

## ВМІСТ АДЕНІЛОВИХ НУКЛЕОТИДІВ У МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ АЦЕТАМІНОФЕН-ІНДУКОВАНОГО ГЕПАТИТУ ТА АЛІМЕНТАРНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ ПРОТЕЇНУ

О. М. ВОЛОЩУК\*, Г. П. КОПИЛЬЧУК, Т. О. ПУСТОВІТ

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,  
Інститут біології, хімії та біоресурсів, кафедра біохімії та біотехнології  
\*e-mail: e-mail: oxbm@mail.ru*

*Робота присвячена визначенню вмісту АТР, АDP і АМР у мітохондріях печінки за умов ацетамінофен-індукованого ураження на фоні аліментарного дефіциту білка. Дослідження проведені на білих безпородних щурах масою 90 – 100 г, віком 2 – 2,5 місяці, поділених на 3 групи: I група – щурі, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні; II група – щурі з ацетамінофен-індукованим ураженням печінки, які перебували на повноцінному раціоні; III – щурі з ацетамінофен-індукованим ураженням печінки, які попередньо перебували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні. Мітохондріальну фракцію з гомогенату печінки отримували методом диференційного центрифугування. Кількісне визначення вмісту АТР, АDP, АМР здійснювали методом тонкошарової хроматографії з використанням пластинок «Silufol». Встановлено, що у тварин з ацетамінофен-індукованим гепатитом у мітохондріях печінки спостерігається зниження вмісту АТР на 45% на фоні одночасного зниження вмісту АDP та збереженні на рівні контролю значень вмісту АМР. Встановлений факт пояснюється посиленою утилізацією аденілових нуклеотидів при недостатній швидкості їх ресинтезу, що може бути наслідком зниження ензиматичної активності ключових компонентів дихального ланцюга. Показано, що у мітохондріях печінки білок-дефіцитних тварин з ацетамінофен-індукованим гепатитом спостерігається зменшення сумарного вмісту аденілових нуклеотидів на фоні подальшого виснаження пулу АТР і АМР. Зроблено висновок, що аліментарна депривація протеїну за умов токсичного ураження печінки є критичним фактором для розвитку дисбалансу системи біотрансформації енергії. Результати досліджень можуть стати базовими для біохімічного обґрунтування підходів до корекції та усунення наслідків порушення енергетичного обміну за умов токсичного гепатиту, індукованого на фоні дефіциту харчового протеїну.*

*Ключові слова: печінка, ацетамінофен-індукований гепатит, аліментарна депривація протеїну, АТР, АDP, АМР*

**Вступ.** На сьогодні активно формуються уявлення про біохімічні механізми і роль порушення роботи системи біотрансформації енергії в перебігу різноманітних патологічних процесів (Chowdhury et al., 2010, Teramoto et al., 2014). Особливо актуальним залишається питання послідовності біохімічних реакцій, що визначають розвиток і реалізацію енергетичного дисбалансу за умов гепатотоксичності, враховуючи залежність здатності печінки до відновлення своєї функціональної активності від ефективності роботи системи енергозабезпечення гепатоцитів (Borlak et al., 2013, Somanawat et al., 2013). Ключовими компонентами клітинної системи біотрансформації енергії є аденілові нуклеотиди (АТР, АDP, АМР), що забезпечують спряження між процесами вивільнення та використання енергії, відіграючи важливу роль у регуляції

обміну речовин та інтегруючи різноманітні шляхи обміну (Давыдов и др., 2005). Вміст АТР, а також співвідношення компонентів фракції аденілових нуклеотидів визначають характер, інтенсивність та шляхи ресинтезу АТР і метаболізму загалом (Berglund et al., 2009, Marmol et al., 2010), тому метою нашої роботи стало визначення вмісту АТР, АDP і АМР у мітохондріях печінки за умов ацетамінофен-індукованого ураження на фоні аліментарного дефіциту білка.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводились на білих безпородних щурах масою 90 – 100 г, віком 2 – 2,5 місяці. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до вимог міжнародної конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей.

Щурів утримували в пластмасових клітках з піщаною підстилкою, доступ до води *ad libitum*. Нормування добового раціону здійснювали з урахуванням принципу парного харчування.

Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи: I група – щурі, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні (К); II група – щурі з ацетоамінофен-індукованим ураженням печінки, які перебували на повноцінному раціоні (Г); III – щурі з ацетоамінофен-індукованим ураженням печінки, які попередньо перебували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні (НПР+Г).

