

УДК 616.36: [615.244 : 577.115]

АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ЕЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОГО ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ І ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ЧИННИКІВ ТА ВИКОРИСТАННІ ЛІПОСОМ

В. А. Грищенко, С. В. Хижняк, В. А. Томчук, Л. І. Степанова*,
В. М. Войціцький

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

РЕЗЮМЕ. Встановлено, що в умовах опромінення щурів, застосування ліпосом на основі фосфоліпідів молока (FLP-MD) сприяє відновленню активності ключових ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та більш ефективно — гепатоцитів. Профілактичне застосування FLP-MD за умов надходження до організму щурів Кадмію неефективне щодо показників активності ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Це необхідно враховувати при проведенні комплексної терапії кадмієвої інтоксикації із застосуванням ліпосом на основі фосфоліпідів молока-FLP-MD та інших препаратів.

Ключові слова: іонізуюча радіація, Кадмій, електрон-транспортний ланцюг, мітохондрії, ентероцити, гепатоцити, фосфоліпідні молока, ліпосоми.

РЕЗЮМЕ. Установлено, что в условиях облучения крыс, введение животным липосом на основе фосфолипидов молока (FLP-MD) способствует восстановлению активности ключевых ферментов электрон-транспортной цепи митохондрий энтероцитов тонкой кишки и более эффективно — гепатоцитов. Профилактическое применение FLP-MD в условиях поступления в организм крыс Кадмия не эффективно по отношению улучшения показателей активности ферментов электрон-транспортной цепи митохондрий. Это необходимо учитывать при проведении комплексной терапии кадмиевой интоксикации, используя липосомы на основе фосфолипидов молока FLP-MD и другие препараты.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, Кадмий, электрон-транспортная цепь, митохондрии, энтероциты, гепатоциты, фосфолипиды молока, липосомы.

SUMMARY. It was established that under the irradiation of the rats, the use of liposomes from milk phospholipids (FLP-MD) promotes the activity restore of key enzymes of the mitochondrial electron transport chain in the enterocytes. This effect is more expressed in the hepatocytes. Under the cadmium toxic effect on the organism the prophylactic use of the FLP-MD does not improve the enzyme activity of the mitochondrial electron transport chain. This fact must be considered in the comprehensive therapy of the cadmium intoxication with using of liposomes from milk phospholipids FLP MD and other preparations.

Key words: ionizing radiation, cadmium, electron transport chain, mitochondria, enterocytes, hepatocytes, milk phospholipids, liposomes.

Структурно-функціональний стан мітохондрій, які беруть безпосередню участь в енергозабезпеченні життєдіяльності клітин, найбільше зумовлює інтенсивність і характер метаболічних процесів за дії на організм різних чинників, у тому числі іонізуючої радіації [1] та Кадмію [2, 3]. Функціональну активність мітохондрій, перш за все, забезпечує внутрішня мембрана мітохондрій, яка містить компоненти електрон-транспортного (дихального) ланцюга та H^+ -АТФазу, що необхідні для перетворення енергії переносу електронів при синтезі АТФ з АДФ та неорганічного фосфору (Φ_H) [4]. Функціонування ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій тісно пов'язане із структурним станом мембрани, що забезпечується їх ліпідним оточенням.

Порушення біоенергетичних процесів внаслідок модифікації електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, у тому числі зниження рівня АТФ у клітині в результаті роз'єднання процесів окиснення і фосфорилування, призводить до виключення іонних насосів, входу в клітину Ca^{2+} , Na^+ та води, порушення

всіх біохімічних процесів, які потребують затрати енергії АТФ [5].

Відомо, що радіаційній та кадмієвій модифікації підлягає як білковий, так і ліпідний компоненти клітинних мембран: спостерігається активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [6], зміни жирокислотного складу фосфоліпідів і конформації мембранних білків [7]. Тому для відновлення ліпідної компоненти мітохондріальної мембрани можливе застосуванням ліпосом на основі фосфоліпідів молока — FLP-MD, яка містить також ненасичені жирні кислоти, ретинолу ацетат і α -токоферол та володіє мембранотропними, репаративними й антиоксидантними властивостями [8].

