КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

© Багмут І.Ю., Граматюк С.М.
УДК:616.36-002.-022-008.9:(612.826.33. 015.22+577.112.853+546.172.6)

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ФЕРМЕНТІВ ТКАНИННОГО ДИХАННЯ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С*

Багмут І.Ю., Граматюк С.М.

Харківська медична академія післядипломної освіти

Кафедра клінічної патофізіології, топографічної анатомії та оперативної хірургії Харків, Україна

Исследования, проведенные в течение нескольких десятилетий, в области патофизиологических механизмов митохондрий гепатоцитов, обычно были направлены на функциональные исследования изолированных митохондрий при отсутствии АДФ. Во многих случаях исследователи использовали данные для расчета параметров, включая коэффициент дыхательного контроля или количество потребляемой АДФ на каждое количество используемого кислорода. Однако до настоящего времени мало известно о том, как вирус может выжить в сильно окислительной среде, учитывая то, что окислительный стресс является важным клиническим признаком, связанным с инфицированием вирусом гепатита С. По нашему мнению, адаптация к окислительному стрессу - это патофизиологический механизм к выживанию вируса. Цель работы заключается в исследовании механизмов нарушения энергоснабжения, как механизма повреждения клеток, у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. В данное исследование было включено 62 пациента с наличием HCV-инфекции - основная группа, и 24 условно-здоровых пациента, не имевших в анамнезе заболеваний печени - группа контроля. Пациентов отбирали на основании их стабильного клинического состояния в течение последних 3 месяцев. У больных основной группы, HCV-инфекция была диагностирована положительно анти-HCV и HCV-РНК в течение не менее 6 месяцев. Митохондриальную целостность оценивали путем высвобождения цитохрома С с использованием коммерческого набора (цитохром С оксидазный Kit Sigma-Aldrich, USA), который указывает на наличие 96% интактных митохондрий. Внутренняя флуоресценция NADH была отслежена в изолированных митохондриях как маркер миохондриального окислительно-активного состояния NADH. Митохондриальное деление является ключевым патогенетическим механизмом контроля целостности митохондрий, при адаптации к клеточному патофизиологическому ответу вирус гепатита С модулирует ключевые процессы, связанные с инфицированием, для содействия сохранению вируса. Митохондриальное деление не всегда связано с разрушением клеток, также оно может защищать клетки от смерти, вызванной оксидативным стрессом и Ca^{2+} зависимыми апоптотическими стимуляторами. Механизм, с помощью которого ферменты энергетического обмена подавляют репликацию вируса гепатита С, не совсем понятен, но, вероятно, он включает кальций и диссоциацию комплекса репликации вируса из мембран. Детальное понимание механизма, с помощью которого ферменты энергетического обмена подавляют репликацию HCV-инфекции, требуют дополнительных исследований.

Ключевые слова: гепатит С, NAD/$NADH_2$, деление митохондрий.

Вступ

Вірусний гепатит С, що спостерігається у 3% світового населення, викликає клінічно важливе захворювання [1, 2]. Вірус гепатиту С визнаний найважливішим чинником розвитку фіброзу та цирозу печінки. Паренхіматозне ушкодження клітинних мембран гепактоцитів, може призвести до порушень метаболізму, що відіграє важливу роль у формуванні фіброзу печінки при вірусному гепатиті С [2-3].

Дослідження, що проведені протягом декількох десятиліть, в галузі патофізіологічних механізмів мітохондрій гепатоцитів, зазвичай було спрямовано на функціональних дослідженнях ізольованих мітохондрій за відсутності АДФ [1–3]. У багатьох випадках дослідники використовували дані для розрахунку параметрів, включаючи коефіцієнт дихального контролю або кількість споживаної АДФ на кожну кількість використовуваного кисню [1]. Такі дослідження широко застосовуються для опису мітохондріальної функції, на яку впливає безліч фізіологічних або патофізіологічних станів.

Компоненти метаболічної функції гепатоцитів: мітохондріальна функція, стан дихального ланцюга та ендогенна інтоксикація в минулому оцінювалися різними методами. До них відносяться застосування креатину, креатинкинази [2-4], АТФази з наявності

** Цитування при атестації кадрів: Багмут І.Ю., Граматюк С.М.Патофізіологічні механізми впливу ферментів тканинного дихання на функціонування мітохондрій у хворих на хронічний гепатит С. // Проблеми екології і медицини. – 2018. – Т. 22, № 1-2. – С. 3–6.*

надлишку АДФ [2, 5-7], а також співвідношення $NAD^+/NADH_2$, глюкози / гексокінази [4, 8].

