

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЦИТОХРОМНОГО УЧАСТКА ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ АЦЕТАМИНОФЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕПАТИТА НА ФОНЕ АЛИМЕНТАРНОЙ ДЕПРИВАЦИИ ПРОТЕИНА

© 2015 г. О.Н. Волощук, Г.П. Копыльчук

*Институт биологии, химии и биоресурсов Черновицкого национального университета им. Ю. Федьковича, 58000, Черновцы, ул. Леси Украинки, 25, Украина;*

*E-mail: oxbm@mail.ru*

Поступила в редакцию 01.09.14 г.

После доработки 07.02.15 г.

Исследована активность ключевого фермента цитохромного участка дыхательной цепи цитохромоксидазы, количественное перераспределение митохондриальных цитохромов *b*, *c*<sub>1</sub>, *c* и *aa*<sub>3</sub>, а также активность ключевых ферментов метаболизма гема цитохромов –  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы и гемоксигеназы – в условиях ацетаминофен-индуцированного повреждения печени на фоне алиментарной депривации протеина. Установлено, что в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита наблюдается торможение цитохромоксидазной активности и снижение количественного содержания митохондриальных цитохромов на фоне повышения  $\delta$ -аминолевулинатсинтазной и гемоксигеназной активности. У животных с токсическим повреждением печени, содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина, установлено прогрессирующее снижение количественного содержания митохондриальных цитохромов *b*, *c*<sub>1</sub>, *c*, *aa*<sub>3</sub> на фоне повышения активности гемоксигеназы и сохранения активности  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы на уровне значений контроля. Сделан вывод, что алиментарная депривация протеина является критическим фактором для развития нарушений функционально-структурной целостности цитохромного участка дыхательной цепи и установленные изменения могут рассматриваться как один из возможных механизмов нарушения работы системы биотрансформации энергии в условиях недостаточности белка в рационе.

*Ключевые слова: митохондрии, цитохромы b, c<sub>1</sub>, c, aa<sub>3</sub>, цитохромоксидаза,  $\delta$ -аминолевулинатсинтаза, гемоксигеназа, алиментарная депривация протеина, ацетаминофен-индуцированное повреждение печени.*

Способность печени к восстановлению функциональной активности при гепатотоксических состояниях, возникающих как побочный эффект влияния ряда лекарственных препаратов [1–3], зависит от эффективности работы системы биотрансформации энергии гепатоцитов [4]. Состояние энергообеспечения клеток в первую очередь определяется эффективностью работы дыхательной цепи митохондрий, трансформирующей энергию окисления субстратов дыхания кислородом в форму трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов водорода на сопрягающей мембране [5]. В обеспечении энергетических потребностей клетки значительная роль отводится цитохромному участку дыхательной цепи, ключевым ферментом терминального этапа превращения энергии является цитохромоксидаза, катализирующая

транспорт электронов от цитохрома *c* на молекулярный кислород [6,7]. Особый интерес вызывает вопрос биохимических механизмов функционирования цитохромного участка дыхательной цепи в условиях ограниченного поступления белков в организм, сопровождающегося возрастанием потребности в донаторах энергии и пластическом материале [8,9]. Последовательность биохимических реакций, определяющих развитие и реализацию дисфункции работы дыхательной цепи митохондрий печени в условиях ее токсического повреждения и алиментарной депривации протеина, на сегодня остается открытым вопросом, требующим подробного исследования. Ранее нами было показано, что в условиях гепатита, индуцированного ацетаминофеном, после предварительного 4-недельного содержания крыс на низкопротеино-

вой 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 [10]. В то же время в литературе нет систематизированных данных относительно состояния цитохромного участка дыхательной цепи клеток печени в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне ограниченного содержания белка в рационе, в том числе активности цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) и перераспределения гемсодержащих протеинов электрон-транспортной цепи – цитохромов. Учитывая, что ключевым ферментом биосинтеза гема в митохондриях является фермент δ-аминолевулинатсинтаза (КФ 2.3.1.37) [11], а ключевым ферментом его катаболизма – гемоксигеназа (КФ 1.14.99.3) [12], целью нашей работы было определение активности цитохромоксидазы, исследование количественного перераспределения митохондриальных цитохромов *b*, *c*<sub>1</sub>, *c* и *aa*<sub>3</sub>, а также активностей ключевых ферментов метаболизма гема цитохромов в условиях ацетаминофен-индуцированного повреждения печени на фоне алиментарной депривации протеина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на белых нелинейных крысах массой 90–100 г и возрастом 2,0–2,5 месяца. Работу с животными осуществляли с учетом положений Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг.

