

Співвідношення редокс-форм убіхінону в мітохондріях печінки щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

О. М. Волошук, Г.П. Копильчук, М. С. Урсатий

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича; e-mail: o.voloschuk@chnu.edu.ua

Досліджували взаємозв'язок кількісного співвідношення редокс-форм убіхінону та ступеня вільнорадикального ушкодження мітохондріальних протеїнів у печінці щурів на тлі нутрієнтного дисбалансу. Тварин було поділено на три групи: I – тварини, які отримували повноцінний напівсинтетичний раціон (контрольна група); II – високосахарозний раціон; III – високосахарозний раціон на тлі дефіциту харчового протеїну. Вміст загального та окисненого убіхінону визначали спектрофотометрично при 275 нм, вміст відновленого убіхінону – за різницею між їхнім вмістом. Інтенсивність окиснювальної модифікації протеїнів оцінювали за накопиченням карбоніл-дериватів у реакції з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ), вміст вільних протеїнових SH-груп – з використанням реактиву Елмана. Встановлено, що максимально виражене зниження вмісту загального убіхінону (практично вдвічі) та перерозподіл його редокс-форм (зниження вмісту відновленого убіхінону в 7,2 раза на тлі зростання окисненого убіхінону вдвічі) в мітохондріях печінки щурів спостерігається у тварин, які отримували раціон з високим вмістом сахарози на тлі аліментарної депривації протеїну. Окрім того, у них зафіксовано максимально виражене вільнорадикальне окиснення мітохондріальних протеїнів, про що свідчить підвищення вмісту карбонільних похідних у 3,5 раза та зниження вмісту вільних протеїнових SH-груп у 2,6 раза. Показано, що аліментарна нестача протеїну в харчовому раціоні є критичним фактором впливу на інтенсивність вільнорадикальних процесів у мітохондріях. Встановлені зміни співвідношення редокс-форм убіхінону та ступеня окиснювальної модифікації мітохондріальних протеїнів у печінці щурів можуть розглядатися як передумови для поглиблення енергетичного дисбалансу та порушення функціональної активності мітохондрій за умов нутрієнтного дисбалансу.

Ключові слова: мітохондрії; убіхінон; окиснювальна модифікація протеїнів; нутрієнти.

ВСТУП

Відомо, що коензим Q (убіхінон) не тільки важливий компонент дихального ланцюга, який забезпечує транспорт електронів від I та II комплексів до мітохондріальних цитохромів, але й єдиний ендогенно синтезований ліпофільний антиоксидант [1]. Антиоксидантна активність властива відновленій формі убіхінону. Коензим Q захищає від вільнорадикального ушкодження мітохондріальні мембрани, інгібує перекисне окиснення ліпідів, опосередковано стабілізує кальцієві канали, запобігаючи перевантаженню кальцієм. Механізм антиоксидантної

© О. М. Волошук, Г.П. Копильчук, М. С. Урсатий

активності убіхінону пов'язують з його здатністю секвеструвати вільні радикали або відновлювати α -токоферильний радикал [2]. Зниження вмісту коензиму Q спостерігається під час старіння, вживання певних ліків та низки патологічних станів, зокрема ожирінні, гепатостеатозу, метаболічному синдромі, і залежить від рівня оксидативного стресу [3]. Зменшення пулу коензиму Q розглядають як одну із причин підвищеної чутливості до кальційіндукованого відкриття мітохондріальної пори у серці старих щурів [4].

Результати наших попередніх досліджень [5] засвідчують значну інтенсифікацію

процесів вільнорадикального окиснення в організмі щурів за умов надмірного вживання сахарози на тлі аліментарної депривації протеїну.

Нині проблема метаболічних порушень за умов аліментарного дефіциту протеїну та надмірного споживання легкодоступних вуглеводів набуває особливої актуальності. Відомо, що аліментарна депривація протеїну призводить до інтенсифікації катаболічних процесів, індукції оксидативного стресу, водно-електролітного дисбалансу [6–8]. Водночас надлишкове вживання сахарози лежить в основі розвитку гіперінсулінемії, вираженої гіперглікемії, яка призводить до активації неферментативного глікозилювання протеїнів, що супроводжується порушенням їх функціональної активності [9, 10].