Більшість цих досліджень були спрямовані на вивчення мітохондрії печінки, вірусний гепатит С встановлює хронічну інфекцію в умовах активної імунної відповіді та окисної оборони організму людини. Однак до теперішнього часу мало відомо про те, як вірус може вижити у сильно окисному середовищі, з огляду на те, що окислювальний стрес є такою видатною клінічною ознакою, що пов'язана з інфікуванням вірусом гепатиту С [6-12]. На нашу думку, адаптація до окисного стресу – є патофізіологічним механізмом до виживання вірусу.

Мета роботи полягає в дослідженні механізмів порушення енергопостачання гепатоцитів, як фактору пошкодження клітин у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С.

Матеріали та методи дослідження

У даному дослідженні було включено 62 пацієнти із наявністю HCV-інфекції – основна група, та 24 умовно-здорових пацієнта, що не мали в анамнезі захворювань печінки - група контроля. Пацієнтів відбирали на підставі їх стабільного клінічного стану протягом останніх 3 місяців. У хворих основної групи, HCV-інфекція була діагностована позитивністю анти-HCV і HCV-РНК протягом як мінімум 6 місяців.

Протокол дослідження було проведено у відповідності до Гельсінської декларації, переглянутої у 1989 році. Всі пацієнти були поінформовані про дослідження, і письмова згода була отримана у кожною з них.

Критеріями виключення з дослідження були наступні фактори: зловживання алкоголем, звичка паління, вагітність та застосування антиоксидантів, риб'ячої олії або препарати заліза протягом останього місяця, отримування антивірусної та/або інтерфероно терапії, неконтрольованє підвищеним артеріального тиска, сумарні рівні білірубіну в сироватці вище 2 мг/дл, хронічний гепатит В або інші відомі захворювання печінки, аутоімунні розлади та різні інфекційні стани печінки, інфекція вірусу імунодефіциту людини, цукровий діабет, хронічна дихальна недостатність, ревматоїдний артрит, цироз печінки або злоякісна пухлина.

Вірусологічне дослідження – встановлювали на підставі виявлення реплікативної активності в сироватці крові RNAHCV якісним та кількісним методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням набору тест-систем ELISA kit виробництва США, згідно з інструкцією виробника на ПЛР-аналізаторі BIO-RadCFX96 Touch™ (США).

Підготовка мітохондрій еритроцитів. Еритроцити двічі промивали фосфатно-буферним ізотонічним розчином (145мМ NaCl, 5мМ NaPi та 1мМ EDTA, pH 7,4), а білі клітини видаляли фільтруванням через целюлозу [9]. Мітохондрії еритроцитів були підготовлені диференційним центрифугуванням та очищені за допомогою Percoll [10]. Мітохондріальну цілісність оцінювали шляхом вивільнення цитохрому С із використанням комерційного набору (цитохром С Оксидазний аналіз, Kit Sigma-Aldrich, США).

Дослідження співвідношення АДФ/АТФ за допомогою набору ADP/ATP Ratio Assay становить собою просту і пряму процедуру для вимірювання рівнів АДФ та АТФ у клітинах для визначення апоптозу, некрозу та проліферації клітин. Аналіз включає в себе два етапи. На першому етапі робочий реагент лізує клітини для вивільнення АТФ та АДФ. При наявності люциферази АТФ негайно реагує з субстратом D-люциферин для отримання світла. Інтенсивність світла є прямим показником внутрішньоклітинної концентрації АТФ.

Люцифераза

АТР + D-люциферин + O_2 ----------> оксилюциферин + AMP + PPi + CO_2 + світло

На другому етапі АДФ перетворюється на АТФ шляхом ферментної реакції. Щойно сформований АТФ реагує з D-люциферином, як і на першому етапі. Інтенсивність світла на другому етапі відображає загальну концентрацію АДФ та АТФ у препараті.

Реєстрація продукції H_2O_2 мітохондріями. Вироблення H_2O_2 оцінювали за продукцією АТФ, за методом Ю. Лі [14]. Була виміряна флуоресценція і проведена кількісна оцінка [13]. Всього в пробі, що містить 1,5 мМ цитохрому С або феррицитохрому С, додавали 0,5 мл виділених клітин в HBSS (приблизно 5×10^6 клітин на мілілітр).

