

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС С ТОКСИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В УСЛОВИЯХ БЕЛКОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© 2017 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: o.voloschuk@chnu.edu.ua

Поступила в редакцию 13.05.17 г.

Исследовано содержание адениловых нуклеотидов и активность ферментов катаболизма АМФ в цитозольной фракции печени крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом в условиях различных режимов белкового питания. Установлено, что у животных с токсическим гепатитом, содержащихся в условиях полноценного белкового питания, в цитозольной фракции печени наблюдается снижение содержания АТФ и АДФ при сохранении на уровне значений контроля содержания АМФ. В то же время в цитозольной фракции печени белок-дефицитных животных с ацетаминофен-индуцированным гепатитом наблюдается истощение пула АТФ и АМФ. Изменение содержания адениловых нуклеотидов сопровождается нарушением активности ферментов катаболизма АМФ – 5'-нуклеотидазы и АМФ-дезаминазы. Установлено, что у полноценно питающихся крыс с токсическим гепатитом наблюдается повышение активности АМФ-дезаминазы в сравнении с показателями контроля на фоне активации 5'-нуклеотидазы. В то же время у белок-дефицитных животных с токсическим повреждением печени установлено снижение активности АМФ-дезаминазы при сохранении на уровне выше контрольных значений активности 5'-нуклеотидазы. Полученные результаты указывают на истощение энергетических ресурсов клеток печени у белок-дефицитных крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, при этом установленные изменения активности ферментов катаболизма АМФ можно рассматривать как один из механизмов регуляции энергетических функций клетки.

Ключевые слова: алиментарная депривация протеина, токсический гепатит, цитозольная фракция, адениловые нуклеотиды, 5'-нуклеотидаза, АМФ-дезаминаза.

В настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании особенностей регуляции клеточного метаболизма в условиях токсического гепатита [1–3], однако биохимические механизмы взаимодействия компонентов метаболических путей в клетке при токсических гепатитах у лиц с различным нутриентным статусом остаются малоизученными. В первую очередь открытым остается вопрос особенностей метаболизма ключевых компонентов клеточной системы энергообеспечения – адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ), обеспечивающих сопряжение процессов освобождения и использования энергии, регуляцию обмена веществ и интеграцию различных метаболических путей [4]. Содержание АТФ, а также соотношение компонентов фракции адениловых нуклеотидов определяют характер, интенсивность и пути ресинтеза АТФ и метаболизма в целом [5,6]. Ферменты цикла пуриновых нуклеотидов 5'-нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5) и АМФ-дезаминаза (АМФ-аминогидролаза, КФ 3.5.4.6) обеспечи-

вают метаболические превращения пуриновых нуклеотидов и контролируют уровень специфических внутриклеточных модуляторов – АМФ, аденозина и инозина [7,8].

Поэтому целью работы стало определение содержания АТФ, АДФ, АМФ и оценка ферментативной активности АМФ-дезаминазы и 5'-нуклеотидазы в цитозольной фракции печени крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом в условиях различных режимов белкового питания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на белых нелинейных крысах массой 90–100 г и возрастом 2–2,5 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 в пластмассовых клетках с песчаной подстилкой, доступ к воде

ad libitum. Нормирование суточного рациона проводили с учетом принципа парного питания.

Исследования проводили на трех группах животных: первая группа – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе (Г); вторая группа – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина (АДП + Г); третья группа – контрольная. Животные первой и третьей групп получали рацион, сбалансированный по всем нутриентам и содержащий 14% белка (в виде казеина), 10% жиров, 76% углеводов. Животные второй группы получали изоэнергетический рацион, включающий 4,7% белка, 10% жиров и 85,3% углеводов [9,10].

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 [11].

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

Выделение цитозольной фракции из гомогената печени проводили с помощью метода дифференциального центрифугирования при 0–3°C путем отделения фракции митохондрий и микросом.

Количественное определение содержания АТФ, АДФ и АМФ осуществляли методом тонкослойной хроматографии с использованием пластинок «Silufol» [12]. Из цитозольной фракции печени свободные нуклеотиды экстрагировали 30 мин в 0,8 М HClO_4 при температуре 0–4°C. Для получения безбелковых перхлоратных экстрактов пробы центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость нейтрализовали K_2CO_3 до значения рН 7,0 и повторно центрифугировали при тех же условиях. Аликвоты надосадочной жидкости наносили на хроматографические пластинки [13,14]. После разделения адениловых нуклеотидов в подвижной фазе, состоящей из диоксиана, изопропанола, воды и аммиака в соотношении 4 : 2 : 4 : 1, осуществляли их количественное определение методом прямой спектрометрии. Пятна нуклеотидов детектировали под УФ-светом, элюировали с пластин раствором 0,1 М HCl в течение 20 мин. Абсорбцию элюата определяли при $\lambda = 260$ нм.

