

УДК 577.23:616.36-056.25

©Волощук, Копыльчук

АКТИВНОСТЬ NAD^+ -ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЦИКЛА КРЕБСА МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО АЦЕТАМИНОФЕНОМ ГЕПАТИТА НА ФОНЕ АЛИМЕНТАРНОЙ БЕЛКОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

О.Н. Волощук*, Г.П. Копыльчук

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,
58000, Украина, Черновцы, ул. М. Коцюбинского, 2; тел.: (0373)58-48-38; эл. почта: oxbm@mail.ru

Исследовали активность изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, а также соотношение $NAD^+/NADH$ в митохондриальной фракции печени крыс с индуцированным ацетаминофеном гепатитом в условиях алиментарной белковой недостаточности. В условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита наблюдается тенденция к снижению изоцитратдегидрогеназной, α -кетоглутаратдегидрогеназной и малатдегидрогеназной активности на фоне сохранения соотношения $NAD^+/NADH$ на уровне показателей контроля. При токсическом гепатите на фоне алиментарной белковой недостаточности обнаружено повышение митохондриального соотношения $NAD^+/NADH$ в 2,2 раза и более выраженное снижение активности NAD^+ -зависимых дегидрогеназ цикла Кребса.

Ключевые слова: алиментарная белковая недостаточность, индуцированный ацетаминофеном гепатит, изоцитратдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, соотношение $NAD^+/NADH$

DOI: 10.18097/PBMC20166202169

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно формируются представления о биохимических механизмах и роли дисбаланса клеточного энергообмена в течении разнообразных патологических процессов [1-3]. Показано, что нарушения работы системы энергообеспечения выступают вторичным звеном патогенеза ряда заболеваний [4]. Учитывая рост числа регистрируемых побочных (токсических) эффектов лекарственных препаратов и зависимость функциональной активности печени от эффективности работы системы энергообеспечения гепатоцитов [5, 6], исследование механизмов, определяющих развитие энергетического дисбаланса, особенно актуально. В контексте изучения биохимических механизмов нарушения функций печени при лекарственных или токсических гепатитах [7], удобным модельным токсином является ацетаминофен, который широко применяется в медицинской практике в качестве анальгетического и пиральгетического средства, а в случае передозировки вызывает существенные повреждения центральнолобулярных областей печени [8].

Большой интерес представляет исследование системы энергообеспечения печени при развитии патологии этого органа в условиях ограниченного поступления белков в организм, сопровождающегося возрастанием потребности в донаторах энергии [9, 10]. С одной стороны, определяющими в нарушении функционирования системы биотрансформации энергии могут быть изменения на уровне структурно-функциональной организации ферментативных комплексов дыхательной цепи митохондрий [11], с другой – дефицит субстратов окисления, в первую очередь $NADH$. Для эффективного функционирования электротранспортной цепи

митохондрий необходимо сохранение определенного соотношения окисленных и восстановленных форм никотинамидных коферментов, определяющих скорость и направленность реакций энергообеспечения в клетке [12-14].

Ключевыми метаболическими реакциями, обеспечивающими поддержание необходимого клетке уровня $NADH$, являются NAD^+ -зависимые реакции цикла Кребса.

Целью нашей работы было определение активности изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и соотношения $NAD^+/NADH$ в митохондриальной фракции печени крыс с индуцированным ацетаминофеном гепатитом в условиях алиментарной белковой недостаточности.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на 36 белых нелинейных крысах массой 90-100 г и возрастом 2-2,5 месяца. Работу с животными осуществляли с учётом положений “Общих этических принципов экспериментов на животных”, принятых Первым Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

Крыс содержали в индивидуальных пластмассовых клетках с песчаной подстилкой и свободном доступе к воде. Нормирование суточного рациона проводили с учётом принципа парного питания.

Животные были разделены на группы: I – крысы с острым индуцированным ацетаминофеном гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе (Г); II – крысы с индуцированным ацетаминофеном гепатитом, содержащиеся в условиях низкопротеинового рациона (НПР+Г); III – контроль (К). Животные I-й и III-й групп получали рацион, содержащий 14% белка (в виде казеина), 10% жиров, 76% углеводов,

* - адресат для переписки

сбалансированный по всем нутриентам [15]. Животные II-й группы получали изоэнергетический рацион, включающий 4,7% белка, 10% жиров и 85,3% углеводов.

