

УДК 619:616.935:636.2:577.115.3

АКТИВНІСТЬ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ЕНЗИМІВ У РАЗІ ПОРУШЕНЬ ЛІПІДНОГО МЕТАБОЛІЗМУ В ГЕПАТОЦИТАХ

Л. Калачнюк, Д. Мельничук*, Г. Калачнюк

*Науково-дослідний інститут біотехнологічних основ
підвищення продуктивності тварин*

*Львівської національної академії ветеринарної медицини ім.С.З. Гжицького
вул. Пекарська 50, Львів 79010, Україна
e-mail: lilimarg@polynet.lviv.ua*

**Національний аграрний університет України
вул. Героїв Оборони 15, Київ 03041, Україна*

На моношарових культурах гепатоцитів здорових і диспепсійних телят з'ясовано, що зі збільшенням дози $[1-^{14}\text{C}]$ олеату в культуральному середовищі прямопропорційно підвищується рівень включення її мітки у кислоторозчинні продукти, інтрацелюлярні триацилгліцероли та сумарний пул інтрацелюлярних ліпідів. Суттєве зниження використання $[1-^{14}\text{C}]$ олеату всіма зазначеними молекулярними формами метаболізму ліпідів зафіксовано в разі додавання його разом з іншими неміченими джерелами есенціальних жирних кислот, що свідчить про конкурентне використання ліпідних компонентів клітинами печінки. На гомогенатах печінки доведено, що за умов діареї у мітохондріях гепатоцитів телят вірогідно знижується активність цитрат-синтази, яка каталізує початкову реакцію циклу трикарбонних кислот, та цитохром-С-оксидази, за допомогою якої відбувається кінцева стадія біологічного окиснення-відновлення електронами молекулярного кисню. Виявлені зміни можна пов'язати зі структурно-функціональними порушеннями і, зокрема, з β -окисненням жирних кислот, перетвореннями інтермедіатів у циклі трикарбонних кислот, транспортування протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану та іншими біохімічними процесами в гепатоцитах.

Ключові слова: цитрат-синтаза, цитохром-С-оксидаза, жирні кислоти, гепатоцити, телята, діарея.

Дослідження вмісту загальних ліпідів та їхніх окремих компонентів – холестеролу, холестеролу естерифікованого, триацилгліцеролів, есенціальних жирних кислот (ЕЖК), фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, кардіоліпіну, свінгомієліну, фосфатидилсерину і фосфатидилінозитулу засвідчили, що в гепатоцитах новонароджених диспепсійних телят на 20–30% менше загальних ліпідів, ніж у гепатоцитах здорових тварин цього ж віку, що є ознакою різкого порушення структурно-функціонального стану клітин [4, 8, 9]. За жирнокислотним складом фосфоліпіди гепатоцитів у диспепсійних телят відрізняються від фосфоліпідів здорових тварин нижчим вмістом лінолевої (7,4 проти 22,2%) та олеїнової кислот (майже у два рази; 11,6 проти 23,4%) на тлі вірогідного ($P < 0,001$) збільшення кількості пальмітинової і стеаринової кислот [4]. У цьому разі вірогідно в чотири рази знижується вміст аполіпопротеїну В-100 (apoB-100) й альбуміну (на 28%) на тлі чіткої тенденції до підвищення рівнів РНК (у тім числі мРНК) й загального білка [5, 7]. За таких порушень ще важливо було б знати й про стан активності каталізаторів багатьох біохімічних реакцій, які постійно функціонують у клітині. Це не тільки підтвердило б наведені зміни, а й дало б змогу виявити рівень та механізми їхнього виникнення. З огля-

ду на це ми продовжили експерименти щодо з'ясування змін активності регуляторних ензимів у мітохондріях гепатоцитів здорових і диспепсійних телят, а також визначення рівня використання ЕЖК у пошкоджених клітинах.