Мета нашої роботи – дослідження взаємозв'язку кількісного співвідношення редокс-форм убіхінону та ступеня вільнорадикального ушкодження мітохондріальних протеїнів у печінці щурів на тлі нутрієнтного дисбалансу.

МЕТОДИКА

Експерименти виконували на білих безпородних щурах масою 120–150 г, віком 2,5–3 міс. Умови утримання та маніпуляції, які проводили з тваринами під час експерименту, відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), а також рекомендаціям «Біоетичної експертизи доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах» (Київ, 2006). Щурів утримували в пластикових клітках з піщаною підстилкою, доступом до води *ad libitum*.

Тварин було поділено на три групи. До контрольної групи ввійшли інтактні щури, яких утримували на повноцінному напівсинтетичному раціоні, що містив 14% білка (казеїну), 10% жиру, 10% сахарози. Щурів II групи утримували на високосахарозному

напівсинтетичному раціоні, що містив 40% сахарози та був збалансований за всіма іншими нутрієнтами. До III групи ввійшли тварини, які перебували на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні [5]. Цервікальну дислокацію експериментальних тварин проводили під легким ефірним наркозом на 29-ту добу експерименту.

Виділення мітохондріальної фракції здійснювали методом диференційного центрифугування в середовищі гомогенізації (у ммоль/л): сахароза – 250; ЕДТА – 1; тріс-НСІ – 10; рН 7,4. Всі операції проводили при 0–4°C. Для виділення з суспензії мітохондрій убіхінону в його незмінному редокс-стані використовували метод швидкої екстракції з використанням суміші гептан:метанол (1:1) [11]. Вміст загального та окисненого убіхінону визначали спектрофотометрично при 275 нм (коефіцієнт молярної екстинкції убіхінону 12,25 моль⁻¹·см⁻¹). Вміст відновленого убіхінону визначали за різницею вмісту загального і окисненого убіхінону. Мітохондріальні протеїни виділяли методом, що базується на їх нерозчинності в 0,05 М Na-фосфатному буфері, рН 11,5 [12]. Визначення вмісту карбоніл-дериватів мітохондріальних протеїнів проводили з використанням 2,4-динітрофенілгідразину (2,4-ДНФГ) [13], вмісту вільних SH-груп – реактиву Елмана [14].

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програми «Microsoft Excel». Представляли їх як середнє значення 9 незалежних визначень ± похибка середнього. Статистичну значимість різниці середніх показників оцінювали, використовуючи стандартний критерій t Стьюдента. Різницю вважали вірогідною при P < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених досліджень продемонстрували перерозподіл редокс-форм убіхінону на тлі незмінності його загального вмісту в мітохондріях печінки тварин, яких утримували на високосахарозному раціоні

(рис. 1, а). У тварин спостерігалось трикратне підвищення вмісту окисненої форми убіхінону з одночасним зниженням рівня відновленого убіхінону в середньому в 2,6 раза порівняно з контролем (див. рис. 2, б, в).

Ймовірно, зниження вмісту відновленого убіхінону за умов надмірного споживання сахарози пов'язано з його участю у реакціях знешкодження вільних радикалів, посилена генерація яких спостерігається за досліджуваних умов [5]. Виняткова ефективність убіхінону як мітохондріального антиоксиданта визначається його внутрішньомембранною локалізацією, значним вмістом та здатністю до швидкого відновлення [2].

Разом з тим максимально виражені зміни вмісту загального убіхінону та співвідношення його редокс-форм зафіксовано у тварин, які отримували раціон з високим вмістом сахарози на тлі аліментарної депривації протеїну. Зокрема, за вказаних експериментальних умов спостерігалось зниження вмісту загального убіхінону у мітохондріях печінки практично вдвічі (див. 1, а). Враховуючи, що зниження вмісту убіхінону на 25% супроводжується порушенням енергетичного обміну, а на 75% призводить до загибелі клітин [15, 16], то наслідки встановлених нами змін можуть виявитися критичними не тільки для системи біотрансформації енергії, але й для функціонування клітин печінки в цілому. Оскільки основним джерелом поповнення пулу убіхінону є його внутрішньоклітинний синтез [17], а вихідною сполукою для цього процесу є амінокислота тирозин, то нестача харчового протеїну може розглядатися як одна з можливих причин встановленого нами зниження загального вмісту коензиму Q.