Вимірювання перекису водню в мітохондріях. Вироблення пероксиду водню вимірювали флуориметрично, використовуючи барвник Amplex Red (Eugene, США) у поєднанні з пероксидазою хрону. У цих експериментах інкубаційне середовище доповнювали 1 л М амплекс-червоного, 5 мл пероксидази хрону та 40 мл Cu, супероксиддисмутазою Zn. Наявність супероксиддисмутази запобігає автоматичному окисненню Amplex Red, що перешкоджає кількісній оцінці низьких показників вироблення H_2O_2. Вироблення H_2O_2 у мітохондріальних суспензіях було зареєстровано як збільшення флуоресценції барвника при 585 нм, з довжиною хвилі збудження 550 нм. Реакцію барвника калібрували шляхом послідовних доповнень відомих кількостей розчину пероксиду водню або безперервної інфузії розчину H_2O_2 при 100-1000 пмоль/хв. Концентрація комерційного 30%-ного розчину H_2O_2 розраховували з оптичного поглинання світла при 240нм); запасний розчин розводили до 100 мл з деіонізованою водою і негайно використовували для калібрування.

Модифікація методів дихального та мембранного потенціалів Ю. Лі[14]. Мітохондрії (0,05 мг/мл) інкубували при 37°С в 2 мл іонного дихального буфера (105мМ KCl, 10мМ NaCl, 5мМ Na_2HPO_4, 2мМ $MgCl_2$, 10мМ HEPES, pH 7,2, 1мМ EDTA, 0,2% BSA) з 5 г/мкл гексокінази (Worthington Biochemical) та 5 мМ 2-дезоксиглюкози. Стандартну криву тетрафенілфосфонію розробляли в кожному режимі шляхом додавання хлориду тетрафенілфосфонію в концентраціях 0,25, 0,5, 0,75 та 1 мкМ перед додаванням до культури мітохондрій.

Методи статистичної обробки даних. Для об`єктивного судження про ступінь вірогідності результатів дослідження ми застосовували варіаційно-статистичний метод аналізу отриманих результатів на персональному комп`ютері Pentium III із використанням пакету статистичних програм «StatGraphics Plus 3.0».

Результати та їх обговорення

В результаті нашого дослідження, не було статистично значущих відмінностей між групами за віком та статтю ($p>0,05$). Відсутня кореляція між рівнем АЛТ та рівнем HCV-РНК у пацієнтів із HCV-інфекцією ($p>0,05$).

За результатами нашого дослідження встановлено, що HCV-інфекція індукує деформування мітохондрій та викликає окислювальний стрес і змінює гомеостаз кальцію, який спричинює дисфункцію та пошкодження мітохондрій. У нашому дослідженні HCV-інфіковані клітини демонструють відмінні фрагмента-

рні мітохондрії (мітохондріальне ділення), на відміну від неінфікованих клітин, у яких проявляється типова трубчаста мітохондріальна мережа, що свідчить про здорові клітини (рис. 1).

