

Activity of the Respiratory Chain Enzymes of Blood Leucocytes' Mitochondria Under the Conditions of Toxic Hepatitis Induced Against the Background Alimentary Deprivation of Protein

O.N. Voloshchuk, G.P. Kopylchuk

Institute of Biology, Chemistry and Bioresources of Chernovtsi national university named by Yurii Fedkovich, Chernovtsi, Ukraine

*E-Mail: oxbm@mail.ru

Received September 30, 2015

Full functioning of the leucocytes' energy supply system is one of the essential factors for the immune surveillance system effective work. The pivotal enzymes of the leucocytes' energy biotransformation system are NADH-ubiquitin reductase, a marker of the Complex I of respiratory chain activity, and succinate dehydrogenase, key enzyme of the Complex II of respiratory chain.

The aim of research – to study the NADH-ubiquitin reductase and succinate dehydrogenase activity of the blood leucocytes' mitochondria under the conditions of toxic hepatitis induced against the background alimentary deprivation of protein. It is shown, that under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis a reduction of the NADH-ubiquitin reductase enzymatic activity is observed on the background activation of the succinate-dependent way of the mitochondrial oxidation.

Conclusion was made that alimentary deprivation or protein is a factor, aggravating the misbalance of the energy biotransformation system in the leucocytes of rats with toxic hepatitis. Established activity changes of the leucocytes' mitochondria respiratory chain key enzymes may be considered as one of the mechanisms, directed on the maintenance of leucocytes energy supply on a level, sufficient for their functioning.

Research results may be used for the biochemical rationale of the therapeutic approaches to the elimination and correction of the leucocytes' energy metabolism disturbances consequences under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis, aggravated by the alimentary protein deprivation.

Key words: alimentary deprivation of protein, leucocytes, mitochondria, NADH: ubiquinone reductase, succinate dehydrogenase

Метаболические превращения, происходящие в лейкоцитах периферической крови, отражают состояние обменных и регуляторных процессов в организме (Marchenko, Voloshchuk, 2014; Kramer *et al.*, 2014), а изучение активности отдельных звеньев энергетического обмена позволяет оценить эффективность функционирования системы биотрансформации энергии, обеспечивающей исполнение лейкоцитами своих функций. Полноценное функционирование системы энергообеспечения лейкоцитов является одним из необходимых условий эффективной работы системы иммунного надзора (MacIver *et al.*, 2008).

Центральными ферментами системы энергообеспечения лейкоцитов является NADH-убихинонредуктаза, маркер активности Комплекса I дыхательной цепи (Finel *et al.*, 1992), и сукцинатдегидрогеназа, ключевой фермент Комплекса II дыхательной цепи (Miles, 2003). NADH-убихинонредуктаза обеспечивает транспорт четырех протонов из матрикса в межмембранное пространство и восстановление убихинона (Sharova, Vekshin, 2004), сукцинатдегидрогеназа (сукцинат-КоQ-редуктаза) обеспечивает функционирование дополнительного пути для входа электронов в дыхательную цепь за счет окисления сукцината (Jones, Hirs, 2013).

На сегодня остается открытой и требует подробного изучения проблема биохимических механизмов формирования дисбаланса системы биотрансформации энергии в клетках иммунной

системы в условиях лекарственного гепатита, формирующегося в условиях алиментарного дефицита белка.

Цель исследований – определение активности NADH-убихинонредуктазы [КФ 1.6.5.3] и сукцинатдегидрогеназы [КФ 1.3.5.1] митохондрий лейкоцитов в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной депривации протеина.

MATERIALS AND METHODS

Исследования проводили на 27 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 3 группах животных: 1 – контроль (К); 2 – крысы с острым ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном рационе (Г); 3 – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся в условиях алиментарной депривации протеина (НПР+Г).

Животные 1-й и 2-й группы на протяжении 28 суток получали рацион, включающий 14 % протеина (в виде казеина), 10 % жиров и 76 % углеводов, сбалансированный по всем нутриентам (Reeves *et al.*, 1993). Животные 3-й группы

получали изоэнергетический рацион, содержащий 4,7 % белка, 10 % жиров, 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 2 дней с помощью специального зонда (Voloshchuk, Kopylchuk, 2015).