После четырёхнедельного содержания крыс на экспериментальной диете гепатит моделировали путём введением ацетаминофена *per os* в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении 2 дней с помощью специального зонда [7]. Цервикальную дислокацию крыс под лёгким эфирным наркозом осуществляли на 31 сутки эксперимента.

Активность сорбитолдегидрогеназы в сыворотке крови определяли кинетическим методом [16] в реакции NADH-зависимого восстановления D-фруктозы в D-сорбитол. Активность аланинаминотрансферазы (АлТ) в сыворотке крови оценивали, используя набор реактивов ("Филисит-Диагностика", Украина).

Выделение митохондриальной фракции из гомогената печени проводили методом дифференциального центрифугирования [1] при 0-3°C.

Активность NAD⁺-зависимых дегидрогеназ цикла Кребса в митохондриальной фракции печени определяли спектрофотометрически при $\lambda=340$ нм. Активность изоцитратдегидрогеназы регистрировали по накоплению NADH в реакции превращения изоцитрата в α -кетоглутарат [17], активность малатдегидрогеназы – по накоплению NADH в реакции окисления малата [18]. Активность α -кетоглутаратдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по интенсивности окисления α -кетоглутарата при $\lambda=417$ нм [19]. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Соотношение окисленного и восстановленного NAD рассчитывали на основе констант равновесия реакций, протекающих в определённом компартменте клетки:

$[NAD^+]/[NADH]=1/K \times [\text{окисл. субстрат}]/[\text{восст. субстрат}]$.

Митохондриальное соотношение NAD⁺/NADH вычисляли с учётом константы равновесия малатдегидрогеназной реакции [20]:

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

Концентрацию оксалоацетата определяли колориметрическим методом, базирующемся на взаимодействии оксалоацетата с *n*-нитроанилином с образованием NN'-бис-(*n*-нитрофенил)-С-оксалилформазана, имеющим максимум поглощения при $\lambda=450$ нм [21]. Концентрацию малата определяли энзиматическим методом и регистрировали спектрофотометрически по накоплению NADH, эквивалентного количеству окисленного малата, при $\lambda=340$ нм [22].

Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ненаркотический анальгетик ацетаминофен, метаболизирующийся в гепатоцитах [7, 8], является

классическим индуктором токсического повреждения печени. Он проникает через мембрану гепатоцита путем диффузии из синусоидов, связывается со специфическими внутриклеточными белками, транспортирующими лекарственные препараты в эндоплазматический ретикулум, где и происходят основные процессы его метаболизма. Введение *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении 2 дней крысам вызывало развитие токсического гепатита. Об этом свидетельствуют 20-кратное увеличение в сыворотке крови активности органоспецифического фермента печени сорбитолдегидрогеназы [23], а также маркера гепатоцеллюлярного некроза печени – аланинаминотрансферазы (АлТ) (рис. 1,2). При этом достоверной разницы в активности сорбитолдегидрогеназы у животных с индуцированным ацетаминофеном гепатитом, содержащихся в условиях полноценной или низкопротеиновой диеты, не установлено. В тоже время повышение в сыворотке активности АлТ у крыс, содержащихся в условиях полноценного белкового питания (2,2 раза) было менее выражено, чем у животных с НПР (3,8 раза) (рис. 2).

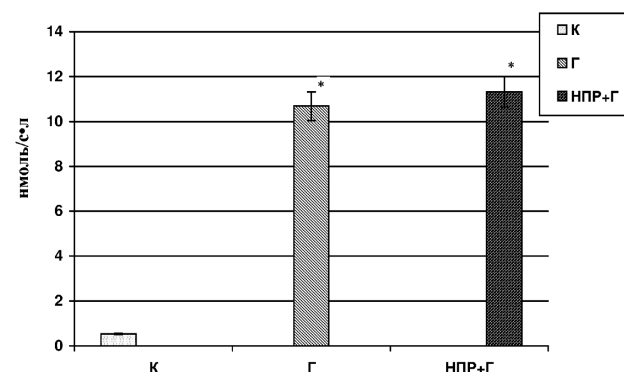


Рисунок 1. Активность сорбитолдегидрогеназы в сыворотке крови крыс в условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности.

