

DOI: 10.26693/jmbs03.05.049

УДК 577.126+577.164.2+577.152.1:576.311.347:616.45:616.61-092.9

Ференчук Є. О., Бевзо В. В.

ДОСЛІДЖЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ПОЛ, ВМІСТУ ВІТАМІНУ С, СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У МІТОХОНДРІЯХ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОПАТІЇ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ

Вищий державний навчальний заклад України
"Буковинський державний медичний університет", Чернівці, Україна

yelena_f@ukr.net

Показано, що за умов експериментальної нефропатії зростає швидкість утворення ТБК-активних продуктів як спонтанним, так і аскорбат-індукованим шляхом і знижується вміст аскорбінової кислоти в гомогенаті наднирників щурів. Водночас в мітохондріях надниркових залоз дослідних тварин при патології збільшується рівень ТБК-активних продуктів та пригнічується сукцинатдегідрогеназна активність.

Семиденне введення відновленого глутатіону на фоні нефропатії нормалізувало вміст аскорбінової кислоти в гомогенаті надниркових залоз щурів. Тоді як показники швидкості ПОЛ в гомогенаті наднирників, вміст ТБК-активних продуктів та сукцинатдегідрогеназної активності в мітохондріях наднирників тварин лише наближалися до значень інтактної групи за умов нефропатії.

Ключові слова: нефропатія, відновлений глутатіон, ПОЛ, вітамін С, сукцинатдегідрогеназа, наднирники, мітохондрії, щури.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом НДР кафедри біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії «Стрес-індуковані морфофункціональні та біохімічні зміни хроноперіодичної та гепаторенальної систем у ссавців», № державної реєстрації 0114U002472.

Вступ. Актуальність вивчення змін у наднирниках за умов експериментальної нефропатії зумовлюється впливом глюкокортикоїдних гормонів на обмінні процеси організму та їх можливу роль в регуляції та ускладненні патологічного процесу. Захист від окислювальних стресів в організмі здійснюють різні антиоксиданти, одними з яких є глутатіон (GSH) та аскорбінова кислота. Відомо, що GSH присутній в клітинах в основному у відновленій формі і підтримка оптимального співвідношення GSH/GSSG в клітині є важливим редокс-буфером для нормального функціонування орга-

нізму. Окрім того, вітамін С бере участь у синтезі та обміні стероїдних гормонів наднирників, а нестача GSH сприяє ризику виникнення окислювального пошкодження клітин [1, 8].

Відомо, що мітохондрії кори наднирників містять три монооксигеназні системи, задіяні в кортикостероїдогенезі та мають дві незалежні електрон-транспортні системи, які можуть бути донорами електронів у реакціях утворення активних форм кисню (АФК) при переключенні використання кисню з оксидазного на оксигеназний шлях [5]. АФК окислюють біомолекули за вальнорадикальним механізмом і утворюють органічні гідропероксиди ліпідів, білків, нуклеїнових кислот. Зростання вмісту АФК в організмі призводить до активації процесів пер оксидзації (ПОЛ), насамперед ліпідів біологічних мембран, та є причиною виникнення цілого ряду вільно радикальних патологій, в тому числі й нефропатії. Наприклад, у мітохондріях цитохромоксидаза продукує супероксидний аніон-радикал, що призводить до індукції ПОЛ, активації кас паз та загибелі клітини [6, 7]. У той же час реакції ПОЛ є важливими в адаптаційному процесі та репарації функціональних структур, ліпопротеїдних мембран, у зростанні потужності й буферної ємності редокс-системи, а також у підвищенні ефективності ферментативного і неферментативного антиоксидантного захисту за рахунок функціонування механізмів контролю за вмістом активних кисневих радикалів, ліпідних пероксидів і каталізаторів пероксидазних реакцій [3, 6].

Тому важливим є дослідження інтенсивності ПОЛ й активності ферментів енергетичного обміну мітохондрій та можливих шляхів їх корекції шляхом застосування глутатіону – природнього антиоксиданта із потужним відновлювальним та дезінтоксикаційним потенціалом, який пояснюється здатністю трипептида зв'язувати вільні радикали та знешкоджувати продукти перекисного окиснення ліпідів, фосфоліпідів мембран, білків, нуклеїнових кислот.