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

Выделение лейкоцитов периферической крови осуществляли с помощью метода седиментации в градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,077$ г/мл). Жизнеспособность клеток, определяемая в тесте с трипановым синим, составляла не менее 97%.

Для выделения митохондриальной фракции суспензию лейкоцитов ресуспендировали в 5 объемах буфера, содержащего 0,25 М сахарозу, 10 мМ фосфата калия, 1 мМ ЭДТА (pH 7,2). Суспензию клеток гомогенизировали. Гомогенат центрифугировали при 800 г на протяжении 10 минут. Осадок центрифугировали при 8000 г 10 минут и ресуспендировали с буфером без ЭДТА (Biswas *et al.*, 1997). Определение NADH-убихинонредуктазной активности проводили спектрофотометрически (Marchenko, Voloshchuk, 2014). NADH-убихинонредуктазную активность рассчитывали с учетом коэффициента молярной

экстинкции $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Сукцинатдегидрогеназную активность определяли по интенсивности восстановления феррицианида калия (Sharova, Vekshin, 2004). Содержание белка определяли по Лоури.

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

RESULTS AND DISCUSSION

Результаты исследований показали, что в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита наблюдается нарушение функциональной активности ферментативных маркеров дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов. Нами установлено торможение активности NADH-убихинонредуктазы лейкоцитов крыс с токсическим гепатитом в 1,3 раза по сравнению с показателями контрольной группы животных (рис. 1). Вероятно, причиной установленного факта является нарушение структурно-функциональной организации Комплекса I дыхательной цепи в данных экспериментальных условиях. Показано, что метаболит ацетаминофена – N-ацетил-р-бензохинонимин (NAPQI) способен связываться с остатками цистеина белков дыхательной цепи (Heard *et al.*, 2011). Учитывая, что структурными компонентами NADH-убихинонредуктазного комплекса являются железо-серные кластеры, возможно, одним из механизмов нарушения функциональной активности исследуемого фермента является образование комплексов

NAPQI-протеин. Сегодня образование ковалентных комплексов метаболитов ацетаминофена с митохондриальными белками рассматривается как триггер первичной митохондриальной дисфункции, определяющий дисбаланс процессов энергообеспечения (Andringa *et al.*, 2008).

В то же время у белок-дефицитных животных с токсическим гепатитом наблюдается практически десятикратное снижение активности NADH-

убихинонредуктазы. Вероятно, такие изменения связаны с нарушением синтеза отдельных субъединиц NADH-убихинонредуктазного комплекса в условиях дефицита белка. Установленный факт свидетельствует, что в условиях токсического гепатита, усугубленного алиментарной белковой недостаточностью, в митохондриях лейкоцитов происходит нарушение способности транспортировать электроны в дыхательную цепь от NADH-зависимых субстратов.

