

ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ В РАЦИОНЕ НУТРИЕНТОВ

© 2020 г. О.Н. Волощук, Г.П. Копыльчук, К.А. Тазырова

Институт биологии, химии и биоресурсов Черновицкого национального университета им. Ю. Федьковича, 58012, Черновцы, ул. Леси Украинки, 25, Украина

E-mail: o.voloschuk@chnu.edu.ua

Поступила в редакцию 03.06.2019 г.

После доработки 13.12.2019 г.

Принята к публикации 17.12.2019 г.

Исследована активность изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, а также NADH-убихинонредуктазы в митохондриальной фракции печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Результаты исследований показали, что для животных, содержащихся на высокосахарозном рационе, характерна тенденция к снижению изоцитратдегидрогеназной и малатдегидрогеназной активности, а также снижение активности α -кетоглутаратдегидрогеназы в 2.5 раза. При этом для животных, содержащихся в условиях высокосахарозного рациона, характерно сохранение активности NADH-убихинонредуктазы на уровне контрольных значений. В то же время в митохондриальной фракции печени животных, получавших высокосахарозный/низкобелковый рацион, наблюдается значительное снижение ферментативных активностей NAD⁺-зависимых ферментов цикла Кребса при одновременном снижении активности NADH-убихинонредуктазы более чем 2.5 раза в сравнении с показателями контроля, что может рассматриваться как одно из звеньев механизма регуляции клеточной энергетики в условиях нарушений сбалансированности рациона сахарозой и пищевым белком. Полученные результаты могут быть использованы для разработки стратегии коррекции метаболических нарушений при разной обеспеченности рациона нутриентами.

Ключевые слова: изоцитратдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, NADH-убихинонредуктаза, печень, нутриенты.

DOI: 10.31857/S000630292002012X

Вопрос возможных механизмов формирования метаболических нарушений в условиях нутритивного дисбаланса в настоящее время остается открытым [1–3]. В рационе современного человека преобладают легкоусвояемые углеводы, насыщенные жиры на фоне снижения обеспеченности полноценным пищевым белком. При этом хроническое употребление большого количества сахарозы и алиментарная недостаточность белка могут выступать предикторами индуцирования и прогрессии метаболических нарушений [4, 5].

Одним из ключевых механизмов дисметаболических изменений может выступать нарушение процессов энергообеспечения клеток. Нарушение механизмов биотрансформации энергии рассматриваются как определяющие для повреждения и гибели клеток [6]. При этом печень является основным органом, регулирующим энергетический метаболизм в организме в целом [7, 8]. Поддержание работы системы энергообеспечения гепатоцитов необходимо не только для обес-

печения энергозависимых реакций, но и для активации компенсаторных механизмов, направленных на коррекцию и устранение возникших повреждений.

Ключевыми реакциями, обеспечивающими поддержание необходимого клетке уровня NADH, поставщика электронов для работы дыхательной цепи и обеспечения окислительного фосфорилирования, являются NAD⁺-зависимые реакции цикла Кребса. Поскольку цикл Кребса является связующим звеном многих метаболических путей, обеспечивает организм не только восстановленными коферментами, но утилизирует и поставляет субстраты для целого ряда биохимических реакций, то вопросы, связанные с регуляцией его функционирования, вызывают особый интерес [9].

Целью нашей работы было определение активности изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, а также NADH-убихинонредуктазы в митохондриях пе-

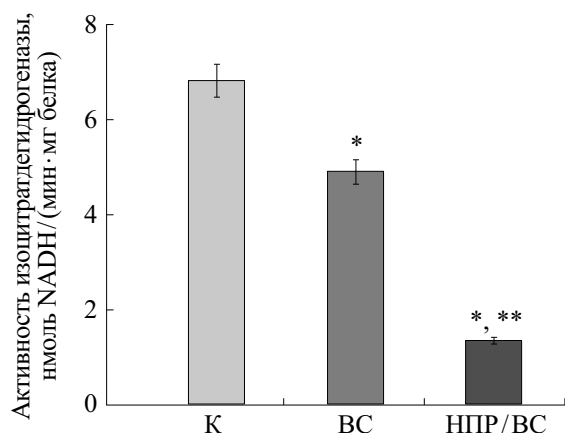


Рис. 1. Активность изоцитратдегидрогеназы в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Обозначения: К – крысы, содержащиеся на полноценном полусинтетическом рационе, контроль; ВС – крысы, содержащиеся на высокосахарозном рационе; НПР/ВС – крысы, содержащиеся на высокосахарозном/низкобелковом рационе. * – Достоверная разница по сравнению с контролем; ** – достоверная разница по сравнению с группой животных, содержащихся на высокосахарозном рационе.