Водночас зниження вмісту загального убіхінону за досліджуваних умов у мітохондріях печінки супроводжується зниженням кількості відновленого убіхінону в 7,2 раза порівняно з контролем (див. рис. 1, б) на тлі двократного підвищення вмісту його окисненої форми (див. рис. 1, в). Очевидно, що встановлені нами зміни загального вмісту

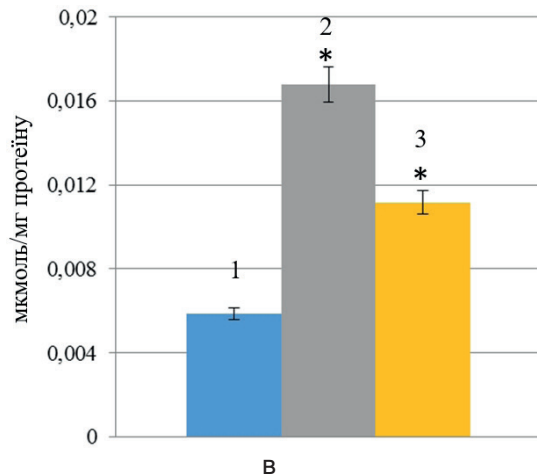
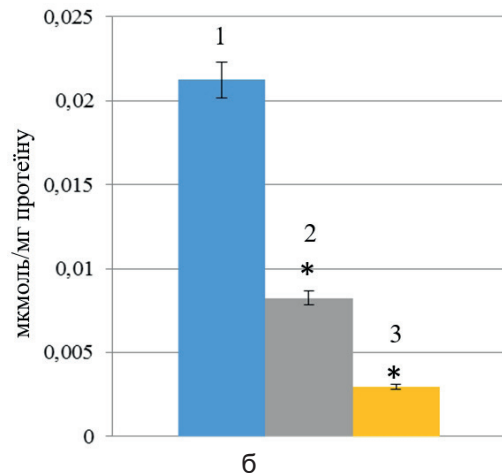
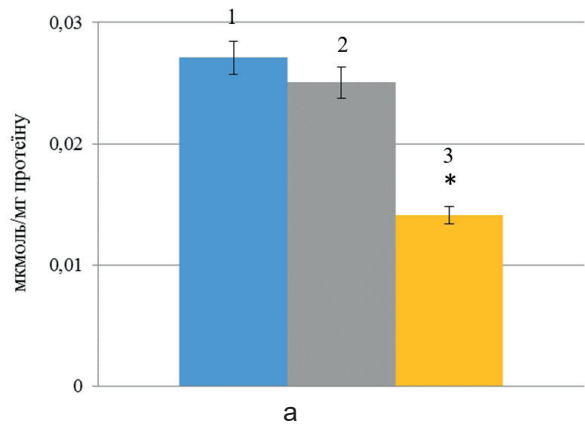


Рис. 1. Вміст загального (а), відновленого (б) та окисненого (в) убіхінону в мітохондріальній фракції печінки шурів за умов нутрієнтного дисбалансу: 1 – повноцінний раціон; 2 – високосахарозний раціон; 3 – низькопротеїновий/високосахарозний раціон. $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

коензиму Q будуть призводити до порушення транспорту електронів від убіхінону до цитохромної ділянки в дихальному ланцюгу, та можуть розглядатися як один з механізмів порушення у системі біотрансформації енергії за таких експериментальних умов.

З огляду на роль убіхінону як ключового антиоксиданта у мітохондріях, встановлений нами перерозподіл його редокс-форм на користь окисненого коензиму Q може призводити до активації вільнорадикального ушкодження протеїнів, зокрема, продуктів мітохондріальної трансляції, серед яких субодиниці (ND1-ND6) НАДН-дегідрогенази (комплекс I); COX 1, 2, 3 цитохром с оксидази (комплекс IV); апоцитохром b III комплексу дихального ланцюга та субодиниці (АТФ 6, 8) H⁺-АТФази [18]. Для встановлення взаємозв'язку співвідношення редокс-форм убіхінону та рівня окиснювальної деструкції мітохондріальних протеїнів нами досліджувався вміст протеїнових карбонільних дериватів та вільних SH-груп.