Здесь и на других рисунках: К - контроль; Г - крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе; НПР+Г - крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях низкопротеинового рациона; * - статистически достоверная разница по сравнению с контролем, $p<0,05$; ** - статистически достоверная разница по сравнению с группой животных с острым индуцированным ацетаминофеном гепатитом, содержащихся на полноценном рационе, $p<0,05$.

В условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита в митохондриальной фракции печени обнаружено снижение изоцитратдегидрогеназной активности (рис. 3) в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой животных. Предварительное содержание животных в условиях алиментарной белковой недостаточности способствовало более выраженному (в 1,8 раза по отношению к контролю) снижению изоцитратдегидрогеназной активности в митохондриальной фракции печени крыс при гепатите.

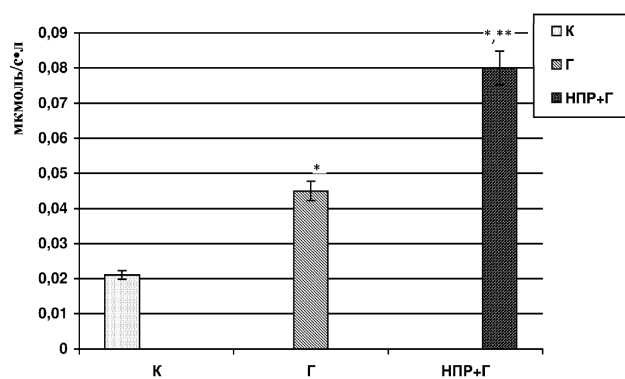


Рисунок 2. Активность АЛТ в сыворотке крови крыс в условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности.

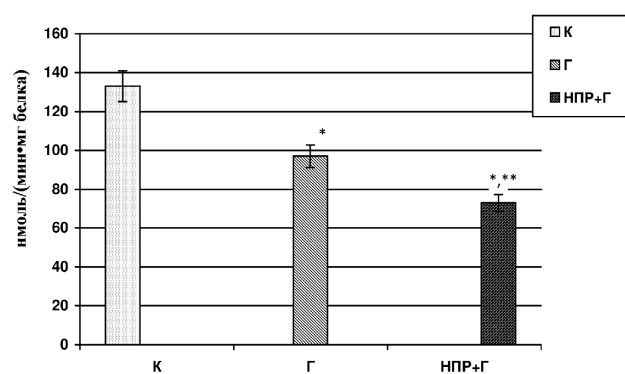


Рисунок 3. Изоцитратдегидрогеназная активность в митохондриальной фракции печени в условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности.

Аналогичная тенденция к усиленному снижению активности при токсическом гепатите в условиях ограниченного белкового питания характерна и для малатдегидрогеназы (рис. 4.).

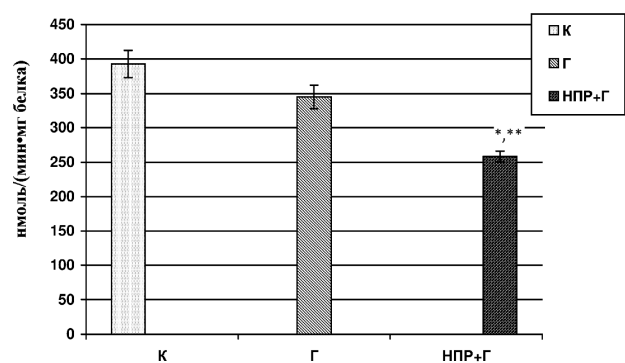


Рисунок 4. Малатдегидрогеназная активность в митохондриальной фракции печени в условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности.

Наиболее выраженные изменения активности обнаружены у α -кетоглутаратдегидрогеназы. В группе животных с индуцированным ацетаминофеном гепатитом активность этого фермента снижена в 1,5 раза (рис. 5). Развитие токсического гепатита у крыс, предварительно содержавшихся

в условиях алиментарной белковой недостаточности, сопровождалось снижением активности α -кетоглутаратдегидрогеназы в 3,3 раза (рис. 5).