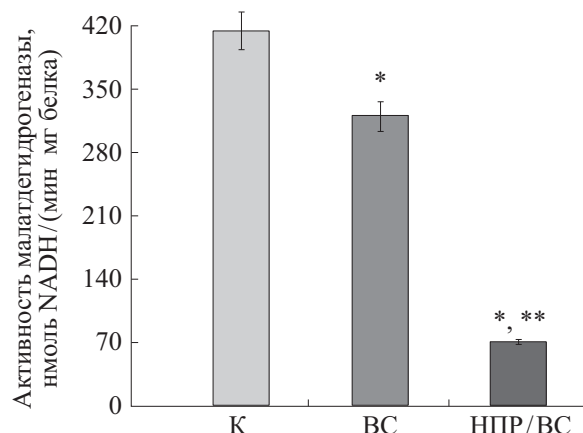


Рис. 2. Активность малатдегидрогеназы в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Обозначения, как на рис. 1.

чени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 36 белых нелинейных крысах массой 110–130 г и возрастом 2.0–2.5 месяца.

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: группа I – крысы, содержащиеся на полноценном полусинтетическом рационе (контроль); группа II – крысы, содержащиеся на высокосахарозном рационе; группа III – крысы, содержащиеся на высокосахарозном/низкобелковом рационе.

Животные группы I получали рацион, содержащий 14% белка (в виде казеина), 10% жиров, 10% сахарозы, сбалансированный по всем нутриентам [10]. Животные группы II получали высокосахарозный рацион, включающий 40% сахарозы и сбалансированный по всем другим нутриентам [11]. Животные группы III получали высокосахарозный/низкобелковый рацион, включающий 4.7% белка, 40% сахарозы и сбалансированное соотношение микронутриентов.

Длительность эксперимента составляла 28 суток. Цервикальную дислокацию крыс под легким эфирным наркозом осуществляли на 29-е сутки эксперимента. Выделение митохондриальной фракции из гомогената печени проводили методом дифференциального центрифугирования при 0–3°C [12].

Активность NAD^+ -зависимых дегидрогеназ цикла Кребса в митохондриальной фракции печени определяли спектрофотометрически. Активность изоцитратдегидрогеназы регистрировали по накоплению $NADH$ в реакции превращения изоцитрата в α -кетоглутарат [13], активность малатдегидрогеназы – по накоплению $NADH$ в реакции окисления малата [14]. Активность α -кетоглутаратдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по интенсивности окисления α -кетоглутарата при $\lambda = 417$ нм [15]. Активность $NADH$ -убихинонредуктазы определяли спектрофотометрически и рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции $6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [16].

Содержание белка определяли по методу Лоури.

Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших исследований показали, что для животных, содержащихся на высокосахарозном рационе, характерна тенденция к снижению изоцитратдегидрогеназной (рис. 1) и малатдегидрогеназной (рис. 2) активности. При этом актив-

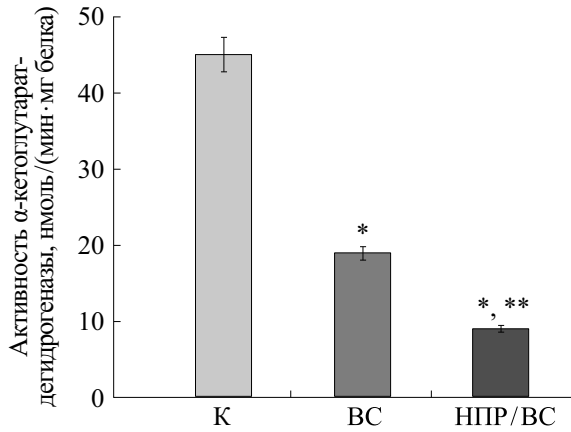


Рис. 3. Активность α-кетоглутаратдегидрогеназы в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Обозначения, как на рис. 1.

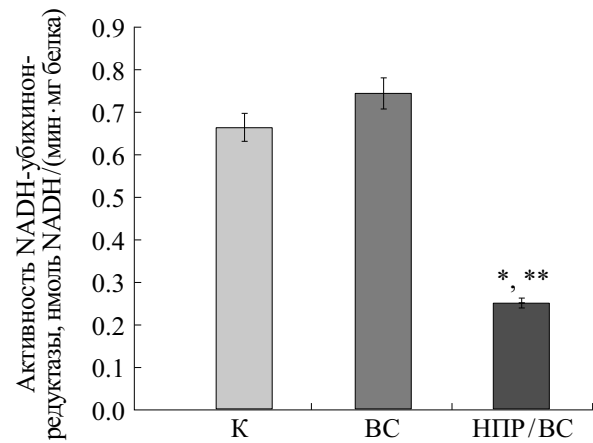


Рис. 4. Активность NADH-убихинонредуктазы в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Обозначения, как на рис. 1.