Оскільки оксидативний стрес та енергетичний дисбаланс супроводжують чимало хвороб і спричинюють їх ускладнення, тому **метою роботи** було дослідити інтенсивність спонтанного та аскорбат-залежного ПОЛ, вміст вітаміну С в наднирниках та зміни сукцинатдегідрогеназної активності у мітохондріях надниркових залоз за умов експериментальної нефропатії та застосування відновленого глутатіону.

Матеріал та методи дослідження. Експеримент проводили на нелінійних білих щурах масою 160–180 г. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Нефропатію моделювали внутрішньочеревним введенням фолієвої кислоти в дозі 250 мг/кг. Відновлений глутатіон у дозі 100 мг/кг вводили впродовж трьох та семи днів після моделювання нефропатії. Виділення мітохондріальної фракції проводили методом диференційного центрифугування [10]. Інтенсивність спонтанного та аскорбатзалежного ПОЛ у мітохондріях надниркових залоз щурів оцінювали за утворенням малонового діальдегіду, що визначається за кольоровою реакцією з тіобарбітуровою кислотою [9]. Вміст вітаміну С визначали за здатністю відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол [13]. Сукцинатдегідрогеназну активність визначали за кількістю відновленого ферицианіду [12]. Вміст білка визначали за Лоурі [4].

Статистичну обробку отриманих даних проводили за критерієм Уїлкоксона. Результати вважалися достовірними при $p < 0,01$ [11].

Результати дослідження та їх обговорення. Відомо, що процеси пероксидного окиснення ліпідів – первинна реакція у ланцюзі фізико-хімічних перетворень, які призводять до руйнування ліпопротеїдного комплексу мембран і порушення їх

транспортних функцій, пригнічують процеси генерації енергії, знижуючи таким чином життєдіяльність клітин.

Зміна динамічної рівноваги у системі ПОЛ є одним із неспецифічних індикаторів інтоксикації організму. Тому одним із завдань було дослідити інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів у наднирниках щурів із нефропатією. Результати досліджень показали, що швидкість спонтанного та аскорбат-залежного ПОЛ в гомогенаті наднирників у тварин із нефропатією зростала протягом усього експерименту (**табл. 1**).

Рівень аскорбат-залежного ПОЛ перевищив контрольні значення на 50% на третю та на 60% на сьому добу експерименту. При застосуванні глутатіону показник знижувався на 10% (3 доба) та 34% (7 доба) відносно показників груп тварин із експериментальною нефропатією.

Результати досліджень показали, що за умов патології нирок відбувається зниження вмісту аскорбінової кислоти у гомогенаті наднирників на 13% та 20% на 3 та 7 експериментальну добу відповідно (**рис.**).

GSH необхідний для підтримки реакцій аскорбат-глутатіонового циклу, пов'язаного з нейтралізацією пероксиду водню [1]. Його основна роль як відновлюючого агента полягає в рециркуванні аскорбінової кислоти від окисленої до відновленої форми за допомогою дегідроаскорбатредуктази, тому трьохденне введення GSH підвищує вміст неферментативного антиоксиданту – вітаміну С на 10% порівняно з контролем, а семиденна корекція дозволяє збільшити вміст аскорбінової кислоти в наднирниках щурів на 16% вище показника контрольної групи тварин.

Встановлене вірогідне зниження вмісту аскорбінової кислоти в надниркових залозах тварин може призвести до зміни їх антиоксидантного статусу за умов експериментальної нефропатії.

