

ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ ПРОДУКТІВ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ТРАНСЛЯЦІЇ У ПЕЧІНЦІ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ, ІНДУКОВАНОГО НА ФОНІ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ БІЛКА

Інститут біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені

Юрія Федьковича (м. Чернівці)

oxbm@mail.ru

Дана робота є фрагментом НДР «Біохімічні аспекти респонсивної інтеграції метаболізму есенціальних нутрієнтів», № державної реєстрації 0115U003231.

Вступ. Насьогодні активно формуються уявлення про роль дисбалансу системи енергозабезпечення у перебігу різноманітних патологічних процесів [2, 7, 8]. Порушення процесу біотрансформації енергії розглядається як вторинна ланка патогенезу багатьох захворювань [6]. Водночас відомості про біохімічні механізми, що визначають розвиток і реалізацію енергетичного дисбалансу при аліментарній білковій недостатності та індукованому за цих умов токсичному ураженні печінки, у науковій літературі практично відсутні. З одного боку, визначальним у порушенні функціонування системи енергозабезпечення за умов патології може бути дефіцит субстратів окислення, в першу чергу NADH, необхідних для роботи дихального ланцюга мітохондрій. Як показали результати наших попередніх досліджень [3], у білок-дефіцитних тварин з гепатитом дійсно спостерігається підвищення співвідношення $NAD^+/NADH$, що вказує на нестачу NADH. Проте у тварин з ацетаминофен-індукованим гепатитом, що утримуються за умов повноцінного раціону, порушення функціональної активності ферментативних комплексів дихального ланцюга мітохондрій печінки не супроводжується формуванням дефіциту NADH.

З іншого боку, визначальними у порушенні роботи системи енергозабезпечення можуть бути зміни на рівні структурно-функціональної організації ензиматичних комплексів дихального ланцюга мітохондрій, субодиниць яких знаходяться під контролем структурних генів ядерного або мітохондріального геному [4]. При цьому синтез та структурна цілісність саме протеїнів мітохондріального кодування – трьох субодиниць цитохромоксидази, апоцитохрому *b*, двох субодиниць ATP-азного комплексу та семи субодиниць NADH-убіхінонредуктазного комплексу – визначають ефективність функціонування системи енергозабезпечення [5]. Оскільки мітохондрії концентрують в собі більшу частину окислювальних метаболічних шляхів і містять численні редокс-переносники і центри, здатні до продукування активних форм кисню (АФК), то за умов окисного стресу в першу чергу будуть пошкоджуватися біомолекули

саме мітохондрій [9]. При цьому чутливою мішенню дії АФК є протеїни, що кодується мітохондріальною ДНК, окисна модифікація яких буде призводити до порушення структурно-функціональної організації ензиматичних комплексів дихального ланцюга.

У зв'язку з вищевказаним актуальним видається дослідження рівня окиснювальної модифікації продуктів мітохондріальної трансляції у печінці щурів із токсичним гепатитом, індукованим ацетаминофеном на фоні аліментарної нестачі протеїну.

Мета дослідження – визначення вмісту карбонільних похідних та вільних SH-груп у білках мітохондріального кодування за умов токсичного гепатиту, індукованого на фоні аліментарного дефіциту білка.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 90-100 г, віком 2-2,5 місяці. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

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 ацетаминофен-індукованим ураженням печінки, які перебували на повноцінному раціоні (Г); III – щури, які перебували на низькопротеїновому раціоні (НПР); IV – щури з ацетаминофен-індукованим ураженням печінки, які попередньо перебували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні (НПР+Г).

Тварини I та II групи отримували раціон, що містить 14% протеїну (у вигляді казеїну), 10% жирів, 76% вуглеводів, збалансований за всіма нутрієнтами. Тварини III і IV групи отримували ізоенергетичний раціон, що містив 4,7% протеїну, 10% жирів та 85,3% вуглеводів, розрахований згідно з рекомендаціями American Institute of Nutrition [1].

Після чотиритижневого 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 [3].