Тварини I та II групи отримували раціон, що містив 14 % протеїну (у вигляді казеїну), 10% жирів, 76 % вуглеводів, збалансований за всіма нутрієнтами (Reeves et al., 1993). Тварини III групи отримували ізоенергетичний раціон, що містив 4,7 % протеїну, 10% жирів та 85,3 % вуглеводів.

Після чотиритижневого утримання тварин на експериментальній дієті моделювання ацетоамінофен-індукованого ураження печінки здійснювали шляхом введення *per os* ацетоамінофену в дозі 1 г/кг маси тварин у 2% крохмальній суспензії протягом 2 діб через 24 год за допомогою спеціального зонда (Kuvandik et al., 2008).

Цервікальну дислокацію тварин проводили під легким ефірним наркозом на 31 добу експерименту.

Мітохондріальну фракцію з гомогенату печінки отримували методом диференційного центрифугування (Максимчук та ін., 2010). Кількісне визначення вмісту АТР, АДФ, АМР здійснювали методом тонкошарової хроматографії з використанням пластинок «Silufol». Вміст білка визначали за методом Лоурі (Lowri, 1951).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності між групами при  $p \leq 0,05$ .

**Результати й обговорення.** Результати проведених досліджень показали, що за умов ацетоамінофен-індукованого гепатиту в мітохондріях печінки щурів спостерігається зниження вмісту АТР на 45% (рис. 1) на фоні одночасного зниження вмісту АДФ (рис. 2) та збереженні на рівні контролю значень вмісту АМР (рис. 3).

Встановлений факт, ймовірно, пов'язаний з посиленою утилізацією АТР при недостатній швидкості ресинтезу основної макроергічної сполуки. У наших попередніх дослідженнях показано, що за умов ацетоамінофен-індукованого гепатиту спостерігається порушення транспорту електронів у дихальний ланцюг як від NADH-залежних, так і FAD-залежних субстратів, про що свідчить зниження ензиматичної активності NADH-убіхінонредуктази та сукцинат дегідрогенази (Копильчук Г.П. та ін., 2015).

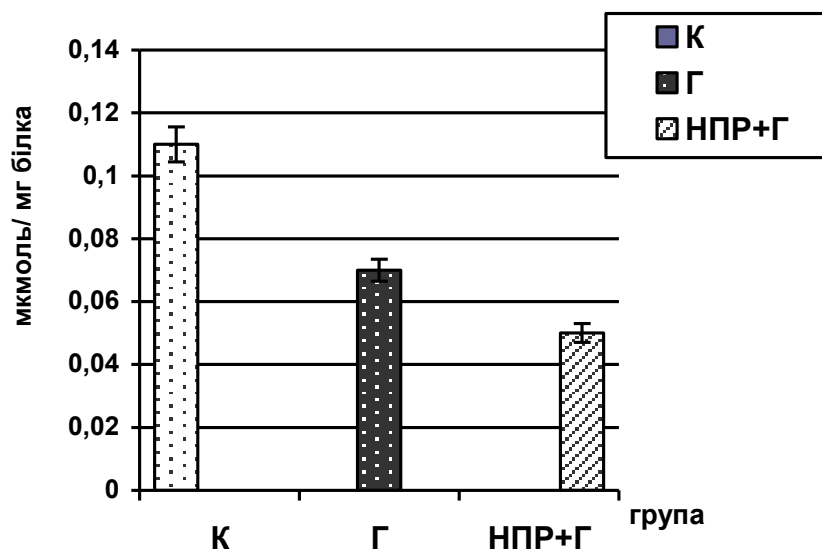
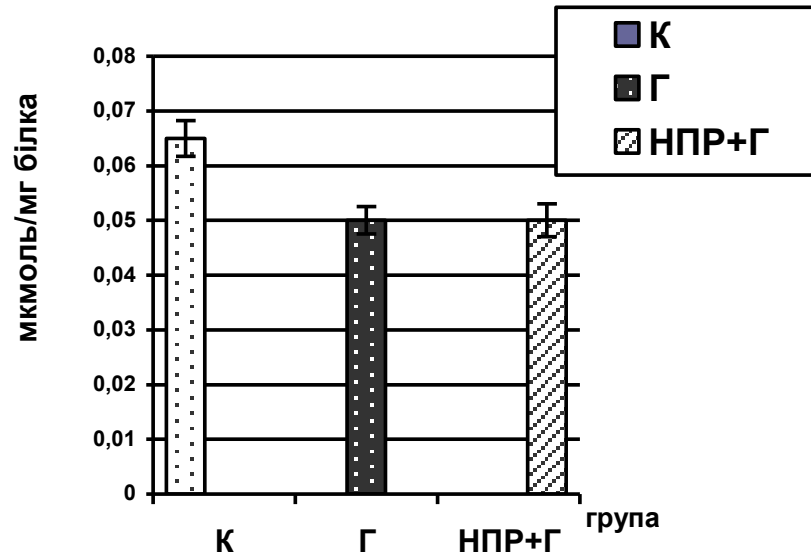