Досліди проводили в умовах *in vivo* та *in vitro* на зразках печінки з використанням моношарових культур. Експерименти з визначення дозозалежності та конкурентності використання $[1-^{14}\text{C}]$ олеату гепатоцитами виконували за методикою, описаною раніше [6]. Активність цитрат-синтази (CS, КФ 4.1.3.7) і цитохром-С-оксидази (СОХ, КФ 1.9.3.1) досліджували за загальноприйнятими методами [11, 12]. Активність CS у оброблених ультразвуком гомогенатах визначали шляхом вимірювання початкової швидкості реакції при 412 нм за методом фіксації ДТНБ – 5,5'-дитіобіс(2-нітробензоату) [11]. Реакційна суміш містила 0,2 мМ ДТНБ, 50 мкМ ацетил-КоА, 100 мМ *trp*-HCl (рН 8,1), 100 мкМ оксалоацетату, об'єм проби становив 1 мл. Реакцію проводили при 25°C й ініціювали додаванням оксалоацетату.

Активність СОХ вимірювали у заморожено-розморожених оброблених ультразвуком гомогенатах при 25°C згідно з методикою [12] із 90 мкМ відновленого цитохрому С як субстрату і 50 мМ K_2HPO_4 (рН 7,4). Початкову швидкість обчислювали за формулою $V=k\cdot[S]$, у якій стала першого порядку k визначена експериментально; концентрація субстрату $[S]$ становила 90 мкМ. За одиницю активності CS і СОХ прийнято ту кількість ензиму, яка за умов експерименту каталізувала виділення 1 мкмоль коензиму А або окиснення 1 мкмоль цитохрому С відповідно за 1 хв при 25°C. Питомі активності виражено в одиницях на 1 г тканини сирової маси (U/г сирової тканини).

Вміст білка визначали за Лоурі [10] з використанням як стандарту альбуміну сироватки крові бика. Статистичне опрацювання отриманих цифрових даних виконували за допомогою програми Microcal Origin (Version: 5,0) з використанням критерію Стюдента t [4]. Одержані результати та допоміжні дані наведено в табл. 1–3 та показано на рис. 1, 2.

Із даних табл. 1 видно, що використання $[1-^{14}\text{C}]$ олеату клітинами печінки внаслідок збільшення його дози в культуральному середовищі лінійне. Це корелює як із прогресувальним утворенням кількості кислоторозчинних продуктів у середовищі, так і зі збіль-

Таблиця 1

Дозозалежне використання $[1-^{14}\text{C}]$ олеату гепатоцитами здорових телят при 24- і 48-годинній інкубації в культуральному середовищі, нмоль олеату/мкг ДНК; $M\pm m$; $n=5$

| МФЛМ (час інкубації) | Кількість олеату в середовищі (мМ) | | | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|-------------|---------------|---------------|----------------|
| | 0,1 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 2,5 |
| Кислоторозчинні продукти | | | | | |
| 0–24 год | 3,33±0,76 | 10,09±2,08* | 18,19±3,43** | 28,08±5,36*** | 37,91±6,01*** |
| 0–48 год | 7,72±1,31 | 18,07±2,42* | 33,81±4,87** | 50,77±5,14*** | 66,37±8,31*** |
| Інтрацелюлярні триацилгліцероли | | | | | |
| 0–24 год | 0,77±0,09 | 2,43±0,21* | 5,89±0,48** | 21,77±3,41*** | 38,06±4,83*** |
| 0–48 год | 1,82±0,21 | 7,11±1,81* | 14,96±2,31** | 52,17±4,76*** | 71,43±7,07*** |
| Сумарний пул інтрацелюлярних ліпідів | | | | | |
| 0–24 год | 2,96±0,37 | 4,97±0,64 | 9,59±0,74*** | 29,05±4,31*** | 42,14±5,93*** |
| 0–48 год | 7,12±0,47 | 15,07±1,93* | 27,75±3,42*** | 71,07±6,43*** | 93,13±11,42*** |

Примітка. МФЛМ – молекулярні форми ліпідного метаболізму. Вірогідність різниць порівняно з показниками для проб з 0,1 мМ олеатом * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$