Активность 5'-нуклеотидазы рассчитывали по количеству неорганического фосфата, осво-

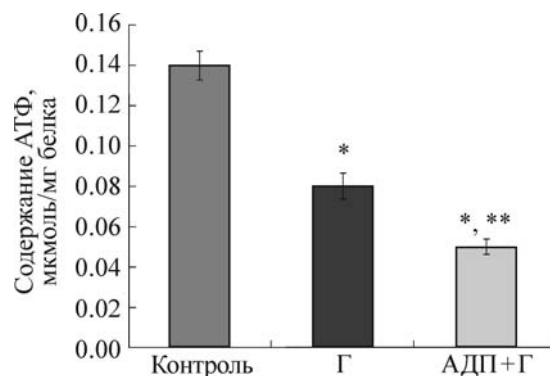


Рис. 1. Содержание АТФ в цитоплазматической фракции печени крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом в условиях различных режимов белкового питания. Здесь и далее: * – достоверная разница по сравнению с контролем; ** – достоверная разница по сравнению с группой животных с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащихся на полноценном рационе.

бождаемого при гидролизе АМФ, и выражали в нмолях P_i за 1 мин на 1 мг белка [15]. Активность АМФ-деаминазы определяли спектрофотометрическим методом по увеличению оптической плотности при $\lambda = 265$ нм каждые 10 с на протяжении 1 мин [15].

Содержание белка определяли по методу Лоури.

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 исследований показали, что в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита в цитозольной фракции печени крыс наблюдается снижение содержания АТФ на 43% (рис. 1) на фоне снижения содержания АДФ (рис. 2) и сохранения на уровне контроля значений содержания АМФ (рис. 3). Установленный факт, вероятно, связан с усиленной утилизацией АТФ при недостаточном ее ресинтезе. Ранее в наших исследованиях было установлено, что в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита наблюдается нарушение транспорта электронов в дыхательную цепь как от NADH-зависимых, так и FAD-зависимых субстратов, о чем свидетельствует снижение ферментативной активности NADH-убихинонредуктазы и сукцинатдегидрогеназы [16]. Кроме того, нами было установлено торможение цитохромоксидазной активности на фоне снижения количественного содержания митохондриальных цито-

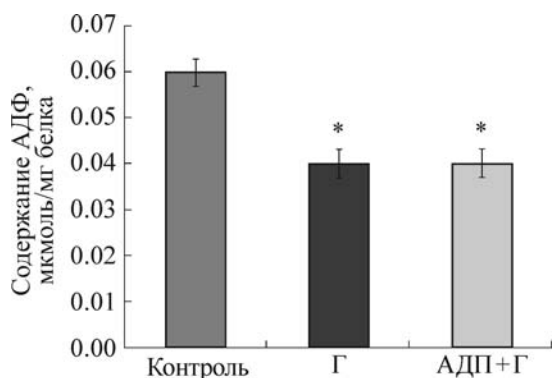


Рис. 2. Содержание АДФ в цитоплазматической фракции печени крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом в условиях различных режимов белкового питания.

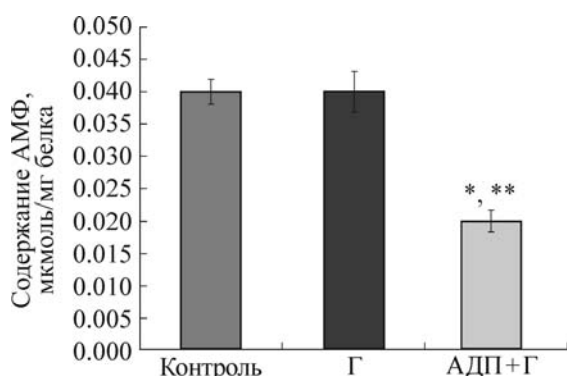


Рис. 3. Содержание АМФ в цитоплазматической фракции печени крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом в условиях различных режимов белкового питания.

хромов в печени [17]. Вероятно, показанное нами снижение ферментативной активности ключевых компонентов дыхательной цепи приводит к угнетению процесса дыхания и эффективности окислительного фосфорилирования, следствием чего становится снижение содержания АТФ.