Отримані результати засвідчили високий ступінь вільнорадикального ушкодження мітохондріальних протеїнів за умов споживання високосахарозного раціону, що виражалося у підвищенні вмісту карбонільних похідних у середньому в 2,7 раза на тлі зниження вмісту вільних SH-груп вдвічі порівняно з контролем (див. рис. 2, а, б).

Проте максимально виражена інтенсифікація вільнорадикального ушкодження мітохондріальних протеїнів спостерігається у тварин, які споживали високосахарозний раціон на тлі нестачі харчового протеїну. Результати досліджень показали, що у мітохондріях печінки за таких експериментальних умов спостерігається підвищення вмісту карбонільних похідних протеїнів у 3,5 раза (див. рис. 2, б) та зниження вмісту вільних SH-груп у 2,6 раза (див. рис. 2, а) порівняно з контролем. За даними літератури [19] такий високий ступінь вільнорадикального ушкодження мітохондріальних протеїнів може бути зумовлений як надмірною генерацією АФК,

так активацією процесів глікозилювання антиоксидантних ензимів з їх наступною інактивацією та зменшенням доступності глутатіону, що спостерігається за умов гіперглікемії. Окрім того, посилене вільнорадикальне ушкодження мітохондріальних протеїнів може бути пов'язане зі встановленим нами зниженням вмісту відновленого убіхінону, який у нормі забезпечує нейтралізацію АФК у мітохондріях та попереджує окисну модифікацію мітохондріальних протеїнів.

Таким чином, аліментарна нестача протеїну в харчовому раціоні виступає критичним фактором впливу на інтенсивність вільнорадикальних процесів у мітохондріях.

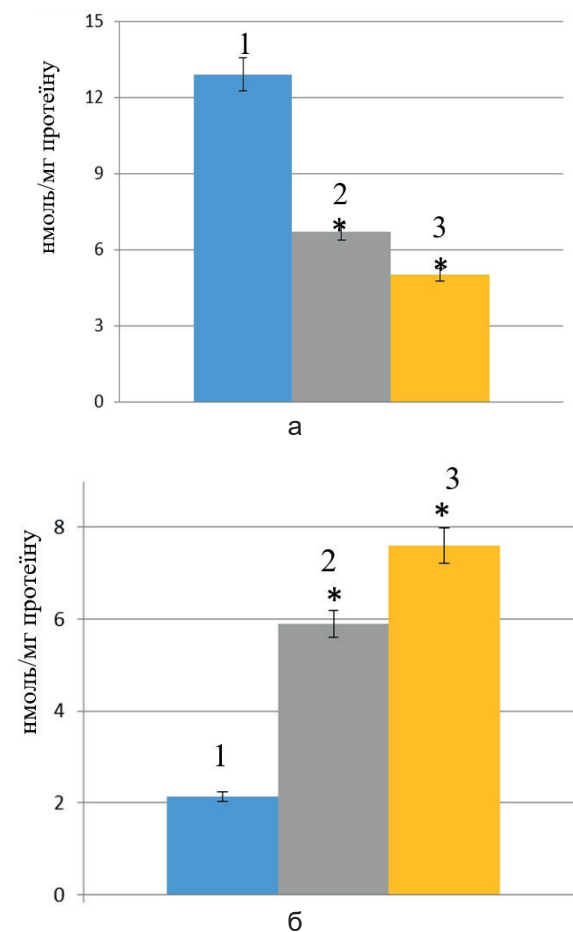


Рис. 2. Вміст вільних SH-груп (а) та карбонільних похідних (б) у мітохондріальних протеїнах за умов нутрієнтного дисбалансу: 1 – повноцінний раціон; 2 – високосахарозний раціон; 3 – низькопротеїновий/високосахарозний раціон.* P ≤ 0,05 порівняно з контролем

Встановлені зміни співвідношення редокс-форм убихінону та ступеня окиснювальної модифікації мітохондріальних протеїнів у печінці шурів можуть розглядатися як передумови для поглиблення енергетичного дисбалансу та порушення функціональної активності мітохондрій за умов нутрієнтного дисбалансу.