Метою роботи було дослідити активність ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів за дії на організм іонізуючої радіації та Кадмію, а також можливість коригування функціонального стану мітохондріальної мембрани шляхом застосування ліпосом на основі фосфоліпідів молока (FLP-MD).

Матеріали і методи

Дослідження були проведені на безпородних щурах-самцях масою тіла 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Дослід складався із двох серій експериментів. У кожній серії тварин розподіляли на групи (по 6 тварин), яким відповідав свій контроль. Серія 1: контроль — інтактні тварини; I група — тварин тотально разово опромінювали рентгенівськими променями в дозі 2,0 Гр; II група — тваринам перорально вводили 1%-й розчин ліпосом на основі ФЛ молока (FLP-MD) у дозі 13,5 мг/кг маси тіла упродовж 5 діб, а потім піддавали рентгенівському опроміненню в дозі 2,0 Гр. Евтаназію щурів здійснювали шляхом декапітації через 1 добу після опромінення.

Опромінення проводили на установці РУМ-17 з тубусом за наступних умов: потужність дози 0,17 Гр·хв, фільтри 0,5 мм Си та 1 мм Al, сила струму 10 мА, напруга 200 кВ, шкіро-фокусна відстань 50 см.

Серія 2: контроль — інтактні тварини; I група — тваринам упродовж 14 діб перорально вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла, що відповідає 1/50 ЛД₅₀; II група — тваринам перорально вводили 1%-й розчин ліпосом на основі ФЛ молока (FLP-MD) у дозі 13,5 мг/кг маси тіла упродовж 5 діб, а потім на тлі їх застосування, вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла (впродовж 14 діб). Щурів декапітували після закінчення експерименту.

Утримання та евтаназію тварин проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986).

Мітохондрії ентероцитів тонкої кишки і тканин печінки отримували методом диференційного центрифугування, а після заморожування-відтаювання цієї фракції та подальшому її центрифугуванні при 25 000 g упродовж 30 хв отримували осад, який містив субмітохондріальні частинки (СМЧ) — обернена назовні внутрішня мембрана мітохондрій [9]. Вміст білка в одержаних препаратах визначали методом Лоурі та спів.

Визначення НАД·Н-КоQ-оксидоредуктазної (ЕС 1.6.99.3.) активності проводили за методом [10], сукцинат-КоQ-оксидоредуктазної (ЕС 1.3.99.1.) активності — [11], КоQ-цитохром с-оксидоредуктазної (ЕС 1.10.2.2.) активності — [12], цитохром с-оксидоредуктазної (ЕС 1.9.3.1.) активності — [13], Н⁺-АТФази (ЕС 3.6.1.4.) активності — методом [14].

Результати експериментальних досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [15]. Зміни показників вважали вірогідними при P ≤ 0,05.

Результати та обговорення

Результати дослідження активності основних ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій гепатоцитів, а також оберненої Н⁺-АТФази за дії опромінення представлені в табл. 1.

Встановлено, що опромінення призводить до зростання активності сукцинат-КоQ-оксидоредуктази, КоQ-цитохром с-оксидоредуктази та цитохром с-оксидоредуктази, відповідно, в середньому на 36, 53 і 31 %, тоді як активність НАДН-КоQ-оксидоредуктази та Н⁺-АТФази знижується, відповідно, на 35 та 16 % відносно контролю. Попереднє пероральне введення

Таблиця 1

Активність ферментів у мембранних препаратах мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів при опроміненні та застосуванні ліпосом на основі фосфоліпідів молока FLP-MD (M±m, n =6)

Фермент	Умови дослідю					
	Гепатоцити			Ентероцити тонкої кишки		
	Контроль	I група	II група	Контроль	I група	II група
НАДН-КоQ -оксидоредуктаза, мкмоль відн. убіхінолу / хв·мг білка	222,6±27,8	142,5±13,1*	256,6±23,8	143,9±11,9	103,1±10,9*	134,8±10,5
Сукцинат-КоQ -оксидоредуктаза, мкмоль фериціаніду / хв·мг білка	168,5±15,9	227,1±18,1*	174,1±13,9	150,7±17,4	193,2±18,8*	160,8±13,4
КоQ-цитохром с -оксидоредуктаза, мкмоль відн. цит. с / хв·мг білка	51,3±8,1	78,6±7,8*	65,3±2,8	42,4±2,8	81,6±7,8*	79,0±6,1*
Цитохром с -оксидоредуктаза, мкмоль ок.цит.с/ хв·мг білка	82,8±7,6	108,8±4,8*	72,6±9,8	54,6±4,8	51,8±5,1	53,2±5,1
Н ⁺ -АТФаза, мкмоль Рн. / хв·мг білка	1,45±0,13	1,22±0,10*	1,42±0,11	1,81±0,13	0,95±0,10*	0,86±0,07*