ность α-кетоглутаратдегидрогеназы снижается в два с половиной раза (рис. 3). Вероятно, усиленное торможение α-кетоглутаратдегидрогеназы будет сопровождаться накоплением α-кетоглутарата с последующим его использованием в других метаболических путях. В первую очередь при нарушении окисления α-кетоглутарата в митохондриях наблюдается накопление цитрата, первого продукта цикла Кребса, что будет сопровождаться выходом его в цитозоль с последующим преобразованием обратно в ацетил-КоА и использованием для биосинтеза липидов [17]. В литературе показано, что для активности α-кетоглутаратдегидрогеназы существует порог, который может быть существенно подавлен, прежде чем повлияет на максимальную скорость потребления кислорода [18], поэтому уровни NADH могут широко варьировать, прежде чем стать ограничивающим фактором для клеточного дыхания. Этот факт позволяет предположить, что любое снижение активности α-кетоглутаратдегидрогеназы может рассматриваться как первая попытка адаптировать метаболизм путем модуляции цикла Кребса, прежде чем нарушать функцию дыхательной цепи. Учитывая роль α-кетоглутаратдегидрогеназы в процессах биотрансформации энергии, а также метаболическом взаимодействии между митохондриями и цитозолем клетки, установленные изменения ее активности будут опосредовать изменения метаболических процессов в целом [19].

Следует отметить, что для животных, содержащихся в условиях высокосахарозного рациона, характерно сохранение активности NADH-убихинонредуктазы на уровне контрольных значений (рис. 4). Указанный факт свидетельствует о

том, что в исследуемых экспериментальных условиях, вероятно, пополнение пула NADH будет обеспечиваться реакциями гликолитической оксидоредукции либо окислительного декарбоксилирования пирувата. Можно предположить, что в таких условиях будет накапливаться ацетил-КоА с последующим усилением синтеза триацилглицеролов и накопления жира в гепатоцитах, поскольку усиление липолиза при высокосахарозном рационе отмечено в других исследованиях [20].

В митохондриях клеток печени крыс, получавших высокосахарозный/низкобелковый рацион, наблюдается снижение активности изоцитратдегидрогеназы и α-кетоглутаратдегидрогеназы в пять раз (рис. 1 и 3), а активности малатдегидрогеназы – в шесть раз (рис. 2).

Установленные изменения, с одной стороны, могут быть связаны с нарушением структурно-функциональной организации указанных ферментов, а с другой – нарушением их синтеза в условиях алиментарного дефицита протеина. Следствием установленного нами торможения активности NAD^+ -зависимых ферментов цикла Кребса будет не только истощение пула NADH в митохондриях, а и нарушение функционирования электронтранспортной цепи митохондрий. Кроме того, снижение активности NAD^+ -зависимых ферментов цикла Кребса может сопровождаться изменением соотношения $NAD^+/NADH$ с последующим обращением окислительного фосфорилирования и активацией сопряженного с ним гидролиза АТФ. Установленное нами снижение активности NAD^+ -зависимых ферментов указывает на тормо-

жение реакций цикла Кребса, следствием чего будет истощение пула NADH, необходимого для работы дыхательной цепи митохондрий. Изменения каталитических свойств исследуемых энзимов, возможно, вызваны конформационными изменениями их молекул вследствие окислительной модификации. Известно, что интенсификация свободнорадикальных реакций является одним из механизмов нарушения метаболических процессов в условиях избыточного употребления сахарозы [21].

Установленное нами снижение активности митохондриальной NADH-убихинонредуктазы более чем в два с половиной раза (рис. 4) может рассматриваться как одно из звеньев механизма регуляции клеточной энергетики в условиях нарушений сбалансированности рациона сахарозой и пищевым белком.