Слід зазначити, що розвиток нефропатії супроводжувався зростанням вмісту ТБК-активних продуктів в мітохондріях наднирників на 68% та 55% на 3 та 7 експериментальний день (**табл. 2**), що

Таблиця 1 – Швидкість спонтанного та аскорбатзалежного ПОЛ у наднирниках за умов експериментальної нефропатії та застосування відновленого глутатіону

	Контроль, n = 10	Нефропатія, 3 день, n = 10	Нефропатія + глутатіон, 3 день, n = 10	Нефропатія, 7 день, n = 10	Нефропатія + глутатіон, 7 день, n = 10
ПОЛ спонтанне нмоль/хв/мг білка	0,77 ± 0,04	1,12 ± 0,06	1,02 ± 0,05 ^{a,b}	1,23 ± 0,07 ^a	0,92 ± 0,04 ^{a,b}
ПОЛ аскорбат-залежне нмоль/хв/мг білка	6,6 ± 0,34	8,68 ± 0,42 ^a	7,5 ± 0,36 ^{a,b}	11,8 ± 0,63 ^a	7,12 ± 0,28 ^{a,b}

Примітки: Результати представлені як $M \pm SEM$. a – достовірність різниці порівняно з контролем; b – достовірність різниці порівняно з групою тварин із нефропатією, n – кількість тварин у групі, $p < 0,01$.

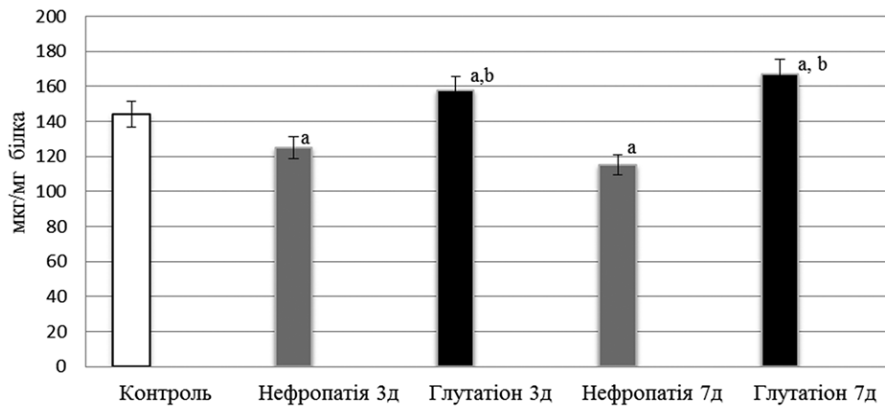


Рис. Вміст вітаміну С у наднирниках щурів за умов експериментальної нефропатії та застосування відновленого глутатіону

Примітки: а - достовірність різниці порівняно з контролем; b – достовірність різниці порівняно з групою тварин із нефропатією, $p < 0,01$.

свідчить про посилення вільнорадикальних процесів мембран мітохондрій. У групах тварин, яким вводили антиоксидант, рівень ТБК-активних продуктів в мітохондріях знижувався на 21% і 23% відповідно до тривалості застосування три пептиду та наближався до рівня контролю.

Зниження вмісту ТБК-активних продуктів за умов застосування глутатіону може відбуватися як за рахунок стимуляції системи антиоксидантного захисту, так і внаслідок зниження продукції активних форм кисню.

На фоні посилення вільнорадикальних реакцій окиснення ліпідів мембран мітохондрій за умов нефропатії виявлено зниження сукцинатдегідрогеназної активності на 55% та 46% на 3 та 7 експериментальну добу відповідно порівняно з контролем (табл. 2).

Пригнічення сукцинатзалежного шляху окислення може призводити до порушення транспорту електронів через цитохромну ділянку до цитохромоксидази та здатність до окисного фосфорилування, а також гальмування процесу енергозабезпечення клітин надниркових залоз і, таким чином, знижувати їх функціональну активність за умов

впливу пошкоджуючих факторів [2]. Уведення відновленого глутатіону, завдяки його антиоксидантній функції, призводило до підвищення ферментативної активності на 10% на третю, та на 15% на сьому добу порівняно з дослідним контролем, але до рівня контрольних значень сукцинатдегідрогеназна активність не поверталась.