Рис. 1. Вміст АТР у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов ацетоамінофен-індукованого гепатиту на фоні аліментарної депривації протеїну

Fig. 1. ATP content in the mitochondrial fraction of rats' liver under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis against the background alimentary deprivation of protein



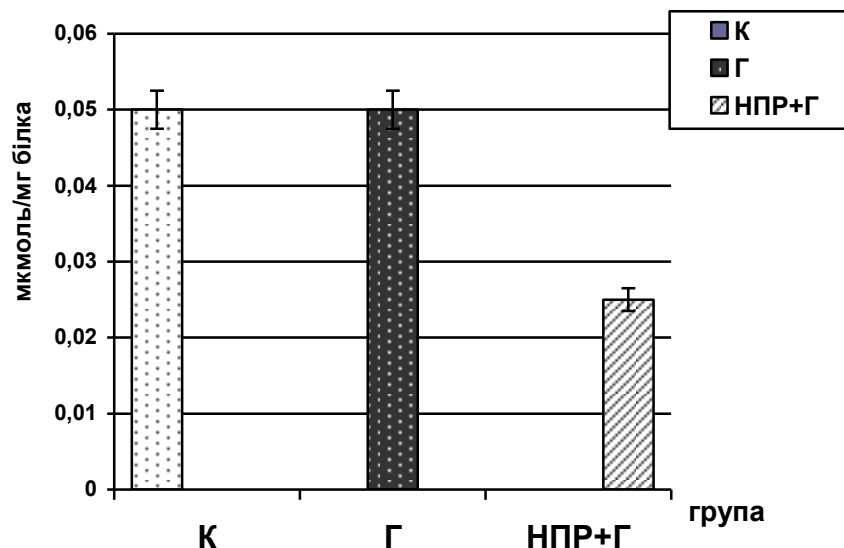
*Рис. 2. Вміст ADP у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов ацетамінофен-індукованого гепатиту на фоні аліментарної депривації протеїну*

*Fig. 2. ADP content in the mitochondrial fraction of rats' liver under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis against the background alimentary deprivation of protein*

Окрім того, за умов токсичного гепатиту нами встановлено зниження цитохромоксидазної активності на фоні зменшення кількісного вмісту мітохондріальних цитохромів у печінці (Voloshchuk O.N. et al., 2015). Показане нами зниження ензиматичної активності ключових компонентів дихального ланцюга, ймовірно, призводить до пригнічення процесу дихання і

ефективності окислювального фосфорилування, наслідком чого стає зниження вмісту ATP і ADP.

Водночас аналіз результатів досліджень показав, що у мітохондріях печінки білок-дефіцитних тварин з ацетамінофен-індукованим гепатитом спостерігається зменшення сумарного вмісту аденілових нуклеотидів на фоні подальшого виснаження пулу ATP (рис. 1) і AMP (рис. 3).



*Рис. 3. Вміст AMP у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов ацетамінофен-індукованого гепатиту на фоні аліментарної депривації протеїну*

*Fig. 3. AMP content in the mitochondrial fraction of rats' liver under the conditions of acetaminophen-induced hepatitis against the background alimentary deprivation of protein*

Встановлений факт вказує, що за умов токсичного пошкодження печінки, індукованого у тварин, що утримувалися за умов білкової недостатності, спостерігається виснаження енергетичних ресурсів клітин печінки і поглиблення дисбалансу системи енергозабезпечення. У літературі показано, що зменшення вмісту аденилових нуклеотидів всього на 15-20 % призводить до зниження всіх енергозалежних процесів в клітині на 75-80%, у першу чергу до порушення синтетичних процесів в печінці (Li et al., 2006, Cardoso et al., 2003). При цьому, якщо зниження вмісту АТР, ймовірно, пов'язано з сповільненням її ресинтезу внаслідок порушення структурно-функціональної організації компонентів дихального ланцюга, то виснаження пулу АМР може бути зумовлене зниженням інтенсивності її синтезу *de novo* за умов дефіциту білка.