Робота виконана у рамках держбюджетної теми “Біохімічні та лазерно-поляриметричні параметри комплексного прогнозування метаболічних порушень”, № держреєстрації 0119U100717.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

О.Н. Волощук, М.С. Урсатый, Г.П. Копильчук

СООТНОШЕНИЕ РЕДОКС-ФОРМ УБИХИНОНА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРИС В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ РАЦИОНА НИТРИЕНТАМИ

Исследовали взаимосвязь количественного соотношения редокс-форм убихинона и интенсивности свободнорадикального повреждения митохондриальных белков в печени крыс в условиях нутриентного дисбаланса. Животные поделены на экспериментальные группы: I – животные, содержащиеся на полноценном полусинтетическом рационе (контроль); II – на высокосахарозном рационе; III – с на высокосахарозном/низкобелковом рационе. Содержание общего и окисленного убихинона определяли спектрофотометрически при 275 нм, содержание восстановленного убихинона – по разнице между содержанием общего и окисленного убихинона. Интенсивность окислительной модификации протеинов оценивали по накоплению карбонил-derivатов в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), содержание свободных протеиновых SH-групп – с использованием реактива Элмана. Установлено, что максимально выраженное снижение содержания общего убихинона (практически вдвое) и перераспределение его редокс-форм (снижение содержания восстановленного убихинона в 7,2 раза на фоне увеличения содержания окисленного убихинона в 2 раза) в митохондриях печени крыс наблюдается у животных, которых удерживали

на рационе с высоким содержанием сахарозы на фоне алиментарного дефицита белка. Кроме того, у животных указанной группы зафиксировано максимально выраженное свободнорадикальное окисление митохондриальных протеинов, о чем свидетельствует повышение содержания карбонильных производных в 3,5 раза и снижение содержания свободных белковых SH-групп в 2,6 раза. Показано, что алиментарный дефицит белка является критическим фактором влияния на интенсивность свободнорадикальных процессов в митохондриях. Выявленные изменения соотношения редокс-форм убихинона и интенсивности окислительной модификация митохондриальных протеинов в печени крыс могут рассматриваться как предпосылки для усугубления энергетического дисбаланса и нарушения функциональной активности митохондрій в условиях нутриентного дисбаланса.

Ключевые слова: нутриенты; митохондрии; убихинон; окислительная модификация белков.

О.М. Voloshchuk, G. P. Kopylchuk, M.S. Ursaty

THE RATIO OF UBIQUINON REDOX FORMS IN THE RAT LIVER MITOCHONDRIA UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT NUTRIENT SUPPLY

*Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University;
e-mail: o.voloshchuk@chnu.edu.ua*

The relationship between the quantitative ratio of redox forms of ubiquinone and the degree of free radical damage to mitochondrial proteins in rat liver against the background of nutritional imbalance was investigated. The animals were divided into the following experimental groups: I – animals receiving full-value semi-synthetic ration (control group); II – animals receiving high-sucrose diet; III – animals receiving low-protein high-sucrose diet. The content of total and oxidized ubiquinone was determined spectrophotometrically at 275 nm, the content of reduced ubiquinone was determined by the difference between the content of total and oxidized ubiquinone. The intensity of the oxidative modification of proteins was assessed by the accumulation of carbonyl derivatives in the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH), the content of free SH-groups was assessed by using the Elman reagent. It was found that the most pronounced decrease in the content of total ubiquinone (almost twice) and the redistribution of its redox forms (reduction of the content of reduced ubiquinone by 7.2 times against the background of an increase in the level of oxidized ubiquinone by 2 times) in rat liver mitochondria is observed in animals that received a diet high in sucrose against the background of alimentary protein deprivation. In addition, the animals of this group showed the most pronounced free radical oxidation of mitochondrial proteins, as evidenced by a 3.5-fold increase in the content of carbonyl derivatives and a 2.6-fold decrease in the content of free protein SH- groups. It was shown that nutritional protein deficiency is a critical factor affecting the intensity of free radical processes in mi-

tochondria. The established changes in the ratio of the redox forms of ubiquinone and the degree of oxidative modification of mitochondrial proteins in rat liver could be considered as prerequisites for deepening the energy imbalance and violation of the functional activity of mitochondria under conditions of nutritional imbalance.