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-НСІ, рН 7,4 при 0-3°C. Мітохондріальні білки виділяли за методом [5], який базується на нерозчинності продуктів мітохондріальної трансляції у 0,05 М Na-фосфатному буфері рН 11,5. Рівень карбонілювання білків оцінювали з використанням 2,4-динітрофенілгідразину, вміст білкових SH-груп – реагенту Елмана. Вміст білка визначали за Лоурі.

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

Результати досліджень та їх обговорення.

Результати проведених досліджень показали, що у білок-дефіцитних тварин вміст карбонільних похідних (рис. 1) та вільних SH-груп (рис. 2) у білках мітохондріального кодування печінки порівняно з контролем достовірно не відрізняється. Ймовірно, за умови утримання тварин на низькопротеїновому раціоні дисбаланс функціональної активності компонентів дихального ланцюга пов'язаний з порушенням синтезу окремих субодиниць дихальних комплексів, а не з їх посиленою окислювальною деструкцією.

Водночас у тварин з модельованим токсичним гепатитом вміст карбонільних похідних у 3,4 рази перевищує показники контролю (рис. 1) на фоні одночасного зниження рівня вмісту вільних SH-груп у 1,4 рази (рис. 2). Інтенсифікація окиснювальної деструкції білків мітохондріального кодування буде супроводжуватися порушенням їх функціональної активності. Враховуючи показане нами раніше зниження ензиматичної активності компонентів дихального ланцюга мітохондрій печінки за умов ацетоамінофеніндукованого гепатиту, зміни окисно-відновного стану тіолових груп білків дихального ланцюга, що кодуються генетичною системою мітохондрій, та зміни вмісту їх карбонільних похідних можна розглядати як один із факторів регуляції енергетичних функцій мітохондрій.

Проте найвираженіша акумуляція окисно-модифікованих протеїнів, синтез яких детермінується мітохондріальним геномом, спостерігається за умов токсичного гепатиту, індукованого на фоні аліментарного дефіциту білка. У тварин даної дослідної групи вміст карбонільних похідних білків мітохондріального кодування у 6,8 перевищує показники

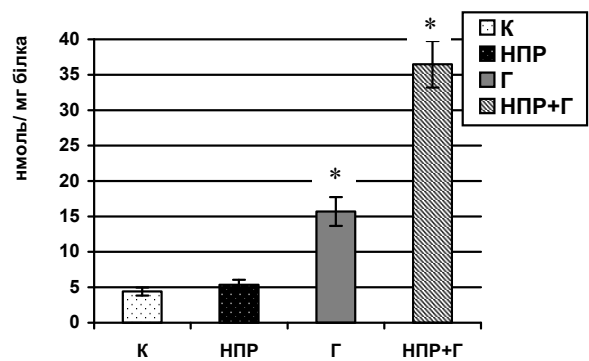


Рис. 1. Вміст карбонільних похідних у білках мітохондріального кодування за умов токсичного гепатиту та білкової недостатності.

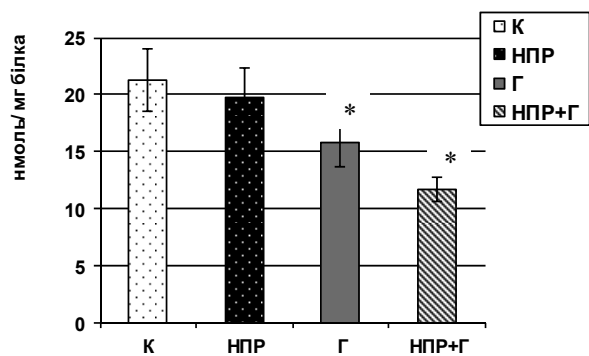


Рис. 2. Вміст вільних SH-груп у білках мітохондріального кодування за умов токсичного гепатиту та білкової недостатності.

контролю та у 2,3 рази перевищує показники тварин, утримуваних на повноцінному раціоні (рис. 1). Водночас вміст вільних SH-груп у досліджуваних білках практично вдвічі нижчий за показники контролю (рис. 2). Зміни вмісту модифікованих продуктів мітохондріальної трансляції за даних експериментальних умов можна розглядати як сигнал для перебудови енергетики мітохондрій.