Результати досліджень дозволяють зробити висновок, що аліментарна депривація протеїну за умов токсичного ураження печінки є критичним фактором для розвитку дисбалансу системи біотрансформації енергії.

#### **Висновки.**

Отже, зниження вмісту аденилових нуклеотидів в мітохондріях печінки білок-дефіцитних тварин за умов токсичного гепатиту можна розглядати як маркер порушення ефективності функціонування аеробного шляху біотрансформації енергії.

Результати досліджень можуть стати базовими для біохімічного обґрунтування підходів до корекції та усунення наслідків порушення енергетичного обміну за умов токсичного гепатиту, індукованого на фоні дефіциту харчового протеїну.

#### **Список літератури:**

1. Chowdhury S.K.R., Zhrebetskaya E., Smith D.R. et al. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats and its correction by insulin treatment // *Diabetes*. – 2010. – Vol. 59. – P. 1082-1091.
2. Teramoto A., Yamanaka-Okumura H., Eri U. et al. Comparison of measured and predicted energy expenditure in patients with liver cirrhosis // *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* – 2014. – Vol. 23 (2). – P. 197-204.
3. Borlak J., Chatterji B., Londhe K.B., Watkins P.B. Serum acute phase reactants hallmark healthy individuals at risk for acetaminophen-induced liver injury // *Genome Medicine*. – 2013. – Vol. 5 (86). – P. 2-14.
4. Somanawat K., Thong-Ngam D., Klaikeaw N. Curcumin attenuated paracetamol overdose induced hepatitis // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19 (12). – P. 1962-1967.
5. Давыдов В.В., Захарченко И.В., Овсянников В.Г. Состояние адениловой системы в печени взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе //

Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 5. – С. 522-526.

6. Berglund E.D., Lee-Young R.S., Lustig D.G. Hepatic energy state is regulated by glucagon receptor signaling in mice // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119 (8). – P. 2412-2422.
7. Marmol F., Sanchez J., Lopez D. Role of Oxidative Stress and Adenosine Nucleotides in the Liver of Aging Rats // *Physiol. Res.* – 2010. – Vol. 59. – P. 553-560.
8. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. 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.* – 1993. – № 5. – P. 1939 – 1951.
9. Kuvandik G., Duru M., Nacar A. et al. Effects of Erdosteine on Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Rats // *Toxicologic Pathology*. – 2008. – Vol. 36. – P. 714-719.
10. Максимчук Ю.З., Дремза И.К., Лапшина Е.А. Повреждение митохондрий печени крыс при интоксикации тетрахлоретаном. Эффекты мелатонина // *Биологические мембраны*. – 2010. – Т. 27, № 3. – С. 262 – 271.
11. Lowri O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Protein measurement With Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 123, № 1. – P. 265 – 273.
12. Копильчук Г.П., Волощук О.М. Активність NADH-убіхінонредуктази та сукцинатдегідрогенази в клітинах печінки щурів за умов токсичного гепатиту, індукованого ацетамінофеном на фоні аліментарної нестачі протеїну // *Укр. біохім. журн.* – 2015. – Т. 87(1). – С. 123-126.
13. Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P. 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*. – 2015 – Vol. 60(3). – P. 420-424.
14. Li C.Y., Liu J.Z., Wu L.P. Effects of hypobaric hypoxia on adenine nucleotide pools, adenine nucleotide transporter activity and protein expression in rat liver // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 12(13). – P. 2120-2124.
15. Cardoso C.M.P., Moreno A.J.M., Almeida L.M., Custodio J.B.A. Comparison of the changes in adenine nucleotides of rat liver mitochondria induced by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen // *Toxicology in Vitro*. – 2003. – Vol. 17. – P. 663-670.

#### **References:**

1. Chowdhury S.K.R., Zhrebetskaya E., Smith D.R. et al. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats and its correction by insulin treatment // *Diabetes*. – 2010. – Vol. 59. – P. 1082-1091.
2. Teramoto A., Yamanaka-Okumura H., Eri U. et al. Comparison of measured and predicted energy expenditure in patients with liver cirrhosis // *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* – 2014. – Vol. 23 (2). – P. 197-204.
3. Borlak J., Chatterji B., Londhe K.B., Watkins P.B.