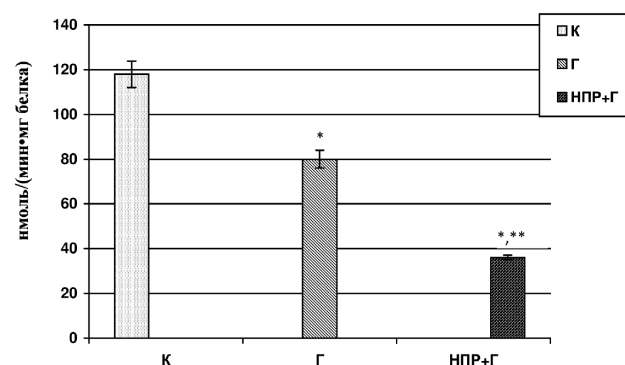


Рисунок 5. α -Кетоглутаратдегидрогеназная активность в митохондриальной фракции печени в условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности.

Таким образом, в условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности наблюдается снижение активности NAD^+ -зависимых дегидрогеназ цикла Кребса.

Учитывая, что продуктом изоцитратдегидрогеназной, α -кетоглутаратдегидрогеназной и малатдегидрогеназной реакций является $NADH$ – поставщик восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи, мы изучили митохондриальное соотношение $NAD^+/NADH$, которое служит важным показателем энергетического состояния клетки [13]. Окислительно-восстановительный статус никотинамидных коферментов определяет скорость и направленность реакций энергообеспечения и контролирует функционирование метаболических путей в клетке [12]. Изменение соотношения $NAD^+/NADH$, в первую очередь, связано с нарушением окислительно-восстановительных реакций цикла Кребса и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования, и рассматривается как патогенетическая основа ряда патологических состояний [24].

Определение митохондриального соотношения $NAD^+/NADH$ не выявило различий между контрольными животными и крысами с токсическим гепатитом (рис. 6). Однако у крыс, содержавшихся в условиях НПР последующее моделирование токсического гепатита сопровождалось повышением соотношения $NAD^+/NADH$ более чем в 2 раза. Этот факт может отражать нарушение поступления $NADH$ в комплекс I электронтранспортной цепи митохондрий. Учитывая, что оптимальное соотношение редокс-форм никотинамидных коферментов необходимо для эффективного энергетического метаболизма [12], отклонение соотношения $NAD^+/NADH$ от контроля может рассматриваться как один из механизмов нарушения клеточной биоэнергетики в условиях алиментарной белковой недостаточности.

АКТИВНОСТЬ ДЕГИДРОГЕНАЗ ПЕЧЕНИ ПРИ ГЕПАТИТЕ И ДЕФИЦИТЕ БЕЛКА

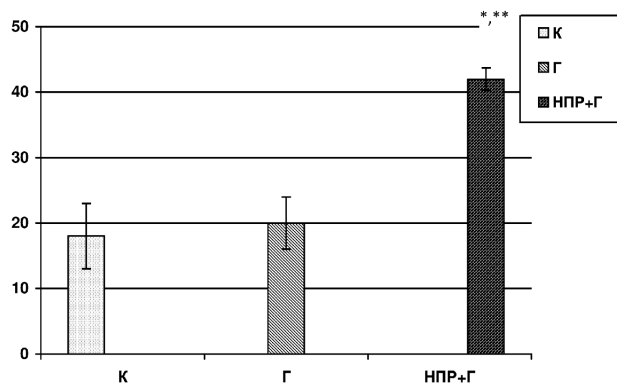


Рисунок 6. Соотношение NAD⁺/NADH в митохондриальной фракции печени в условиях индуцированного ацетаминофеном гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, в условиях моделирования токсического гепатита на фоне алиментарной белковой недостаточности установлено усиленное снижение активности NAD⁺-зависимых дегидрогеназ цикла Кребса и повышение митохондриального соотношения NAD⁺/NADH в 2,2 раза. Это, по-видимому, отражает нарушение поставки восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь и может рассматриваться как один из возможных факторов дисбаланса работы системы биотрансформации энергии в митохондриях в условиях недостаточности белка в рационе, являющейся критическим фактором для процессов энергообеспечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волощук О.Н., Марченко М.М., Мудрак М.С. (2012) Биомед. химия, **58**, 684-690.
2. Larsson N.G., Rustin P. (2001) Trends Mol. Med., **7**, 578-581.
3. Chowdhury S.K.R., Zhrebetskaya E., Smith D.R. et al. (2010) Diabetes, **59**, 1082-1091.