шенням включень $[1-^{14}\text{C}]$ олеату в інтрацелюлярні триацилгліцероли. Такий же висновок підтверджений і даними про зростання сумарного пулу інтрацелюлярних ліпідів. І якщо зазначена інтерпретація результатів виконана на підставі даних, які відображають зміни вмісту молекулярних форм ліпідного метаболізму за час інкубації клітин у межах 0–24 год, то такі ж закономірності змін простежуються і в разі інкубації гепатоцитів у межах 0–48 год, але вже переважно у подвоєному вигляді. Отже, одержані результати дають реальні підстави для проведення експериментів з урахуванням конкурентності адекватних, але немічених джерел ліпідів і жирних кислот (ЖК), що їх пошкоджені клітини здатні використовувати з репаративними цілями. З цією метою виконано експерименти, результати яких наведені в табл. 2.

Результати табл. 2 свідчать, що за рівнем включення $[1-^{14}\text{C}]$ олеату в усі досліджувані форми ліпідного метаболізму гепатоцитів телят контрольної групи (Г-1) узгоджуються з даними табл. 1. Важливо, що внесення довголанцюгових есенціальних жирних кислот (дЕЖК) разом із міченим олеатом у культуральному середовищі (другий варіант) веде до вірогідного зниження включення $[1-^{14}\text{C}]$ олеату в ліпідні компоненти. Це свідчить про інтенсивне конкурентне використання обох джерел ліпідів клітинами здорових телят. Ще виразніше зниження рівня використання їх зареєстроване у третьому варіанті, де в культуральному середовищі були гепатоцити діарейних телят. Це можна пояснити швидким зношуванням ослаблених за структурою клітин, відібраних від хворих телят, у разі їхньої довготривалої інкубації. Посилення процесів використання олеату і довголанцюгових есенціальних жирних кислот (дЕЖК) зафіксовано в інкубатах із клітинами печінки, які піддавали традиційному лікуванню (ТЛ; четвертий варіант). І вірогідні різниці майже зовсім зникають в інкубаційній системі п'ятого варіанта, де використовували гепатоцити від телят, підданих комплексному лікуванню, тобто в разі поєднання ТЛ із додатковим застосуванням дЕЖК.

Отже, експерименти на підставі оцінки конкурентності адекватних мічених і немічених джерел речовин та ЖК з репараційними цілями треба вважати виправданими й доцільними за умов використання моделі моношарової культури [6] гепатоцитів із різним ступенем пошкодження їхнього структурно-функціонального стану.

Таблиця 2

Конкурентне використання $[1-^{14}\text{C}]$ олеату гепатоцитами телят у разі 48-годинної інкубації його разом із неміченим джерелом дЕЖК у культуральному середовищі, нмоль олеату/мкг ДНК; $M \pm m$; $n=5$

| Молекулярні форми ліпідного метаболізму | Варіанти й умови експерименту | | | | |
|---|--------------------------------|---|---|--|---|
| | перший; 2 мМ олеату; Г-1 | другий; 2 мМ олеату, FLP-MD [§] ; Г-1 | третій; 2 мМ олеату, FLP-MD; Г-2 | четвертий; 2 мМ олеату, FLP-MD; Г-3 | п'ятий; 2 мМ олеату, FLP-MD; Г-4 |
| ASP | 51,74±5,84 | 27,32±3,07* | 10,94±1,76 [#] | 16,51±1,98 [#] | 25,63±3,46 |
| ITAG | 53,08±3,72 | 28,81±2,91** | 12,05±1,81 [#] | 19,02±3,05 [#] | 26,31±3,41 |
| TICL | 69,84±7,07 | 34,07±2,89** | 15,76±2,03 [#] | 22,29±3,73 [#] | 32,93±4,04 |

Примітка. Групи тварин: Г-1 – контрольна, Г-2 – діарея, Г-3 – традиційне лікування, Г-4 – ТЛ + дЕЖК; [§] 200 мкг/мл; * $P < 0,05$ і ** $P < 0,01$ – порівняно з першим варіантом; [#] $P < 0,05$ і ^{##} $P < 0,01$ – порівняно з другим варіантом.