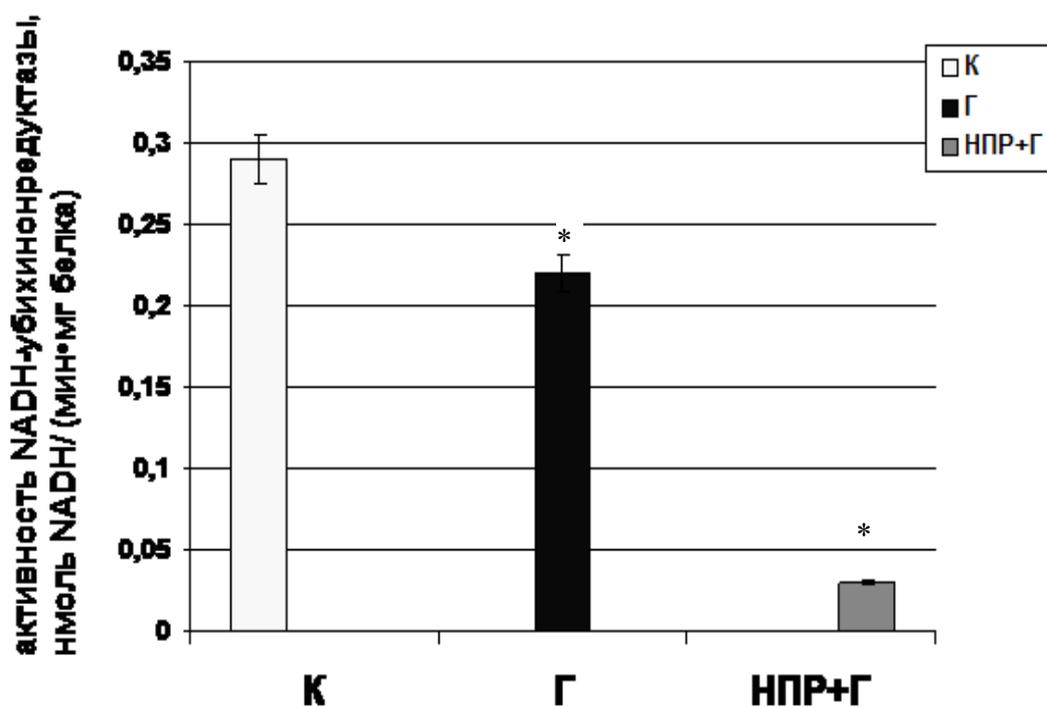


Figure 1. Активность NADH-убихинонредуктазы в митохондриальной фракции лейкоцитов периферической крови в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной депривации протеина

Примечание (тут и далее):

К – крысы, содержащиеся на полноценном полусинтетическом рационе

Г – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на полноценном полусинтетическом рационе

НПР + Г – крысы с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащиеся на низкопротеиновом рационе

*- статистическая значимость различий между опытной и контрольной группой ($P < 0,05$)

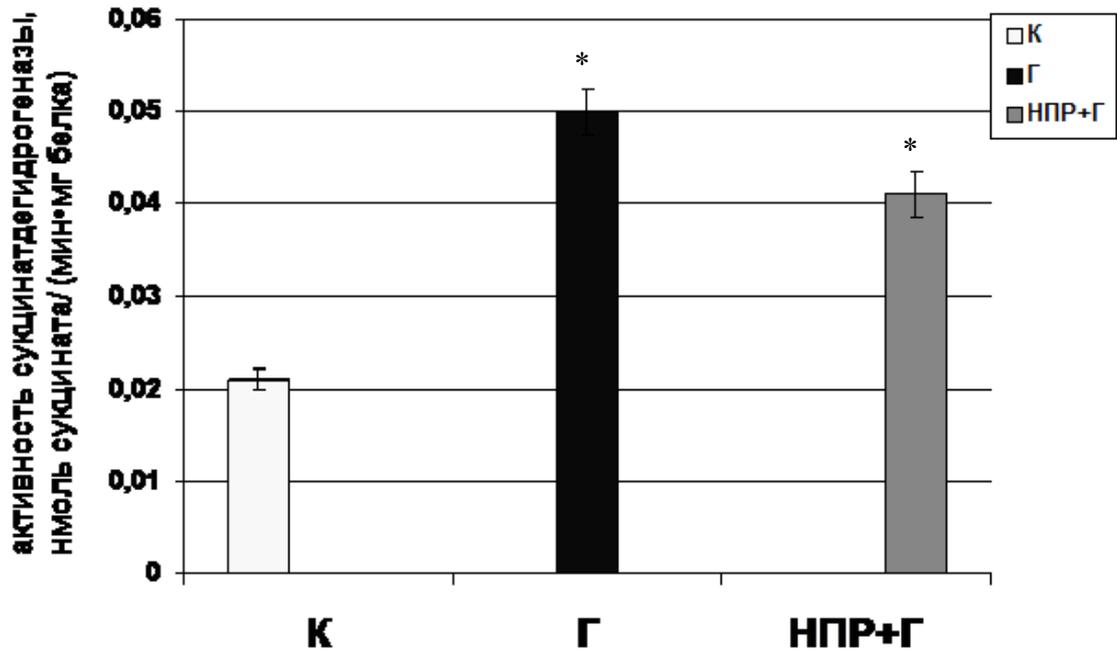


Figure 2. Активность сукцинатдегидрогеназы в митохондриальной фракции лейкоцитов периферической крови в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита на фоне алиментарной депривации протеина