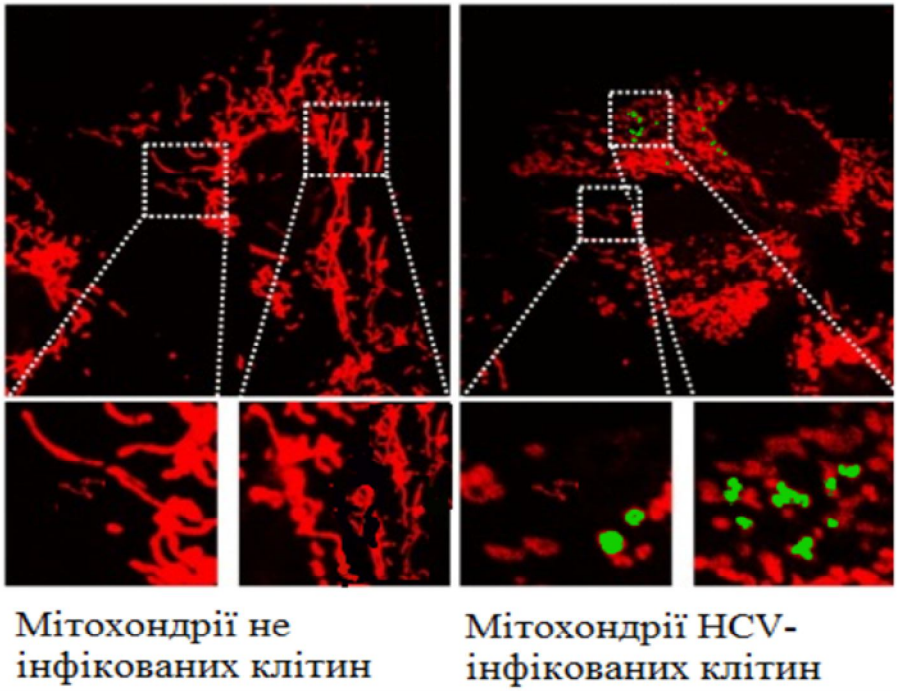

Рис. 1. Вірус гепатиту С індукує деформування мітохондрій. Аналіз результатів імунофлюоресценції, що демонструє розщеплення мітохондрій у клітинах, інфікованих HCV.

У контрольній групі ми спостерігали поступове збільшення показника O_2 при додаванні у розчин АДФ. Однак при порівнянні з групою пацієнтів, хворих на хронічний вірусний гепатит С, встановлено, що показники O_2 були достовірно ($p<0,05$) вищі у пацієнтів з HCV-інфекцією.

Також достовірно ($p<0,05$) вищими за контрольні значення були загальний рівень АТФ та АДФ, що склали 2,25±0,35 нмоль та 3,40±0,45 нмоль, відповідно. Відношення АТФ до АДФ становило 1:1,6 відповідно, (рис. 2 (А)). Мітохондріальна динаміка та контроль якості тісно пов'язані з клітинними метаболічними змінами та рівнями АТФ. Щоб дослідити, чи гальмування секреції вірусу гепатиту С, є наслідком зниження рівня клітинних АТФ, ми визначили загальний рівень АТФ та швидкість гліколізу, альтернативний спосіб генерації АТФ.

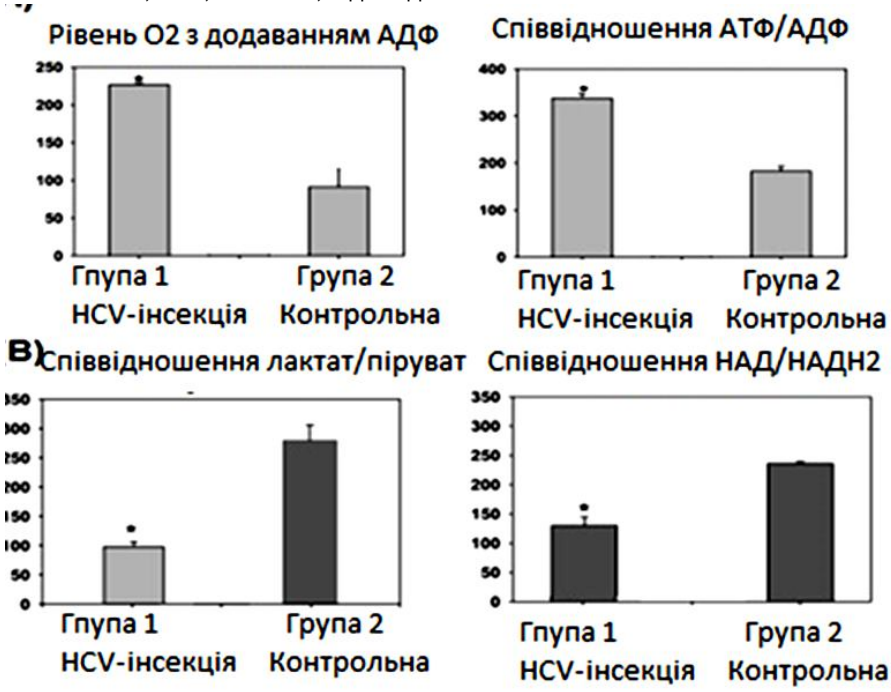

Рис. 2. Інгібування мітохондріального дихання та мітохондріальної функції. (А) - O2 з додаванням АДФ і співвідношення АТФ / АДФ, (В) - співвідношення лактат / піруват, співвідношення NADH / NAD +.

Крім того, ми виявили, що співвідношення $NADH/NAD^+$ було позитивно співвіднесене з вмістом РНК ВГС (r=0,95, p<0,001). Пригнічення реплікації HCV при додаванні в культуральне середовище ціанаміду та пірувату, також було пов'язане з відповідним зменшенням співвідношення $NADH/NAD^+$.