В то же время анализ результатов исследований показал, что в цитозольной фракции печени белок-дефицитных крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом наблюдается истощение пула АТФ (рис. 1) и АМФ (рис. 3). Данный факт указывает, что в условиях токсического повреждения печени у крыс, содержащихся в условиях алиментарной депривации протеина, наблюдается более выраженное истощение энергетических ресурсов клеток печени и углубление дисбаланса системы энергообеспечения. В литературе показано [18,19], что снижение содержания адениловых нуклеотидов всего на 15–20% приводит к снижению всех энергозависимых процессов в клетке на 75–80%,

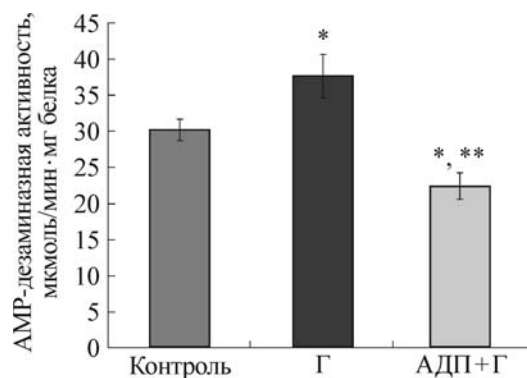


Рис. 4. АМФ-деаминазная активность в цитоплазматической фракции печени крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом в условиях различных режимов белкового питания.

в первую очередь к нарушению синтетических процессов в печени. При этом если снижение содержания АТФ, вероятно, связано с нарушением ее ресинтеза вследствие нарушения структурно-функциональной организации компонентов дыхательной цепи, то истощение пула АМФ может быть связано с усилением ее катаболизма. Изменение содержания адениловых нуклеотидов в клетке, в первую очередь АМФ, сопровождается нарушением энергетического заряда клетки, при этом в его регуляции задействованы ферменты катаболизма АМФ – 5'-нуклеотидаза и АМФ-деаминаза [20].

Результаты исследований показали, что в цитозольной фракции печени крыс в условиях токсического повреждения наблюдается повышение АМФ-деаминазной активности по сравнению с показателями контроля (рис. 4). Можно предположить, что в условиях токсического гепатита активируются процессы катаболизма пуриновых нуклеотидов. Такие изменения, вероятно, будут сопровождаться активацией ксантиноксидазной реакции с последующей интенсификацией свободнорадикальных процессов в печени [21].

В то же время в печени белок-дефицитных крыс с токсическим гепатитом наблюдается снижение АМФ-деаминазной активности (рис. 4). В литературе показано [7], что в условиях низкой концентрации АМФ активность АМФ-деаминазы снижается, поэтому замедляется процесс деаминарования АМФ, необходимый для стабилизации энергетического заряда клетки. При низких концентрациях АМФ активна 5'-нуклеотидаза. Переключение на 5'-нуклеотидазный путь деградации АМФ позволяет стабилизировать аденилатный пул [20].

Результаты исследований показали, что у животных с токсическим повреждением печени

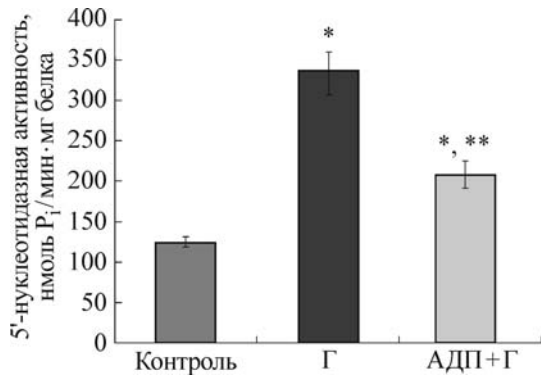


Рис. 5. 5'-нуклеотидазная активность в цитоплазматической фракции печени крыс с ацетаминофен-индуцированным гепатитом в условиях различных режимов белкового питания.

5'-нуклеотидазная активность в цитозольной фракции повышается почти втрое по сравнению с показателями контроля (рис. 5). Повышение 5'-нуклеотидазной активности может рассматриваться как компенсаторная реакция организма на введение ацетаминофена, поскольку аденозин, продуцируемый в результате исследуемой ферментативной реакции, является эффективным эндогенным гепатопротектором и регулятором репарации тканей [22].

В то же время у животных с токсическим повреждением печени, содержащихся на низкобелковой диете, 5'-нуклеотидазная активность в цитозольной фракции почти вдвое превышает показатели контроля (рис. 5). Вероятно, установленные нами изменения активности ферментов катаболизма АМФ в условиях токсического гепатита на фоне алиментарной депривации белка направлены на стабилизацию аденилатного пула в клетках печени.

ВЫВОДЫ

В условиях токсического повреждения печени, индуцированного у белок-дефицитных крыс, наблюдается истощение энергетических ресурсов клеток печени. Установленные изменения активности ферментов катаболизма АМФ на фоне белковой недостаточности можно рассматривать как один из механизмов регуляции энергетических функций клетки в условиях патологии.