- Serum acute phase reactants hallmark healthy individuals at risk for acetaminophen-induced liver injury // *Genome Medicine*. – 2013. – Vol. 5 (86). – P. 2-14.
4. Somanawat K., Thong-Ngam D., Klaikeaw N. Curcumin attenuated paracetamol overdose induced hepatitis // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19 (12). – P. 1962-1967.
  5. Davydov V.V., Zakhartchenko I.V., Ovsjannikov V.G. Adenine nucleotide system in adult and old rat liver during immobilization stress // *Biomed. Chemistry*. – 2005. – Vol. 51 (5). – P. 522-526.
  6. Berglund E.D., Lee-Young R.S., Lustig D.G. Hepatic energy state is regulated by glucagon receptor signaling in mice // *J.Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119 (8). – P. 2412-2422.
  7. Marmol F., Sanchez J., Lopez D. Role of Oxidative Stress and Adenosine Nucleotides in the Liver of Aging Rats // *Physiol. Res.* – 2010. – Vol. 59. – P. 553-560.
  8. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. 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.* – 1993. – № 5. – P. 1939 – 1951.
  9. Kuvandik G., Duru M., Nacar A. et al. Effects of Erdosteine on Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Rats // *Toxicologic Pathology*. – 2008. – Vol. 36. – P. 714-719.
  10. Maksimchuk Y.Z., Dremza I.K., Lapshina E.A. Damage to the mitochondria in rat liver during intoxication tetrahydrocannabinol. Effects of melatonin // *Biol. membranes*. – 2010. – Vol. 27, № 3. – P. 262 – 271.
  11. Lowri O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Protein measurement With Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 123, № 1. – P. 265 – 273.
  12. Kopylchuk G.P., Voloshchuk O.N. NADH-dehydrogenase activity and succinate dehydrogenase in liver cells of rats in the toxic hepatitis induced on the background of protein deficiency // *Ukr. Biohim. J.* – 2015. – T. 87, № 1. – С. 20-25.
  13. Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P. 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*. – 2015 – Vol. 60(3). – P. 420-424.
  14. Li C.Y., Liu J.Z., Wu L.P. Effects of hypobaric hypoxia on adenine nucleotide pools, adenine nucleotide transporter activity and protein expression in rat liver // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 12(13). – P. 2120-2124.
  15. Cardoso C.M.P., Moreno A.J.M., Almeida L.M., Custodio J.B.A. Comparison of the changes in adenine nucleotides of rat liver mitochondria induced by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen // *Toxicology in Vitro*. – 2003. – Vol. 17. – P. 663-670.

## **ADENYLYL NUCLEOTIDES CONTENT IN LIVER MITOCHONDRIA UNDER CONDITIONS OF ACETAMINOPHEN-INDUCED HEPATITIS AND ALIMENTARY DEPRIVATION WITH PROTEIN**

**O. N. Voloshchuk, G. P. Kopylchuk, T. O. Pustovit**

*Research is dedicated to determination of the ATP, ADP and AMP content in liver mitochondria under the conditions of acetaminophen-induced injury against the background alimentary deprivation of protein. Research was conducted on white non-linear rats in weight 90-100 g, age 2-2.5 months, divided into 3 groups: I – rats maintained on full value semi-synthetic ration; II – rats with acetaminophen-induced liver injury, maintained on full-value ration; III – rats with acetaminophen-induced liver injury, maintained on semi-synthetic low-protein diet. Mitochondrial fraction of liver homogenate was received by differential centrifugation method. Qualitative determination of the ATP, ADP, AMP content was made by thin-layer chromatography using «Silufol» plates. It is estimated, that in rats with acetaminophen-induced hepatitis a reduction of the ATP content by 45% on the background simultaneous decrease of ADP content and maintenance of AMP content on the control level is observed. The established fact is explained by the intensified utilization of the adenylyl nucleotides and their insufficient resynthesis rate, which may be the result of the respiratory chain key components' enzymatic activity decrease. It is shown, that in liver mitochondria of the protein-deficiency rats with acetaminophen-induced hepatitis a decrease of the adenylyl nucleotides total content against the background further depletion of ATP and AMP pool is observed. Conclusion was made, that alimentary deprivation of protein under the conditions of toxic liver injury is the critical factor for the development of the energy biotransformation system disturbances. Research results may become basic in the biochemical rationale for the approaches to correction and elimination of the energy metabolism disturbances' consequences under the conditions of toxic hepatitis, induced against the background nutritional protein deficiency.*

*Key words: liver, acetaminophen-induced hepatitis, alimentary deprivation of protein, ATP, ADP, AMP*

*Одержано редколегією 22. 09. 2015р.*