Крыс содержали по одной особи в пластмассовых клетках с песчаной подстилкой, доступ к воде *ad libitum*. Нормирование суточного рациона проводили с учетом принципа парного питания.

Исследовали три группы животных: 1 – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе (Г); 2 – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина (НПР+Г); 3 – контроль (К). Животные 1-й и 3-й группы получали рацион, содержащий 14% белка (в виде казеина), 10% жиров, 76% углеводов, сбалансированный по всем нутриентам [13]. Жи-

вотные 2-й группы получали рацион, включающий 4,7% белка, 10% жиров и 85,3% углеводов.

После четырехнедельного содержания крыс на экспериментальной диете моделирование ацетаминофен-индуцированного гепатита осуществляли путем введения *per os* ацетаминофена в дозе 1 г/кг массы животных в 2% крахмальной взвеси на протяжении двух суток с помощью специального зонда [14].

Цервикальную дислокацию крыс под легким эфирным наркозом осуществляли на 31-е сутки эксперимента.

Выделение митохондриальной фракции из гомогената печени проводили с помощью метода дифференциального центрифугирования при 0–3°C [15].

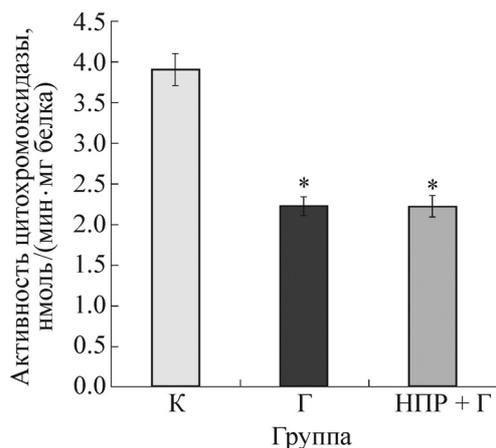
Количественное определение митохондриальных цитохромов проводили с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии [7]. Цитохромоксидазную активность определяли с помощью метода, в основе которого лежит способность цитохромоксидазы окислять диметилпарафенилдиамин и α-нафтол (реактив НАДИ) с образованием окрашенного продукта – индофенолового голубого [16].

δ-Аминолевулинатсинтазную активность определяли спектрофотометрическим методом [17], ферментативную активность вычисляли с учетом коэффициента молярной экстинкции, равного для δ-аминолевулинатсинтазы 0,023·10<sup>3</sup> М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> и выражали в нмоль/мин на 1 мг белка. Гемоксигеназную активность определяли по количеству образовавшегося билирубина и выражали в нмоль билирубина на 1 мг белка за 1 мин [18]. Содержание белка определяли по методу Лоури [19].

Статистическую значимость полученных результатов биохимических анализов оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни с применением программы обработки статистических данных «Statistica 6.0».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита в митохондриальной фракции печени наблюдается снижение активности ключевого фермента терминального участка дыхательной цепи – цитохромоксидазы – в 1,7 раза по сравнению с показателями контрольной группы животных (рис. 1), при этом у крыс, предварительно содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина, достоверной

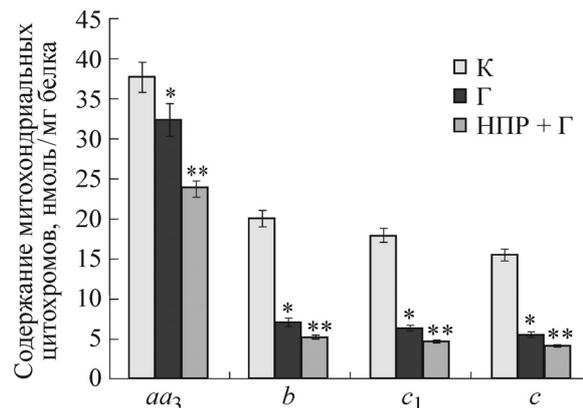


**Рис. 1.** Цитохромоксидазная активность в митохондриальной фракции печени в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной депривации протеина. К – контроль, Г – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе, НПР+Г – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина; \* – достоверная разница по сравнению с контролем, \*\* – достоверная разница по сравнению с группой животных с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащихся на полноценном рационе.