Примітка. Контроль — інтактні тварини, I група — тварин тотально однократно опромінювали рентгенівськими променями в дозі 2,0 Гр, II група - тваринам перорально вводили 1%-й розчин FLP-MD (13,5 мг/кг) упродовж 5 діб, а потім піддавали рентгенівському опроміненню в дозі 2,0 Гр.

* — P ≤ 0,05, відносно контролю .

щурам FLP-MD при їх подальшому опроміненні призводить до стабілізації досліджуваних показників (не спостерігається вірогідних змін активності досліджуваних ферментів) мітохондрій гепатоцитів відносно контролю (табл. 1).

Подібні дослідження проведено і для СМЧ ентероцитів тонкої кишки (табл. 1). Встановлено, що опромінення призводить до зростання активності сукцинат-КоQ-оксидоредуктази, КоQ-цитохром с-оксидоредуктази та цитохром с-оксидоредуктази, відповідно, в середньому на 28, 92 та 6 %. При цьому активність НАДН-КоQ-оксидоредуктази та H^+ -АТФази знижується на 28 та 47 % щодо контролю. При введенні тваринам FLP-MD до опромінення активність H^+ -АТФази мітохондрій ентероцитів тонкої кишки також знижується, хоча активність інших досліджуваних ферментів достовірно не відрізняється від контролю. Слід відзначити, що введення інтактним тваринам лише розчину ліпосом на основі ФЛ молока (FLP-MD) в умовах досліду не викликає змін досліджуваних показників (результати не представлено).

Із урахуванням мембранної локалізації ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, зміни в їх активності (І серія експериментів) можуть бути обумовлені радіаційно-індукованими структурними перебудовами ліпідної компоненти мітохондріальної мембрани внаслідок ПОЛ, що спостерігалось в попередніх дослідженнях [16, 17]. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока (FLP-MD), які стабілізують ліпідний стан клітинних мембрани, у тому числі внутрішньої

мітохондріальної [18], призводить до відновлення активності ферментів мембран мітохондрій гепатоцитів і частково ентероцитів тонкої кишки в умовах опромінення.

Надходження Кадмію до організму (ІІ серія експериментів) призводить до зниження у препаратах СМЧ гепатоцитів активності досліджуваних ферментів: сукцинат-КоQ — оксидоредуктази, КоQ-цитохром с — оксидоредуктази, цитохром с — оксидоредуктази та H^+ -АТФази, відповідно, у середньому на 45, 23, 38 та 38 % відносно контролю (табл. 2). Аналогічна закономірність щодо активності досліджуваних ферментів має місце і в препаратах СМЧ ентероцитів тонкої кишки, а саме: зниження активності сукцинат-КоQ-оксидоредуктази, КоQ-цитохром с-оксидоредуктази, цитохром с-оксидоредуктази та H^+ -АТФази, відповідно на 40, 27, 26 та 32 % відносно контролю (табл. 2). Виняток становить НАДН-КоQ-оксидоредуктаза, активність якої майже не змінюється в умовах досліду.