Key words: mitochondria; ubiquinone; oxidative modification of proteins; nutrients.

REFERENCES

- Mantle D, Hargreaves I. Coenzyme Q10 and degenerative disorders affecting longevity: an overview. *Antioxidants*. 2019 Feb;8(44):1-10.
- Varela-López A, Giampieri F, Battino M, Quiles JL. Coenzyme Q and its role in the dietary therapy against aging. *Molecules*. 2016 Mar;21(373):1-26.
- Casagrande D, Waib PH, Jordão Júnior AA. Mechanisms of action and effects of the administration of Coenzyme Q10 on metabolic syndrome. *J Nutr Intermed Metab*. 2018 Aug;13:26-32.
- Strutynska NA, Timoshchuk SV, Vavilova GL, Kotsuruba AV, Sagach VF. Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening to Ca^{2+} in old rat heart under activation of biosynthesis of coenzyme Q. *Fiziol Zh*. 2009;55(3):44-54. [Ukrainian].
- Voloshchuk ON, Kopylchuk GP, Holinei TYu. Biochemical markers of the functional state of liver in rats fed diets with different protein and sucrose content. *Vopr Pitan*. 2019 Nov;88(6):61-7. [Russian].
- Sinha S, Patro N, Patro IK. Maternal protein malnutrition: current and future perspectives of spirulina supplementation in neuroprotection. *Front Neurosci*. 2018 Dec;12(988):1-18.
- Litvitsky PF, Mal'tseva LD. Protein, amino acids and nucleic acids metabolism disorders. *Vopr Sovremen Pediatr*. 2015 Feb;14(1):95-107. [Russian].
- Voloshchuk ON, Kopylchuk GP. Characteristics of water-salt balance in protein-deficiency rats with acetaminophen-induced toxic injury. *Fiziol Zh*. 2019 Feb;65(3):28-33. [Ukrainian].
- Falfushynska HI, Horyn OI, Gnatyshyna LL, Buyak BB, Rusnak NI, Fedoruk OO, et al. *Carassius auratus* as a novel model for the hyperglycemia study. *Ukr Biochem J*. 2019 Dec;91(4):58-69.
- Kursov SV, Nikonov VV. Stress hyperglycemia: discussion of ways to eliminate it with the help of sugar alcohols. *Emergency medicine (Medicina neotložnyh sostoânij)*. 2019 Mar;4(99):30-7. [Russian].
- Prokhorova MI. *Biochemical research methods (lipid and energy metabolism)*. Prokhorova MI, editor. Leningrad: Publisher LGU; 1982. [Russian].
- Kitagawa Y, Sugimoto E. Estimation of the in vivo translational activity of rat liver mitochondria without use of an antibiotic. *J Biochem*. 1980 Mar;88(3):689-93.
- Dubinina EE, Morozova MG, Leonova NV, Gamper NL, Soliternova IB, Nuller JUL, Butoma GB, Kovrugina SV. Oxidative modification blood plasma proteins in patients with mental disorders (depression and depersonalization). *Vopr Med Chemistry*. 2000;46(4):398-409. [Russian].
- Murphy ME, Kehrer JP. Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochem J*. 1989 Jan;260:359-64.
- Timoshchuk SV, Vavilova GL, Strutynska NA, Talanov SA, Petukhov DM, Kuchmenko OB, et al. Cardioprotective action of the coenzyme Q under activation of its endogenous synthesis during ischemia-reperfusion in old rat heart. *Fiziol Zh*. 2009;55(4):58-63. [Ukrainian].
- Voloshchuk ON, Kopylchuk GP. The ratio of ubiquinone redox forms in the liver mitochondria under toxic hepatitis induced on the background of alimentary protein deficiency. *Vopr Pitan*. 2015 Oct;84(5):82-7. [Russian].
- Wangand Y, Hekimi S. Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013 Jan-Feb;48(1):69-88.
- Rötig A. Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun; 1807 (9):1198-205.
- Ametov AS, Solovieva OL. Oxidative stress in type 2 diabetes mellitus and methods for its correction. *Probl Endocrinol*. 2011 Dec;6:52-6. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 15.09.2020