Висновки. За умов токсичного гепатиту, індукованого на фоні аліментарного дефіциту білка, спостерігається посилення окиснювальної модифікації продуктів мітохондріальної трансляції, що проявляється накопиченням карбонільних похідних та зниженням вмісту вільних SH-груп, і може розглядатися як один з можливих механізмів порушення роботи системи біотрансформації енергії за даних експериментальних умов.

Перспективи подальших досліджень. Оскільки рівень окисно-модифікованих протеїнів відображає баланс між темпом окисдації та темпом деградації окислених протеїнів, перспективним надалі видається дослідження інтенсивності генерації активних форм кисню у мітохондріальній фракції печінки за умов гепатопатології, що формується на фоні білкової недостатності, з метою біохімічного обґрунтування та розробки терапевтичних підходів до корекції та усунення наслідків порушення енергетичного обміну.

Література

1. Волощук О. Н. Состояние системы энергообеспечения митохондрий печени в условиях алиментарной депривации протеина / О. Н. Волощук, Г. П. Копильчук, Т. Г. Кадайская // Вопр. питания. – 2014. – № 3. – С. 12-16.
2. Волощук О. Н. Изменение структурно-функциональной организации цитохромного участка дыхательной цепи карциномы Герена предварительно облученных опухоленосителей / О. Н. Волощук, М. М. Марченко, М. С. Мудрак // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58, № 6. – С. 684-690.
3. Копильчук Г. П. Активність NADH-убіхінонредуктази та сукцинатдегідрогенази в клітинах печінки щурів за умов токсичного гепатиту, індукованого ацетамінофеном на фоні аліментарної нестачі протеїну / Г. П. Копильчук, О. М. Волощук // Укр. біохім. журн. – 2015. – Т. 87, № 1. – С. 20-25.
4. Марченко М. М. Вплив малих доз іонізуючого випромінювання на фракційний склад мітохондріальних білків і мтДНК карциноми Герена / М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, О. М. Волощук // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 4. – С. 114-119.
5. Марченко М. М. Особенности окислительной деструкции продуктов митохондриальной трансляции в условиях предварительного фракционированного облучения крыс-опухоленосителей / М. М. Марченко, Г. П. Копильчук, О. Н. Волощук // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2007. – № 10. – С. 401-403.
6. Семячкина А. Н. Нарушения процессов клеточной биоэнергетики у детей с моногенными заболеваниями соединительной ткани (синдромы Марфана и Элерса-Данло) и методы их терапевтической коррекции / А. Н. Семячкина, Е. А. Николаева, П. В. Новиков [и др.] // Мед. генетика. – 2002. – № 4. – С. 186-190.
7. Chowdhury S. K. R. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats and its correction by insulin treatment / S. K. R. Chowdhury, E. Zherebitskaya, D. R. Smith [et al.] // Diabetes. – 2010. – Vol. 59. – P. 1082-1091.
8. Larsson N. G. Animal models for respiratory chain disease / N. G. Larsson, P. Rustin // Trends in Molecular Medicine. – 2001. – Vol. 7. – P. 578-581.
9. Wei Y. -H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging / Y. -H. Wei, H. -C. Lee // Experim. Biol. Med. – 2002. – Vol. 227. – P. 671-682.

УДК 577. 23:616. 36-056. 25

ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ ПРОДУКТІВ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ТРАНСЛЯЦІЇ У ПЕЧІНЦІ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ, ІНДУКОВАНОГО НА ФОНІ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ БІЛКА

Копильчук Г. П., Волощук О. М., Гончарюк О. М.

Резюме. В роботі визначено вміст карбонільних похідних та вільних SH-груп у білках мітохондріального кодування за умов токсичного гепатиту та аліментарного дефіциту білка. Встановлено, що найвираженіша акумуляція окисно-модифікованих протеїнів, синтез яких детермінується мітохондріальним геномом, спостерігається за умов токсичного гепатиту, індукованого на фоні білкової недостатності. За цих умов вміст карбонільних похідних білків мітохондріального кодування у 6,8 перевищує показники контролю, а вміст вільних SH-груп у досліджуваних білках вдвічі нижчий за контроль. Зміни вмісту окисно-модифікованих продуктів мітохондріальної трансляції можуть розглядатися як один з можливих механізмів порушення роботи системи біотрансформації енергії за даних експериментальних умов.