Завдяки аналізу стану окиснення ЖК у гепатоцитах і рівня активності ключових ензимів у мітохондріях можна наголосити, що матрикс цього компартменту є у вигляді гелеподібної фази тонкої структури із вмістом близько 50% білків. На неї суттєво впливають зміни конформації внутрішньої мембрани, що відбуваються під час дихання. Матрикс містить рибосоми, ензими циклу трикарбонових кислот (ЦТК), а також ензими, які каталізують окиснення ЖК у β -положенні, синтез порфобіліногену та беруть участь у біосинтезі білків, РНК, ДНК. Серед них є CS, що належить до регуляторних ензимів. Цитрат-синтазу інгібують АТФ (кінцевий продукт, у вигляді якого запасється енергія, вивільнена в процесі дихання) та НАДФ (кінцевий продукт реакцій циклу, що пов'язаний із дегідруванням).

Маркером для виявлення внутрішньої мембрани мітохондрій слугує ензим цитохром-С-оксидаза (СОХ), що має 162 кДа і >10 субодиниць. Його простетичними групами є гем α , гем α_3 , Cu_A , Cu_B . У міжмембранному просторі на внутрішній мембрані мітохондрії розташований сайт зв'язування ензиму (сутС). Відомо також, що O_2 і цитохром-С-оксидаза є кінцевим пунктом постачання електронів, які надходять від окиснення "поживних" матеріалів. Узгоджено з цим процесом цитохром-С-оксидаза також спрямовує транспортування протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану. Ці важливі функції виконує транс-мембранний протеїновий комплекс, який складається із понад десяти субодиниць. Отже, цей ензимний комплекс забезпечує кінцеву стадію біологічного окиснення – відновлення електронами молекулярного кисню. Одержані результати щодо визначення активності ензимів наведені у табл. 3.

Дані табл. 3 свідчать, що в разі захворювання телят на діарею у гепатоцитах вірогідно знижується активність обох ключових ензимів ($P < 0,01 - 0,001$) і, передусім, їхнє співвідношення ($P < 0,001$). Це означає, що відбувається суттєве гальмування реакцій ЦТК вже на початкових етапах його функціонування, точніше під час конденсації ацетил-КоА із оксалоацетатом, що веде до зниження продукування лимонної кислоти. Саме на цьому етапі сповільнюється приєднання метильної групи оксалоацетату із наступним зниженням гідролізу тіоестерного зв'язку і утворення вільного КоА-SH. А оскільки за умов норми гідроліз високоенергетичного тіоестерного зв'язку завжди пов'язаний зі значним зменшенням стандартної вільної енергії ($\Delta G = -7,7$ ккал), то за умов діареї цей процес, очевидно, спрямований у протилежну сторону (див рисунок).

Зазначимо, що цитрат-синтаза здатна каталізувати утворення монофторцитрату із монофторацетил-КоА. Фторцитрат є потенційним інгібітором аконітази, тобто ензиму, який каталізує наступну реакцію ЦТК. Звідси можна вважати, що порушення, які сталися з першою реакцією ЦТК через зниження надходження необхідних субстратів (в тому числі й у результаті значної блокади β -окиснення та інших перетворень жирних кислот,