ВЫВОДЫ

Установлено, что в условиях содержания животных на высокосахарозном рационе в митохондриях клеток печени наблюдается тенденция к снижению активности NAD⁺-зависимых энзимов цикла Кребса при сохранении на уровне контроля показателей активности NADH-убихинонредуктазы, что может рассматриваться как адаптация метаболизма в условиях избыточного поступления сахарозы. В условиях высокосахарозного/низкопротеинового рациона выраженное снижение активности изоцитратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы сопровождается торможением более чем в два раза активности NADH-убихинонредуктазы, что может рассматриваться как одно из звеньев механизма регуляции клеточной энергетики в условиях нарушения сбалансированности рациона сахарозой и пищевым белком.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки стратегии коррекции метаболических нарушений при разной обеспеченности рациона нутриентами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках НИР «Биохимические и лазерно-поляриметрические параметры комплексного прогнозирования метаболических нарушений», № госрегистрации 0119U100717.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли с учетом положений Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Wu, *Food Funct.* **7** (3), 1251 (2016).
2. R. V. Tikole, R. Kulkarni, S. Uppinakudru, et al., *Int. J. Res. Ayurveda and Pharmacy* **4** (4), 605 (2013).
3. J. C. Malta de Oliveira, T. A. Ribeiro, L. P. Tófolo, et al., *J. Endocrin.* **221** (2), 285 (2014).
4. M. Maciejczyk, J. Matczuk, M. Żendzian-Piotrowska, et al., *Nutrients* **10** (10), 1 (2018).
5. A. Pezeshki, R. Zapata, A. Singh, et al., *Sci. Rep.* **6**, 25145₂ (2016).
6. E. F. Mason and J. C. Rathmell, *Biochim. Biophys. Acta* **1813** (4), 645 (2011).
7. L. Rui, *Compr. Physiol.* **4** (1), 177 (2014).
8. M. G. Radaelli, F. De Cobelli, A. Esposito, et al., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, 9796175 (2019).
9. S. Satapati, N. E. Sunny, B. Kucejova, et al., *J. Lipid Res.* **53**, 1080 (2012).
10. O. N. Voloshchuk and G. P. Kopylchuk, *Biomed. Khimiya* **62** (2), 169 (2016).
11. F. Fernandes-Lima, L. Monte, F. Nascimento, and B. Gregório, *Tissues Organs* **201** (6), 464 (2016).
12. O. N. Voloshchuk and G. P. Kopylchuk, *Biophysics* **60** (3), 420 (2015).
13. Y.-C. Huang, S. Soundar, and A. F. Colman, *Prot. Sci.* **9**, 104 (2000).
14. P. Cetica, L. Pintos, G. Dalvit, et al., *Reproduction* **126**, 753 (2003).
15. G. Kiss, C. Konrad, J. Doczi, et al., *FASEB J.* **27**, 2392 (2013).
16. I. V. Sharova and N. L. Vekshin, *Biophysics* **49** (5), 814 (2004).
17. R. Vatrinet, G. Leone, M. De Luise, et al., *Cancer & Metabolism* **5**, 3 (2017).
18. M. J. Kumar, D. G. Nicholls, and J. K. Andersen, *J. Biol. Chem.* **278**, 46432 (2003).
19. G. E. Gibson, J. P. Blass, M. F. Beal, and V. Bunik, *Mol. Neurobiol.* **31** (1-3), 43 (2005).
20. S. M. M. Ragab, S. Kh. A. Elghaffar, T. H. El-Metwally, et al., *Lipids in Health and Disease* **14**, 83 (2015).
21. K. Prasad and I. Dhar, *Int. J. Angiol.* **23** (4), 217 (2014).

Peculiarities of Hepatocyte Energy Metabolism when the Nutrient Content in the Chow Diet Varies

O.N. Voloshchuk, G.P. Kopylchuk, and K.A. Tazirova

*Institute of Biology, Chemistry, and Bioresources, Fedkovych Chernivtsi National University,
Chernivtsi, ul. Lesi Ukrainki 25, 58012 Ukraine*

This paper reports a study of the activity of the isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase and malate dehydrogenase and the NADH:ubiquinone reductase in the mitochondrial fraction from the liver tissues of rats fed diets of different sucrose and protein content. Our results show that in animals fed the high-sucrose diet, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities tend to decline and α -ketoglutarate dehydrogenase activity decreases 2.5 times. Interestingly, in animals, fed the high-sucrose diet, NADH:ubiquinone reductase activity remains at the control level. At the same time, in the mitochondrial fraction from the liver tissues of rats fed a low-protein:high-sucrose diet, the enzyme activities of NAD⁺-dependent dehydrogenases of the Krebs cycle decrease considerably more than 2.5 times as compared to control with a simultaneous decline in the activity of NADH:ubiquinone reductase. This is probably one of the links of the mechanism by which energy generated in the cell is regulated when a sucrose:protein ratio in the chow diet is unbalanced. The results obtained can be used to develop a strategy for correction of the metabolic disturbances when the nutrient content in the chow diet varies.

Keywords: isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, malate dehydrogenase, NADH:ubiquinone reductase, liver, nutrients