Ключові слова: білки мітохондріального кодування, окиснювальна модифікація, ацетамінофен-індукований гепатит, білкова недостатність.

УДК 577. 23:616. 36-056. 25

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛЯЦИИ В ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА, ИНДУЦИРОВАННОГО НА ФОНЕ АЛИМЕНТАРНОГО ДЕФИЦИТА БЕЛКА

Копильчук Г. П., Волощук О. Н., Гончарюк О. М.

Резюме. В работе исследовано содержание карбонильных производных и свободных SH-групп в белках митохондриального кодирования в условиях токсического гепатита и алиментарного дефицита белка. Показано, что наиболее выраженная аккумуляция окислительно-модифицированных продуктов митохондриальной трансляции наблюдается в условиях токсического гепатита, индуцированного на фоне белковой недостаточности. В этих условиях содержание карбонильных производных в 6,8 раз превышает показатели контроля, а содержание свободных SH-групп в исследуемых белках вдвое ниже по сравнению с контролем. Изменения содержания окислительно-модифицированных продуктов митохондриальной трансляции может рассматриваться как один из возможных механизмов нарушения работы системы биотрансформации энергии в данных экспериментальных условиях.

Ключевые слова: белки митохондриального кодирования, окислительная модификация, ацетамінофен-індуцированный гепатит, белковая недостаточность.

UDC 577. 23:616. 36-056. 25

Oxidative Modification of Mitochondrial Translation Products in Liver under the Conditions of Toxic Hepatitis Induced on the Background of Alimentary Protein Deficiency

Копылчук Г. П., Волошчук О. Н., Гончарчук О. М.

Abstract. Content of the carbonyl derivatives and free SH-groups in the proteins of mitochondrial coding under the conditions of toxic hepatitis and alimentary protein deficiency was determined.

Research was carried out on the 4 groups of animals: 1 – rats with acute acetaminophen-induced toxic liver injury, maintained on the full ration; 2 – rats with acute acetaminophen-induced toxic liver injury, maintained under conditions of alimentary protein deficiency; 3 – rats, maintained under conditions of alimentary protein deficiency; 4 – control (C).

1st and 4th groups of animals get a diet where all the nutrients was balanced, including 14% of proteins (casein), 10% of fats, 76% of carbohydrates. 2nd and 3rd groups of animals get isoenergetic diet that contained 4.7% of proteins, 10% of fats and 85.3% of carbohydrates, according to the recommendations of the American Institute of Nutrition.

The level of protein carbonylation was tested using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and the content of protein SH-groups was tested using Ellman's reagent.

Results showed that content of carbonyl derivatives and free SH-groups in liver proteins of mitochondrial coding in protein-deficient animals was not significantly different if compare with control. Imbalance of functional activity of components of the respiratory chain synthesis of low-protein diet's animals connected with a violation of synthesis of individual subunits of the respiratory complexes, but not with their enhanced oxidative destruction. However, in animals with simulated toxic hepatitis content of carbonyl derivatives is higher in 3.4 times than in control group with of the simultaneous reduction of free in 1,4 times. Intensification of oxidative degradation of proteins in mitochondrial coding will be accompanied by the breach of their functional activity.

It is found, that the most pronounced accumulation of oxidatively modified proteins, which synthesis is determined by the mitochondrial genome, is observed under the conditions of toxic hepatitis induced on the background of protein deficiency. Under these conditions the content of protein carbonyl derivatives of the mitochondrial coding exceeds by 6.8 times control indices, content of free SH-groups in studied proteins is 2-fold decreased comparing to control.

Changes of the content of oxidatively modified products of the mitochondrial translation may be considered as one of the possible mechanisms of disturbances in functioning of the biotransformation energy system under the current experimental conditions.

Keywords: mitochondrial protein coding, oxidative modification, acetaminophen-induced hepatitis, deficiency of protein.

Рецензент – проф. Тарасенко Л. М.

Стаття надійшла 18. 02. 2015 р.