпечення та контролює функціонування загальних метаболічних шляхів у клітині (Stein, Imai, 2012). Зміна співвідношення окислених та відновлених форм нікотинамідних коферментів пов'язана з порушеннями окисно-відновних реакцій у циклі трикарбонових кислот і спряженого з ним окисного фосфорилування, та є патогенетичною основою ряду патологічних станів (Третякова, 2003).

Результати наших досліджень показали, що за умов аліментарної депривації протеїну спостерігається тенденція до підвищення співвідношення $NAD^+/NADH$ (рис. 4). Встановлений факт вказує на підвищення рівня NAD^+ або зниження вмісту $NADH$ у мітохондріях печінки за умов недостатності білка у раціоні. Наслідком встановлених змін, ймовірно, буде порушення надходження субстратів для I комплексу електротранспортного ланцюга мітохондрій.

Висновки. Отже, за умов аліментарної депривації протеїну не спостерігається достовірних змін ізоцитратдегідрогеназної та малатдегідрогеназної активностей на фоні гальмування α -кетоглутаратдегідрогеназної активності. Водночас спостерігається тенденція до підвищення співвідношення $NAD^+/NADH$, що, імовірно, свідчить про порушення постачання інтермедіатів для роботи дихального ланцюга мітохондрій, та може розглядатися як один із механізмів порушення роботи системи біотрансформації енергії у мітохондріях за умов аліментарної депривації протеїну.

Список літератури:

1. Cetica P. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation *in vitro* / P. Cetica, L. Pintos, G. Dalvit et al. // *Reproduction*. – 2003. – № 126. – P. 753 – 763.
2. Chang C.-M. The role of isocitrate dehydrogenase mutations in glioma brain tumors / C.-M. Chang, K. Xu, H.-K. Shu // *Molecular targets of SNC tumors*. – 2011. – № 12. – P. 413 – 436.
3. Jang S.-Y. Nicotinamide-induced mitophagy: an event mediated by high $NAD^+/NADH$ ratio and SIRT1 activation / S.-Y. Jang, H.T. Kang, E.S. Hwang // *J. Biol. Chem.* – 2012. – № 9. – P. 1 – 22.
4. Kiss G. The negative impact of α -ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation / G. Kiss, C. Konrad, J. Doczi // *The FASEB Journal*. – 2013. – Vol. 27. – P. 1 – 15.
5. Lowri O.H. Protein measurement With Folin phenol reagent / O.H. Lowri, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 123, № 1. – P. 265 – 273.
6. McCammon M.T. Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of expression and effects on hypoxic and oxidative genes / M.T. McCammon, Ch.B. Epstein, B. Przybyla-Zawislak et al. // *Molecular biology of the cell*. – 2003. – Vol. 12. – P. 958 – 972.
7. Reeves P.G. 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 / P.G. Reeves, F.H.

- Nielsen, G.C. Fahey // J. Nutr. – 1993. – № 5. – P. 1939 – 1951.
8. Shi Q. Novel functions of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex may mediate diverse oxidant-induced changes in mitochondrial enzymes associated with Alzheimer's disease / Q. Shi, H. Xu, W.A. Kleinman et al. // Molecular Basis of Disease. – 2008. – № 4. – P. 1 – 32.
 9. Starkov A.A. Mitochondrial α -Ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species / A.A. Starkov, G. Fiscum, Ch. Chinopoulos et al. // Journal of Neuroscience. – 2004. – № 24 (36). – P. 7769 – 7778.
 10. Stein L.R. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria / L.R. Stein, S.-I. Imai // Trends Endocrinol Metab. – 2012. – № 23 (9). – P. 420 – 428.
 11. Андреещева Е.М. Интенсивность свободнорадикального окисления и каталитические свойства NAD^+ -изоцитратдегидрогеназы в печени крыс в норме и при токсическом гепатите / Е.М. Андреещева, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов и др. // Биомед. хим. – 2006. – Т. 52, вып. 6. – С. 153 – 160.
 12. Антонов А.Р. Особенности течения катаболического синдрома у лиц с пониженной массой тела на фоне функционального питания / А.Р. Антонов, Е.Ю. Баталова, Я.Б. Новоселов и др. // Биомед. журн. – 2006. – Т. 7. № 2. – С. 427 – 434.
 13. Дундаров З.А. Основные проблемы проведения нутритивной поддержки у пациентов в критических состояниях / З.А. Дундаров, В.М. Майоров // Новости хирургии. – 2009. – Т. 17, № 2. – С. 119 – 129.
 14. Кашуро В.А. Некоторые механизмы нарушения биоэнергетики и оптимизация подходов к их фармакотерапии / В.А. Кашуро, В.Б. Долго-Сабуров, В.А. Башарин и др. // Биомед. журн. – 2010. – Т. 11. – С. 611 – 634.
 15. Лапешин П.В. Состояние активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови и в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных немелкоклеточным раком легкого / П.В. Лапешин, А.А. Савченко, Ю.А. Дыхно и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – № 3 (15). – С. 48 – 53.
 16. Максимчук Ю.З. Повреждение митохондрий печени крыс при интоксикации тетрахлоретаном. Эффекты мелатонина / Ю.З. Максимчук, И.К. Дремза, Е.А. Лапшина // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 3. – С. 262 – 271.
 17. Третьякова О.С. Энергетический обмен в гипоксически поврежденном миокарде у новорожденных / О.С. Третьякова // Украинский медицинский часопис. – 2003. – № 5 (37). – С. 109 – 116.
 18. Харченко Н.В. Оптимизация парентерального питания больных в послеоперационный период / Н.В. Харченко, Г.А. Анохина, В.В. Кравченко // Сучасна гастроентерологія. – 2012. – № 4 (66). – С. 76 – 79.