разницы активности цитохромоксидазы по сравнению с животными, содержащимися в условиях сбалансированного по всем нутриентам рациона, не установлено. Снижение цитохромоксидазной активности, как правило, сопровождается нарушением транспорта электронов на терминальном участке дыхательной цепи митохондрий, следствием чего является угнетение процесса дыхания и эффективности окислительного фосфорилирования.

Учитывая, что структурным компонентом цитохромоксидазы, обеспечивающим транспорт электронов на молекулярный кислород, являются цитохромы  $aa_3$  [20], для объяснения установленного факта нами было исследовано их количественное содержание. Результаты исследований показали, что в условиях гепатопатологии наблюдается снижение количественного содержания цитохромов  $aa_3$  в митохондриальной фракции печени (рис. 2), более выраженное у крыс, содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина. Вероятно, установленные отличия можно объяснить либо усиленным катаболизмом, либо нарушением синтеза белков, являющихся структурными компонентами митохондриальных цитохромов.

Необходимо указать, что одним из механизмов гепатотоксического действия ацетами-

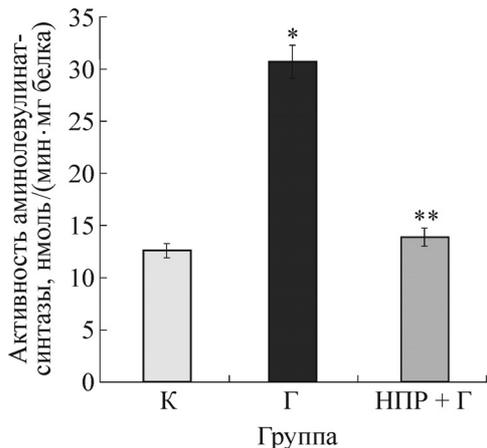


**Рис. 2.** Содержание цитохромов  $b$ ,  $c_1$ ,  $c$ ,  $aa_3$  в митохондриальной фракции печени в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной депривации протеина. Обозначения, как на рис. 1.

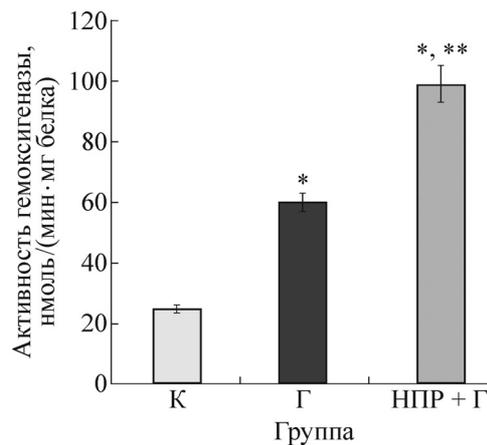
нофена является связывание его метаболита – N-ацетил-*p*-бензохинонимина (NAPQI), образующегося при участии цитохрома P 450, – с белками митохондрий через остатки цистеина [21]. Поскольку митохондриальные цитохромы обогащены цистеиновыми остатками [20], вероятно, одним из механизмов нарушения функциональной активности цитохромного участка дыхательной цепи митохондрий является образование комплексов NAPQI–белок.

Следует отметить, что наиболее выраженные изменения количественного содержания митохондриальных цитохромов наблюдаются на уровне комплекса III дыхательной цепи митохондрий. Результаты наших исследований показали, что в условиях токсического повреждения печени наблюдается снижение содержания цитохромов  $b$  и  $c_1$  (рис. 2) по сравнению с контролем практически в 2,5 раза. В то же время в группе животных с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, предварительно содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина, установлено снижение количественного содержания исследуемых митохондриальных цитохромов в 3,5 раза. Кроме того, при данных экспериментальных условиях установлено резкое снижение количества цитохрома  $c$  (рис. 2): у животных с токсическим повреждением печени в условиях полноценного питания содержание цитохрома  $c$  снижается в три раза, а в условиях белковой недостаточности – в четыре раза.

Исходя из того, что количественное содержание митохондриальных цитохромов в значительной степени определяется интенсивностью процесса синтеза и распада их гема, для объ-



**Рис. 3.** Ферментативная активность  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы в митохондриальной фракции печени в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной депривации протеина. Обозначения, как на рис. 1.



**Рис. 4.** Ферментативная активность гемоксигеназы в митохондриальной фракции печени в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной депривации протеина. Обозначения, как на рис. 1.