У пацієнтів з хронічним гепатитом С виявлено підвищений вміст окислених нікотинамідних коферментів.

Дослідження параметрів лактату та пірувату показали наступне. У пацієнтів, хворих на хронічний вірусний гепатит С, показники лактату перевищували показники контрольної групи і склали 1,89±0,45 ммоль/л у порівнянні з контрольним значенням (1,56±0,235 ммоль/л). Показники пірувату сироватки крові були значно нижчими, ніж у контрольній групі (0,056±0,011 ммоль/л), і склали у пацієнтів з HCV-інфекцію 0,031±0,012 ммоль/л та у пацієнтів другої групи – 0,0174+0,01ммоль/л (рис. 2 (В)). Піруват, який повторно окисляє цитозольні NADH до NAD^+, повністю скасовує збільшення реплікації вірусу гепатиту С.

Висновок

Мітохондріальне ділення є ключовим патогенетичним механізмом контролю цілостності мітохондрій, а відтак вірус гепатиту С модулює ці ключові процеси при адаптації до клітинної патофізіологічної відповіді, що пов'язана із інфікуванням, для сприяння збереженню вірусу. Мітохондріальне ділення не завжди пов'язано з руйнуванням клітин, також воно може захищати клітини від смерті, викликаної оксидативним стресом та Ca^{2+}-залежними апоптотичними подразниками. Механізм, за допомогою якого ферменти енергетичного обміну пригнічують реплікацію вірусу гепатиту С, ще не зовсім зрозумілий, але, ймовірно, він включає кальцій та дисоціацію комплексу реплікації вірусу з мембран. Детальне розуміння механізму, за допомогою якого ферменти енергетичного обміну пригнічують реплікацію HCV-інфекції, потребують додаткових досліджень.

Література

1. Kim S.J., Syed G.H., Siddiqui A. Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent mitophagy. // PLoS Pathog. – 2013. – T. 9(3). – P.1032-1085.
2. Korenaga M. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. // J Biol Chem. – 2005. – T. 280(45). – P. 37481–37488.
3. Piccoli C. Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. // Hepatology. – 2007. – T. 46(1). – P.58–65.
4. Chan D.C. Fusion and fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health. // Annu Rev Genet. – 2012. – T. 46. – P. 265–287.
5. Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. // Antioxid Redox Signal. – 2009. – T. 11. – P. 1289–1299.
6. Berglund A. K. Nucleotide pools dictate the identity and frequency of ribonucleotide incorporation in mitochondrial DNA. / Berglund A. K., Navarrete C., Engqvist M. K., Hoberg E., Szilagyi Z.// PLoS Genet. – 2017. – T.1. - 13:e1006628. 10.1371/journal.pgen.1006628.
7. Calvo S. E., Clauser K. R., Mootha V. K. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. // Nucleic Acids Res. – 2016. – T.44. – P.1251–1257. 10.1093/nar/gkv1003.
8. Copeland W. C., Longley M. J. Mitochondrial genome maintenance in health and disease. DNA. // Rep. – 2015. – T.19. – P.190–198. 10.1016/j.dnarep.2014.03.010.
9. Braverman N. E., Moser A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. // Biochim. Biophys. – 2013. – T. 1822. – P. 1442–1452. 10.1016/j.bbadis.2012.05.008.
10. Brites P., Waterham H. R., Wanders R. J. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. // Biochim. Biophys. – 2015. – T. Acta.1636. – P. 219–231. 10.1016/j.bbalip.2003.12.010.
11. Buchert R., Tawamie H., Smith C., Uebe S. A peroxisomal disorder of severe intellectual disability, epilepsy, and cataracts due to fatty acyl-CoA reductase 1 deficiency. // Am. J. Hum. Genet. – 2014. – T. 95. – P. 602–610. 10.1016/j.ajhg.2014.10.003.
12. Burdett K., Larkins L. K., Das A. K., Hajra A. K. Peroxisomal localization of acyl-coenzyme A reductase (long chain alcohol forming) in guinea pig intestine mucosal cells. // J. Biol. Chem. – T. 266. – P. 12201–12206.
13. Cheng J. B., Russell D. W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. // J. Biol. Chem. - 2004. – T. 279. – P. 37789–37797. 10.1074/jbc.M406225200.
14. Xing Du, Yi Li, Shu-Qun Liu Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models and methods // Int J Mol Sci. – 2016. – Vol.17(2). – P.144-147.

Матеріал надійшов до редакції 05.03.2018