Введення тваринам FLP-MD на тлі надходження Кадмію, як і при окремому надходженні цього металу, призводить до подібних змін досліджуваних показників (табл. 2). При аналізі отриманих результатів слід урахувати, що за умов надходження Кадмію до організму його вплив на клітини зумовлений різними механізмами, у тому числі ініціюванням окисних процесів, причому не лише ПОЛ [19, 20]. Окиснення тіолових груп білкових молекул, що призводить до інгібування активності різноманітних ферментних систем, у т. ч. АТФази, чи заміна металів у металовмісних ферментах, наприклад, електрон-транспорт-

Таблиця 2

Активність ферментів у мембранних препаратах мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів при дії Кадмію та застосуванні ліпосом на основі фосфоліпідів молока FLP-MD ($M \pm m$, $n = 6$)

Фермент	Умови досліду					
	Гепатоцити			Ентероцити тонкої кишки		
	Контроль	I група	II група	Контроль	I група	II група
НАДН-КоQ -оксидоредуктаза, мкмоль відн. убіхінолу / хв·мг білка	221,1±21,9	202,9±20,1	226,1±23,9	120,2±10,9	110,8±11,9	129,8±12,5
Сукцинат-КоQ -оксидоредуктаза, мкмоль фериціаніду / хв·мг білка	131,6±7,8	72,4±3,1*	77,8±4,8*	158,4±7,4	95,6±8,8*	91,8±9,4*
КоQ-цитохром с -оксидоредуктаза, мкмоль відн. цит. с / хв·мг білка	28,8±8,1	22,2±2,8*	22,3±2,8*	29,4±2,8	21,6±2,4*	24,4±2,1*
Цитохром с -оксидоредуктаза, мкмоль ок.цит.с/ хв·мг білка	36,6±7,6	22,8±4,8*	22,6±2,8*	52,3±5,8	38,8±7,1*	33,2±4,1*
H^+ -АТФаза, мкмоль Рн. / хв·мг білка	1,00±0,13	0,62±0,10*	0,62±0,11*	1,06±0,13	0,72±0,10*	0,73±0,07*

Примітка. Контроль — інтактні тварини, I група — тваринам упродовж 14 діб перорально вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла, що відповідає 1/50 ЛД₅₀, II група — тваринам перорально вводили 1%-й розчин FLP-MD у дозі 13,5 мг/кг маси тіла упродовж 5 діб, а потім, на тлі його застосування, вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла (впродовж 14 діб).

* — $P \leq 0,05$, відносно контролю.

ного ланцюга, може впливати на їхню функціональну активність.

На зниження функціональної активності електрон-транспортного ланцюга мітохондрій за дії Кадмію можуть вплинути структурні порушення мітохондріальних мембран: збільшення мікрров'язкості анулярних ліпідів, зростання структурної жорсткості білкових молекул [20]. Причому це можливо як безпосередньо, так і за рахунок пошкодження лізосом, що призводить до виходу лізосомальних ферментів, подальшої деструкції мітохондрій і, як результат — зниження окиснювального фосфорилування та роз'єднання процесів дихання і фосфорилування. Виявлене, внаслідок надходження Кадмію, зниження активності ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій може призводити до порушення транспорту електронів та аеробної фази дихання.

Таким чином, враховуючи, що в основі цитотоксичної дії важких металів (внаслідок їх накопичення), у т. ч. Кадмію, лежать різноманітні механізми, застосування лише препаратів мембраностабілізуючої та антиоксидантної дії (подібних ліпосомам із фосфоліпідів молока) не може бути ефективне. Потрібно вра-

ховувати необхідність проведення, наприклад хелатотерапії, для зниження рівня накопиченого Кадмію в клітинах, що використовується в комплексному лікуванні кадмієвої інтоксикації.