яснения установленного нами факта снижения содержания митохондриальных цитохромов целесообразным было изучение активности ключевых ферментов обмена гема цитохромов. Результаты наших исследований показали, что у животных с гепатопатологией наблюдается повышение в 2,5 раза по сравнению с показателями контроля (рис. 3) активности  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы, катализирующей реакцию конденсации глицина, и сукцинил-КоА с образованием  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты [22], предшественника гема. В литературе показано, что в ответ на оксидативный стресс в клетке наблюдается индукция синтеза  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы *de novo* [23]. В промоторе гена  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы и генах апобелков митохондриальных цитохромов присутствуют два связывающих сайта с родством к ядерным дыхательным факторам (NRF-1) [24]. Наличие хотя бы одного NRF-1-связывающего участка необходимо для активации транскрипции гена  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы. Указанный факт, а также способность NRF-1 связываться с  $\alpha$ -субединицей фактора инициации трансляции, свидетельствует о координации экспрессии генов цитохромов дыхательной цепи с потребностью клетки в энергии. Поэтому установленное нами повышение активности  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы в условиях снижения активности цитохромоксидазы является вполне логичным, поскольку отображает компенсаторную реакцию, направленную на поддержку работы системы энергообеспечения в условиях токсического повреждения печени. В то же время на фоне

активации  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы наблюдается повышение в два раза (рис. 4) активности гемоксигеназы – ключевого фермента катаболизма гема цитохромов.

Обращает на себя внимание факт, что у животных с гепатопатологией, содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина, активность  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы по сравнению с контролем достоверно не изменяется (рис. 3). Вероятно, алиментарная депривация протеина предотвращает активацию  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы, что связано с недостаточностью субстратов (аминокислот) для синтеза белка  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы либо гема *de novo*. В то же время в митохондриальной фракции печени животных указанной группы наблюдается резкое повышение гемоксигеназной активности, превышая показатели как контроля, так и группы животных с ацетаминофен-индуцированным гепатитом в 4 и 2,5 раза соответственно (рис. 4). Возможно, повышение активности гемоксигеназы возникает в ответ на нарушение структурной организации гемопротеинов дыхательной цепи, что приводит к накоплению неспецифически связанного гема, обладающего прооксидантными свойствами и способствующего развитию оксидативного стресса в исследуемых условиях. Показано [25,26], что индукция синтеза митохондриальной изоформы гемоксигеназы обеспечивает защиту тканей от окислительного повреждения.

Анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать вывод, что в условиях ацетаминофен-индуцированного повреждения

печени наблюдается торможение цитохромсидазной активности и снижение количественного содержания митохондриальных цитохромов на фоне повышения  $\delta$ -аминолевулинатсинтазной и гемоксигеназной активности. У животных с токсическим повреждением печени, содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина, установлено прогрессирующее снижение количественного содержания митохондриальных цитохромов  $b$ ,  $c_1$ ,  $c$ ,  $aa_3$  на фоне повышения активности гемоксигеназы и сохранения активности  $\delta$ -аминолевулинатсинтазы на уровне значений контроля.