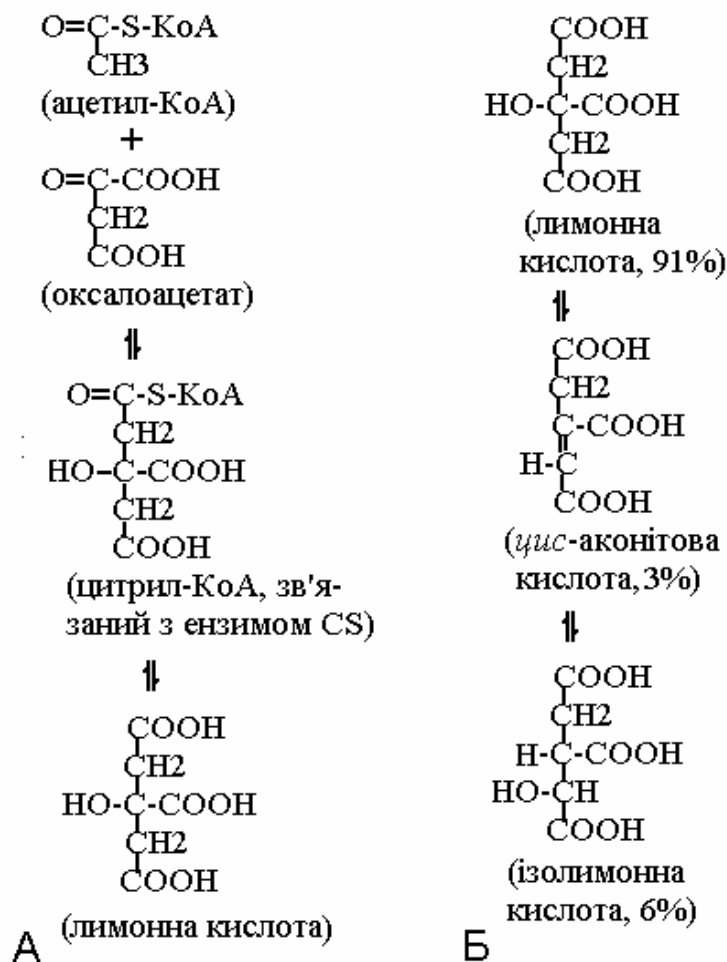
Таблиця 3

Активність цитрат-синтази і цитохром-С-оксидази та співвідношень COX:CS у гепатоцитах телят за умов діареї, $M \pm m$; $n=5$

| Ензими, У/г сирової тканини | Стан здоров'я телят | | Міжгрупові різниці | |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------|---------------|
| | норма (K ; $n=7$) | діарея (D ; $n=4$) | фактичні | % до контролю |
| CS | 3,89±0,26 | 2,91±0,18** | -0,98±0,21 | -25,2 |
| COX | 78,44±4,61 | 38,22±2,84*** | -40,22±3,67 | -51,2 |
| COX : CS | 20,16±2,64 | 13,13±1,93*** | -7,03±2,25 | -34,8 |

що наведено вище у табл. 1 і 2 та публікаціях [4, 7]) за умов діареї суттєво гальмують і всі наступні реакції ЦТК, зокрема транспортування протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану. Це підтверджено й тими змінами метаболічних процесів у гепатоцитах, які були описані у працях [1–9], та даними про вірогідне зниження активності цитохром-С-оксидази (див. табл. 3), яка за умов діареї, очевидно, функціонує внаслідок використання переважно резервів, що ще є у клітині та її органелах без належного поповнення зі шлунково-кишкового тракту та крові. Виразним відображенням такого стану треба вважати співвідношення COX:CS.

Отже, наведені вище результати однозначно засвідчують глибокі порушення метаболічних процесів у гепатоцитах телят за умов діареї на рівні функціонування мітохонд-



А – Цитрат-синтезна реакція; Б – аконітазна рівновага.

рій. Доказом цього треба вважати, передусім, вірогідне інгібування ключових ензимів, які суттєво впливають на потік перетворень, що йде через ЦТК (активність цитрат-синтази) та через дихальний ланцюг (активність цитохром-С-оксидази). Їхні активності, як відомо, прямо залежать від обсягів окиснення ЖК та цілісності внутрішніх і зовнішніх мембран цих важливих компартментів клітини.