Поэтому на следующем этапе исследований актуальным было изучение активности сукцинатдегидрогеназы лейкоцитов периферической крови у животных с токсическим гепатитом как посредника между FAD-зависимыми субстратами и дыхательной цепью. Именно активность сукцинатдегидрогеназы в значительной степени определяет скорость использования кислорода и синтеза АТФ в митохондриях в условиях нарушения активности NADH-убихинонредуктазы (Cecchini, 2003). Результаты наших исследований показали, что у животных с ацетаминофен-индуцированным гепатитом, содержащихся в различных режимах белкового питания, происходит активация сукцинатзависимого пути окисления по сравнению с интактными животными (рис. 2). Вероятно, в условиях повышенной потребности в энергии,

активация сукцинатдегидрогеназы позволяет сохранить энергосинтезирующую функцию цитохромного участка дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов. Увеличение потока электронов через Комплекс II дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов на фоне нарушения работы Комплекса I, вероятно, отражает активацию компенсаторных метаболических потоков в условиях повышенной потребности в энергии и обеспечивает поддержание энергообеспечения лейкоцитов на уровне, достаточном для их функционирования.

Установленные закономерности работы ферментов дыхательной цепи митохондрий лейкоцитов могут быть основополагающими в обеспечении их функционирования в условиях токсического гепатита на фоне алиментарной

депривации протеина.

Результаты исследований могут использоваться для биохимического обоснования терапевтических подходов к устранению и коррекции последствий нарушения энергетического обмена лейкоцитов в условиях ацетаминофен-индуцированного гепатита, усугубленного алиментарной депривацией протеина.

REFERENCES

- Andringa K.K., Bajt M.L., Jaeschke H., Bailey S.M. (2008) Mitochondrial Protein Thiol Modifications in Acetaminophen Hepatotoxicity: Effect on HMG-CoA Synthase. *Toxicol. Lett.*, **177** (3), 188-197.
- Biswas S., Ray M., Misra S., Dutta D.P., Ray S. (1997) Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic leucocytes by methylglyoxol. *J. Biochem.*, **323**, 343-348.
- Cecchini G. (2003) Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 77-109.
- Finel M., Skehel J.M., Albracht S.P.J., Fearnley I.M., Walker J.E. (1992) Resolution of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplexes, one of which contains the redox centers of the enzyme. *Biochemistry.*, **31**, 11425-11434.
- Heard K.J., Green J.L., James L.P., Judge B.S., Zolot L., Rhyee S., Dart R.C. (2011) Acetaminophencysteine adducts during therapeutic dosing and following overdose. *BMC Gastroenterology*, **11**, 20-29.
- Jones A.J.Y., Hirs J. (2013) A spectrophotometric coupled enzyme assay to measure the activity of succinate dehydrogenase. *Analytical Biochemistry.*, **442**, 19-23.
- Kramer P.A., Ravi S., Chacko B., Johnson M.S., Darley-Usmar V.M. (2014) A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biology*, **2**, 206-210.
- MacIver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L., Wofford J.A., Coloff J.L., Rathmell J.C. (2008) Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J. Leukocyte Biol.*, **84** (4), 949-957.
- Marchenko M.M., Voloshchuk O.N. (2014) The state of the energy-supply system of the blood leukocytes in the dynamics of guerin's carcinoma growth under the conditions of the low-level irradiation. *Biomed. Chem.*, **60** (6), 631-635.
- Miles B. (2003) The electron Transport Chain. *LSM.*, **2**, 1-11.
- Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. (1993) AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.*, **5**, 1939-1951.
- Sharova I.V., Vekshin N.L. (2004) Rotenone-insensitive NADH oxydation in mitochondrial

suspension occurs by NADH dehydrogenase of respiratory chain fragments. *Biophysic.*, **49**, 814-821.

Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P. (2015) The Peculiarities of the Structural and Functional

State of the Cytochrome Component of the Liver Mitochondrial Respiratory Chain under Conditions of Acetaminophen-Induced Hepatitis on the Background of Alimentary Protein Deprivation. *Biophysics.*, **60 (3)**, 420-424.