Углубление нарушений структурно-функциональной организации цитохромного участка электрон-транспортной цепи митохондрий печени крыс, у которых гепатотоксическое состояние проявлялось на фоне белковой недостаточности в рационе, свидетельствует, что алиментарная депривация протеина является критическим фактором для развития нарушений функциональной и структурной целостности цитохромного участка дыхательной цепи. Установленные изменения структурно-функциональной организации цитохромного участка дыхательной цепи могут рассматриваться как один из возможных механизмов нарушения работы системы биотрансформации энергии в условиях недостаточности белка в рационе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Borlak, B. Chatterji, K. B. Londhe, and P. B. Watkins, *Genome Medicine* **5** (86), 2 (2013).
2. Е. Ю. Еремина, *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*, № 1, 6 (2012).
3. K. Somanawat, D. Thong-Ngam, and N. Klaikeaw, *World J. Gastroenterol.* **19** (12), 1962 (2013).
4. N. R. Carvalho, E. F. Rosa, M. H. Silva, et al., *PLoS One* **8** (12), e81961 (2013).
5. V. Sangar, A. Eddy, N. D. Price, and E. Simeonidis, *Front. Physiol.* **3**, 404 (2012).
6. С. С. Кузнецова, Н. В. Ацаркина, Т. В. Выгодина и др., *Биохимия* **70** (2), 160 (2005).
7. О. Н. Волошук, М. М. Марченко и М. С. Мудрак, *Биомед. химия* **58** (6), 684 (2012).
8. Н. В. Харченко, Г. А. Анохина и В. В. Кравченко, *Сучасна гастроентерологія*, № 4 (66), 76 (2012).
9. E. Pasini, R. Aquilani, F. S. Dioguardi, et al., *Am. J. Cardiol.* **101** (1), 11E-15E (2008).
10. Г. П. Копильчук и О. М. Волошук, *Укр. біохім. журн.* **87** (1), 20 (2015).
11. T. V. Barannik, N. M. Inshina, and P. A. Kaliman, *Укр. біохім. журн.* **77** (5), 120 (2005).
12. S. Bansal, G. Biswas, and N. G. Avadhan, *Redox Biology* **2**, 273 (2014).
13. О. Н. Волошук, Г. П. Копильчук и Т. Г. Кадайская, *Вопр. питания*, № 3, 12 (2014).
14. G. Kuvandik, M. Duru, A. Nacar, et al., *Toxicol. Pathol.* **36**, 714 (2008).
15. О. Н. Волошук и М. М. Марченко, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **156** (7), 103 (2013).
16. М. М. Марченко и О. Н. Волошук, *Радиационная биология. Радиоэкология* **52** (5), 496 (2012).
17. A. Collins, H. Marver, and P. Tschudy, *J. Biol. Chem.* **241** (19), 4323 (1966).
18. D. P. Converso, C. Taille, M. S. Carreras, et al., *The FASEB J.* **20** (8), 1236 (2006).
19. O. H. Lowry, M. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Rendal, *J. Biol. Chem.* **193** (1), 265 (1951).
20. H. J. Kim, O. Khalimonchuk, P. M. Smith, and D. R. Winge, *Biochim. Biophys. Acta* **1823** (9), 1604 (2012).
21. K. K. Andringa, M. L. Bajt, H. Jaeschke, and S. M. Bailey, *Toxicol. Lett.* **177** (3), 188 (2008).
22. Y. Djeridane, S. Lyoumi, H. Puy, and Y. Touitou, *J. Physiol. Pharmacol.* **61** (1), 115 (2010).
23. П. А. Калиман и Т. В. Баранник, *Укр. біохім. журн.* **73** (1), 5 (2001).
24. R. C. Scarpulla, *Physiol. Rev.* **88**, 611 (2008).
25. T. Takahashi, K. Morita, R. Akagi, and S. Curr. *Med. Chem.* **11** (12), 1545 (2004).
26. W. T. Johnson and L. C. DeMars, *J. Nutrition.* **134**, 1328 (2004).

**Peculiarities of the Structural-Functional State  
of the Cytochrome Part of Liver Mitochondrial Respiratory Chain  
under Conditions of Acetaminophen-induced Hepatitis  
against the Background of Alimentary Deprivation of Protein**

**O.N. Voloshchuk and G.P. Kopylchuk**

*Institute of Biology, Chemistry and Bioresources, Fedkovych Chernivtsi National University,  
ul. Lesi Ukrainki 25, Chernivtsi, 58000 Ukraine*

Activity of the key enzyme of the cytochrome part of the respiratory chain – cytochrome oxidase, quantitative redistribution of mitochondrial cytochromes *b*, *c1*, *c* and *aa3*, activity of the key enzymes of cytochromes' heme metabolism –  $\delta$ -aminolevulinate synthase and heme oxygenase under conditions of acetaminophen-induced hepatitis against the background of alimentary deprivation of protein were studied. It was found out, that under conditions of acetaminophen-induced hepatitis against the background of alimentary deprivation of protein, an inhibition of cytochrome oxidase activity and a decrease in the quantitative content of mitochondrial cytochromes against the background of the increase in the  $\delta$ -aminolevulinate synthase and heme oxygenase activity are observed. In animals with toxic liver injury, maintained under conditions of alimentary deprivation of protein, a progressive decrease in the quantitative content of mitochondrial cytochromes *b*, *c1*, *c* and *aa3* against the background of the increase in heme oxygenase activity and preservation of  $\delta$ -aminolevulinate synthase activity on the control level is identified. The conclusion was made, that alimentary deprivation of protein is a critical factor for the development of the disturbances of structural-functional integrity of the cytochromic part of the respiratory chain. The identified changes may be considered as one of the possible mechanisms of energy biotransformation system disturbances under conditions of alimentary deprivation of protein.

*Key words: mitochondria, cytochromes b, c1, c, aa3, cytochrome oxidase,  $\delta$ -aminolevulinate synthase, heme oxygenase, alimentary deprivation of protein, acetaminophen-induced liver injury*