Работа выполнена в рамках НИР «Биохимические аспекты респонсивной интеграции метаболизма эссенциальных нутриентов», № госрегистрации 0115U003231.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. K. Lee, N. Imaizumi, S. R. Chamberland, et al., *Hepatology* **6** (1), 326 (2015).
2. H. Jaeschke, M. R. McGill, and A. Ramachandran, *Drug. Metab. Rev.* **44**, 88 (2012).
3. J. A. Hinson, D. W. Roberts, and L. P. James, *Handb. Exp. Pharmacol.* **196**, 369 (2010).
4. В. В. Давыдов, И. В. Захарченко и В. Г. Овсянников, *Биомед. химия* **51** (5), 522 (2005).
5. E. D. Berglund, R. S. Lee-Young, and D. G. Lustig, *J. Clin. Invest.* **119** (8), 2412 (2009).
6. F. Marmol, J. Sanchez, and D. Lopez, *Physiol. Res.* **59**, 553 (2010).
7. C. Plaideau, J. Liu, J. Hartleib-Geschwindner, et al., *FASEB J.* **26** (6), 2685 (2012).
8. K. L. Bogan and C. Brenner, *New J. Chem.*, **34**, 845 (2010).
9. P. G. Reeves, F. H. Nielsen, and G. C. Fahey, *J. Nutr.* **5**, 1939 (1993).
10. О. Н. Волощук, Г. П. Копильчук и Т. Г. Кадайская, *Вопр. питания* **83** (3), 12 (2014).
11. G. Kuvandik, M. Duru, A. Nacar, et al., *Toxicol. Pathol.* **36** (5), 714 (2008).
12. В. И. Древаль, А. В. Финаин и Е. А. Баранник, *Укр. биохим. журн.* **61** (2), 94 (1989).
13. И. В. Зарубина и Б. И. Криворучко, *Укр. биохим. журн.* **54** (4), 437 (1982).
14. А. В. Майданюк, *Вісник КНУ. Біологія* **42–45**, 12 (2004).
15. Т. С. Тапбергенов и С. О. Тапбергенов, *Успехи соврем. естествознания* **7**, 92 (2009).
16. Г. П. Копильчук и О. М. Волощук, *Укр. біохім. журн.* **87** (1), 123 (2015).
17. O. N. Voloshchuk and G. P. Kopylchuk, *Biophysics* **60** (3), 420 (2015).
18. C. Y. Li, J. Z. Liu, and L. P. Wu, *World J. Gastroenterol.* **12** (13), 2120 (2006).
19. C. M. P. Cardoso, A. J. M. Moreno, L. M. Almeida, and J. V. A. Custodio, *Toxicol. in Vitro*, **17**, 663 (2003).
20. И. О. Доценко и Я. А. Трощинская, *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія* **22** (1), 46 (2014).
21. G. Kocic, J. Nikolic, T. Jevtic-Stoimenov, et al., *Scientific World Journal ID* 208239 (2012).

State of the System of Adenyl Nucleotides in the Liver of Rats with Toxic Hepatitis under the Conditions of Protein Deficiency

O.N. Voloshchuk and G.P. Kopylchuk

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

The content of adenyl nucleotides and activity of AMP catabolism enzymes in the cytosolic liver fraction of rats with acetaminophen-induced hepatitis have been studied under different dietary protein regimens. It has been established that in animals with toxic hepatitis, maintained on a diet rich in protein, a decrease of ATP and ADP content along with the preservation of AMP content at the control level is observed. At the same time in the liver cytosolic fraction of rats with acetaminophen-induced hepatitis under conditions of protein deficiency, a depletion of ATP and AMP pool is found. Alteration of the adenyl nucleotides content is accompanied by disturbances in activities of the AMP catabolism enzymes such as 5'-nucleotidase and AMP-deaminase. It has been established that in fully fed rats with toxic hepatitis compared to control values an increase of AMP-deaminase activity occurs during 5'-nucleotidase activation. Simultaneously, in protein-restricted rats with toxic liver injury a decrease of AMP-deaminase activity is observed when 5'-nucleotidase activity is kept at the level higher than control values. The results obtained point to the depletion of energy sources in liver cells of rats fed low protein diets with acetaminophen-induced hepatitis. The specified changes in AMP catabolism enzymes activity may be considered as one of the regulatory mechanisms of cellular energy function.

Keywords: alimentary protein deficiency, toxic hepatitis, cytosolic fraction, adenyl nucleotides, 5'-nucleotidase, AMP-deaminase