1. *Калачнюк Л.* Вивчення особливостей впливу екзо- і ендогенних факторів на внутрішньоклітинний метаболізм у гепатоцитах жуйних тварин з допомогою моношарової біомоделі // Тези доп. Установчого з'їзду Укр. т-ва клітинної біології. Львів, 2004. С. 257.
2. *Калачнюк Л.* Молекулярні механізми трансляційних переключень на рибосомах клітини // Біологія тварин. Львів, 2004. Т. 6.
3. *Калачнюк Л.Г., Козак Л.А., Тукало М.А., Мацука Г.Х.* Выделение и характеристика препарата индивидуальной изоакцепторной тРНК^{Ser} из печени быка // Биополимеры и клетка. 1987. Т. 3. № 5. С. 274-276.
4. *Калачнюк Л., Мельничук Д., Калачнюк Г.* Молекулярно-структурні зміни у фосфоліпідах гепатоцитів новонароджених телят у разі діареї // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 35. С. 71-76.
5. *Калачнюк Л., Мельничук Д., Калачнюк Г.* Молекулярні механізми регуляції синтезу, метаболізму й секреції ліпопротеїнів у клітинах печінки // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 38. С. 3-20.
6. *Калачнюк Л., Мельничук Д., Калачнюк Г.* Одержання клітинних культур із печінки жуйних тварин і вивчення дії екзогенних факторів на інтрацелюлярний метаболізм у гепатоцитах // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 37. С. 45-59.
7. *Калачнюк Л., Савка О., Мельничук Д., Калачнюк Г.* Аполіпопротеїн В: особливості метаболізму в клітинах печінки телят у разі діареї // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 38. С. 57-66.
8. *Мельничук Д., Калачнюк Л., Калачнюк Г.* та ін. Метаболізм ліпідів в організмі жуйних тварин // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2003. Вип. 34. С. 41-51.
9. *Kalachnyuk L., Mel'nychuk D., Kalachnyuk G.* Peculiarities of molecular-structural changes in lipid components of hepatocytes in neonatal calves with enteropathologies // Abstract book, First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology. Lviv, 2004. P. 271.
10. *Lowry O.H., Rosenbroudh N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P. 265-275.
11. *Shepherd D., Garland P.B.* Citrate synthase from rat liver // Meth. Enzymol. 1969. Vol. 13. P. 11-13.
12. *Smith L., Conrade H.* A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome-c by cytochrome-c oxidase // Arch. Biochem. Biophys. 1956. Vol. 63. P. 403-413.

ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL ENZYMES UNDER CONDITION OF LIPID METABOLISM BREACH IN HEPATOCYTES**L. Kalachnyuk, D. Mel'nychuk*, G. Kalachnyuk***Biotechnology Research Institute of Animal Productivity
S.Z. Gzhytskyi L'viv National Academy of Veterinary Medicine**Pekarska st. 50, L'viv 79010, Ukraine**e-mail: lilimarg@polynet.lviv.ua***National Agrarian University**Heroyiv Oborony st. 15, Kyiv 03041, Ukraine*

It has been shown in monolayer cultures of hepatocytes from healthy calves and from ones with diarrhea that the rise of [$1-^{14}\text{C}$]oleate incorporation rate into acid soluble products, intracellular triacylglycerols and total pool of intracellular lipids depends directly on the [$1-^{14}\text{C}$]oleate enlargement in cultures. The substantial decrease of utilization of [$1-^{14}\text{C}$]oleate by all pointed out molecular forms of lipid metabolism is registered under its supplement with the adding other non-radioactive sources of essential fatty acids and demonstrates the competitive use of lipid components by liver cells. In liver homogenates, it has been found that, under condition of diarrhea, in calf hepatocyte mitochondria, the activity of citrate synthase (which catalyzes initial reaction of the tricarboxylic acid cycle or the TCA cycle) and of cytochrome-c oxidase (that helps to be realized last step of biological oxidation-reduction of molecular oxygen by electrons) is significantly diminished. The found changes are connected with structural and functional breaches, especially with the disturbances of β -oxidation of fatty acids, of the TCA cycle intermediates transformations, of proton transport through inner mitochondrial membrane and of other biochemical processes in hepatocytes.

Key-words: citrate synthase, cytochrome C oxidase, fatty acids, hepatocytes, calves, diarrhea.

Стаття надійшла до редколегії 25.09.2004

Прийнята до друку 19.01.2005