THE ACTIVITY OF KREBS CYCLE NAD^+ -DEPENDENT DEHYDROGENASES UNDER CONDITIONS OF PROTEIN ALIMENTARY DEPRIVATION

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

The work is devoted to study of the isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase and malate dehydrogenase reactions of the Krebs cycle and the $NAD^+/NADH$ ratio in the mitochondrial fraction of the rats' liver under the conditions of the alimentary deprivation of protein. Research was carried out on non-linear white rats in weight 90-100 g, at the age 2-2.5 months, divided into 2 groups according to quantity of the protein in a ration: I group – rats maintained on the full value semisynthetic ration, balanced by all nutrients; II group rats maintained on the low-protein semisynthetic ration. Activity of the NAD^+ -dependent dehydrogenases of the Krebs cycle was determined spectrophotometrically. Enzymatic activity of the NAD^+ -dependent isocitrate dehydrogenase was measured by the accumulation of NADH during the converting of isocitrate to α -ketoglutarate, NAD^+ -dependent malate dehydrogenase - by the accumulation of NADH during the oxidation of malate at $\lambda=340$ nm. Activity of NAD^+ -dependent α -ketoglutarate dehydrogenase was determined spectrophotometrically by the intensity of the oxidation of α -ketoglutarate at $\lambda=417$ nm. Determination of the enzymatic activities was carried out in the mitochondrial fraction of the rats' liver, received by the differential centrifugation method. It is estimated that in animals, maintained under the conditions of the alimentary deprivation of protein, the significant changes of isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities aren't observed comparing to control group. At the same time α -ketoglutarate dehydrogenase activity in the mitochondrial fraction of rats' liver decreases by 2.2 times. Moreover, it is indicated that under the given experimental conditions the tendency to increase of the $NAD^+/NADH$ ratio is seen, being the important index of the energetic state of cell and key regulator of the energetic metabolism, because it determines the rate and direction of the energy supply reactions and controls the functioning of the general metabolic pathways in the cell. Ratio between oxidized and reduced forms of the nicotinamide coenzymes ($NAD^+/NADH$) was determined by the equilibrium constant of the malate dehydrogenase reaction. The result of the observed changes, probably, will be the disturbance of the supply of substrates for I complex of the electron transport chain of mitochondria. The conclusion is made that significant inhibition of the α -ketoglutarate dehydrogenase activity and increase of the $NAD^+/NADH$ ratio in the mitochondrial fraction of the rats' liver under the conditions of the alimentary deprivation of protein evidences the disturbances of the intermediates supply for the respiratory chain of mitochondria, and can be considered as one of the mechanisms of imbalance in the functioning of the energy biotransformation system in mitochondria under the conditions of the deficiency of protein in ration.

Key words: liver, isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, malate dehydrogenase, the $NAD^+/NADH$ ratio, alimentary deprivation of protein

Одержано редколегією 20.02.2014

23