Висновок. Результати дослідження активності основних ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій: НАДН-КоQ-оксидоредуктази, сукцинат-КоQ-оксидоредуктази, КоQ-цитохром с-оксидоредуктази та цитохром с-оксидоредуктази, а також H^+ -АТФази свідчать, що в умовах опромінення пероральне введення шурам ліпосом із фосфоліпідів молока (FLP-MD) призводить до відновлення досліджуваних показників, причому більш ефективно це відбувається для мітохондріальної мембрани гепатоцитів. Профілактичне застосування FLP-MD за умов надходження до організму шурів Кадмію не призводить до покращання показників активності ферментів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Враховуючи вище зазначені механізми виникнення патологічних змін при кадмієвій інтоксикації, необхідно проводити комплексну терапію тварин із застосуванням FLP-MD та, наприклад, хелатуючих препаратів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кучеренко М. Є. Радіаційно-індукована структурно-метаболічна модифікація ентероцитів та лімфоїдних клітин / [М.Є. Кучеренко, В.М. Войціцький, С.В. Хижняк та ін.]: під заг. ред. акад. НАН України М. Є. Кучеренка. — К.: Фітосоціоцентр, 2006. — 202 с.
2. Общая токсикология [Под ред. Б.А. Курляндского. В.А. Филова]. — М.: Медицина, 2002. — 608 с.
3. Хижняк С.В. Функціонування клітин при кадмієвій інтоксикації/ С.В. Хижняк // Соврем. проблемы токсикол. — 2009. №1. — С.54–58
4. Біохімія. [Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Васильєв О.М. та ін.] — К.: ВПЦ "Київський університет", 2002. — 480 с.
5. Pastorino J.G. Biological effect of cadmium and response of the adult rat / J.G. Pastorino, J.W. Snyder, A. Serroni // J. Biol. Chem. — 1993. — V.268, №2. — P.13791–13798.
6. Функціонування антиоксидантної системи за дії кадмію на організм шурів / С.В.Хижняк, В.А. Грищенко, А.О. Прохорова [и др.] // Укр. біохім. журнал. —2010. — Т.82, № 4. — С.58–64.
7. Ентероцити тонкої кишки та радіація / [М.Є. Кучеренко, С.В. Хижняк, Р.З. Вексларський, В.М. Войціцький]. — Київ: Фітосоціоцентр, 2003. — 176 с.
8. Пат. 86516 Україна, МПК А 61К 35/20 А 23К 1/00. Ветеринарна біологічно активна добавка ліпосомальної форми та спосіб репаративної терапії в гепатології / Мельничук Д.О., Грищенко В.А., Литвиненко О.М.; заявник і патентовласник НУБіП України. — № а 200710252; заявл. 14.09.2007; опубл. 27.04.2009, Бюл. № 8.
9. Северин Н. В. Практикум по биохимии; /под ред. Н. Северина, Л. Соловьева. — М.: Из-во МГУ, 1989. — 389 с.
10. Покровский А.А. Особенности переноса электронов в митохондриях слизистой желудка / А.А. Покровский, Т.Ю. Мальцев // Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. — М. "Наука", 1977. — 160 с.
11. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. /М.И. Прохорова — Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. — С.193–194.
12. Engel W.D. Ubiquinol-cytochrome c reductase / W.D. Engel, H. Schagger, G. Von Jagow // Biochim. et Biophys. Acta — 1980. — V. 592. — P. 211–222.
13. Moreau F. Isolement et Proprietes des Membranes Externes et Internes de Mitochondries Vegetales / F. Moreau, C. Lance // Biochimie. — 1972. —V. 54. — P. 1335–1348
14. Некоторые итоги изучения механизмов нарушения азотистого и энергетического обмена при воздействии на организм различных видов ионизирующих излучений / А.Т. Пикунев, Н.А. Диско, М.Ф. Кукулянская [и др.] // Методы биохимических исследований. — Л., 1982. — С. 49–55.
15. Кучеренко М.Є. Сучасні методи біохімічних досліджень. / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 412 с.
16. Грубская Л.В. Влияние ионизирующего излучения низкой мощности на состояние цепи переноса электронов митохондрий эритроцитов тонкого кишечника крыс / Л.В. Грубская, В.М. Войцицкий, С.В. Хижняк // Укр. біохім. журнал. — 2012. — Т.84, № 1. — С.34–41
17. The structural and functional state of enterocyte mitochondria under chronic and single ionizing irradiation / [О.Кысил, S.Khyzhnyak, A.Klepko, V. Voitsitskiy] // In book "Current problems of radiation research". — К.: НАН України, 2007. — С. 134–151.
18. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології [за ред. Д. О. Мельничука]. — К.: НУБіП України, 2010. — 400 с.
19. Хижняк С.В. Клітинні механізми токсичності кадмію / С.В. Хижняк. — К.: Видавництво "LAT & K", 2010, 213 с.
20. Вовканич Л.С. Ефекти важких металів на функціональний стан мітохондрій печінки / Л.С. Вовканич, Д.О. Дубицький // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. — 1998. — № 1. — С.5–9.

Надійшла до редакції 25.05.2012 р.