4. Семякина А.Н., Николаева Е.А., Новиков П.В. и др. (2002) Мед. генетика, **4**, 186-190.
5. Borlak J., Chatterji B., Londhe K.B., Watkins P.B. (2013) Genome Medicine, **5**, 2-14.
6. Somanawat K., Thong-Ngam D., Klaikeaw N. (2013) World J. Gastroenterol., **19**, 1962-1967.
7. Kuvandik G., Duru M., Nacar A. (2008) Toxicologic Pathology, **36**, 714-719.
8. Дремза И.К., Чецевик В.Т., Забродская С.В., Максимчик Ю.З., Судникович Е.Ю., Лапишина Е.А., Заводник И.Б. (2010) Биомед. химия, **56**, 710-718.
9. Харченко Н.В., Анохина Г.А., Кравченко В.В. (2012) Сучасна гастроентерологія, **66**, 76-79.
10. Pasini E., Aquilani R., Dioguardi F.S. et al. (2008) Am. J. Cardiol., **101**, 11E-15E.
11. Sangar V., Eddy A., Price N.D., Simeonidis E. (2012) Front. Physiol., **3**, 404.
12. Stein L.R. (2012) Trends Endocrinol Metab., **23**, 420-428.
13. Ying W. (2008) Antioxidants & Redox signaling, **10**, 179-206.
14. Jang S.-Y., Kang H.T., Hwang E.S. (2012) J. Biol. Chem., **287**, 19304-19314.
15. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П., Кадайская Т.Г. (2014) Вопр. питания, **83**, 12-16.
16. Rose C.I., Henderson A.R. (1975) Clin. Chem., **21**, 1619-1624.
17. Huang Y.-C., Soundar S., Colman A.F. (2000) Protein Science, **9**, 104-111.
18. Cetica P., Pintos L., Dalvit G. et al. (2003) Reproduction, **126**, 753-763.
19. Kiss G., Konrad C., Doczi J. et al. (2013) FASEB J., **27**, 2392-2406.
20. Williamson D.H., Lund P., Krebs H.A. (1967) Biochem. J., **103**, 514-527.
21. Kalnitsky G., Tapley D.F. (1958) Biochem. J., **70**, 28-34.
22. Прохорова М.И. (ред.) (1982) Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен), Издательство Ленинградского университета, Л., 272 с.
23. Singh A., Bhat T.K., Sharma O.P. (2011) J. Clin. Toxicol., **S4**:001.
24. Lin S.-J., Guarente L. (2003) Curr. Opin. Cell Biol., **15**, 241-246.

Поступила: 30. 08. 2014.
Принята к печати: 05. 10. 2014.

ACTIVITY OF LIVER MITOCHONDRIAL NAD⁺-DEPENDENT DEHYDROGENASES OF THE KREBS CYCLE IN RATS WITH ACETAMINOPHEN-INDUCED HEPATITIS DEVELOPED UNDER CONDITIONS OF ALIMENTARY PROTEIN DEFICIENCY

O.N. Voloshchuk, G.P. Kopylchuk

Fedkovych Chernovtsi National University,
2 M. Cotsubinskogo str., Chernovtsi, 58000 Ukraine; tel.: (0373) 58-48-38; e-mail: oxbm@mail.ru

Activity of isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and the NAD⁺/NADH ratio were studied in the liver mitochondrial fraction of rats with toxic hepatitis induced by acetaminophen under conditions of alimentary protein deprivation. Acetaminophen-induced hepatitis was characterized by a decrease of isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities, while the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio remained at the control level. Modeling of acetaminophen-induced hepatitis in rats with alimentary protein caused a more pronounced decrease in the activity of NAD⁺-dependent dehydrogenases studied and a 2.2-fold increase of the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio. This suggests that alimentary protein deprivation potentiated drug-induced liver damage.

Key words: alimentary protein deprivation, acetaminophen-induced hepatitis, isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, malate dehydrogenase, the NAD⁺/NADH ratio