Отже, під час розвитку нефропатії в наднирниках відбуваються мембранодеструктивні зміни, спричинені інтенсифікацією процесів перекисного окислення ліпідів, що підтверджується зростанням швидкості утворення ТБК-активних продуктів як спонтаним, так і аскорбатіндукованим шляхом та зниженням вмісту аскорбінової кислоти. Підвищення рівня ТБК-активних продуктів в мітохондріях при патології свідчить про посилення вільно-радикальних реакцій окиснення ліпідів мембран органел та призвело до зниження сукцинатдегідрогеназної активності в мітохондріях наднирників протягом розвитку експериментальної нефропатії. Введення відновленого глутатіону на фоні нефропатії призводило до підвищення вмісту аскорбінової кислоти в гомогенаті наднирників до рівня контрольних значень. Тоді як показники швидкості ПОЛ в гомогенаті наднирників, вмісту ТБК-активних продуктів та сукцинатдегідрогеназної активності в мітохондріях наднирників тварин лише наближалися до значень інтактної групи тварин за умов нефропатії.

Відновлений глутатіон володіє ефективним, але недостатнім впливом, за даної схеми введення, при захисті від окислювального пошкодження в умовах порушення біоенергетики в мітохондріях надниркових залоз у тварин із нефропатією.

Таблиця 2 – Вміст ТБК-реактивних продуктів та активність сукцинатдегідрогенази у мітохондріях надниркових залоз за умов експериментальної нефропатії та застосування відновленого глутатіону

	Контроль, n = 10	Нефропатія, 3 день, n = 10	Нефропатія + глутатіон, 3 день, n = 10	Нефропатія, 7 день, n = 10	Нефропатія + глутатіон, 7 день, n = 10
ТБК-активні продукти, нмоль/мг білка	5,21 ± 0,22	8,86 ± 0,2 ^a	7,02 ± 0,15 ^{a,b}	8,08 ± 0,13 ^a	6,22 ± 0,23 ^{a,b}
СДГ, нмоль сукцинату / хв./мг білка	25,22 ± 0,20	12,16 ± 0,22 ^a	13,36 ± 0,16 ^{a,b}	14,12 ± 0,15 ^a	16,23 ± 0,13 ^{a,b}

Примітки: Результати представлені як $M \pm SEM$. а – достовірність різниці порівняно з контролем; b – достовірність різниці порівняно з групою тварин із нефропатією, n – кількість тварин у групі, $p < 0,01$

Висновки. Встановлено зростання швидкості утворення ТБК-активних продуктів як спонтанним, так і аскорбат-індукованим шляхом, і зниження вмісту аскорбінової кислоти в гомогенаті наднирників за умов експериментальної нефропатії. У мітохондріях надниркових залоз тварин із нефропатією зростала кількість ТБК-активних продуктів та пригнічувалася сукцинатдегідрогеназна активність.

Семиденне введення відновленого глутатіону нормалізувало лише вміст аскорбінової кислоти у

мітохондріях наднирників, а решта досліджуваних показників наближалися до значень інтактної групи тварин.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується дослідити ферментативну активність компонентів електронтранспортного ланцюга мітохондрій наднирників щурів за умов експериментальної нефропатії та застосування відновленого глутатіону.

References

1. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30 (1–2): 1–12. PMID: 18796312. PMCID: PMC2696075. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
2. Hajjawi OS. Succinate Dehydrogenase: Assembly, Regulation and Role in Human Disease. *Eu J Sc Res.* 2011; 51: 133-42.
3. King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene.* 2006; 25 (34): 4675–82. PMID: 16892081. DOI: 10.1038/sj.onc.1209594.
4. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193 (1): 265-75. PMID: 14907713.
5. Popinigis J. Direct oxidation of glutamate by mitochondria from porcine adrenal cortex. *Biochem Int.* 1998; 21: 441–51.
6. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling.* 2012; 24: 981–90. PMID: 22286106. PMCID: PMC3454471. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
7. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell.* 2012; 48: 158–67. PMID: 23102266. PMCID: PMC3484374. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.09.025.
8. Shen D, Dalton TP, Nebert DW, Shertzer HG. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem.* 2005; 280: 25305–12. PMID: 15883162. DOI: 10.1074/jbc.M500095200.
9. Borodyn EA, Borodyna GP, Dorovskykh VA. y soavt. Perekysnoe okyslenye lpydov v membranakh erytrotsytoy y mykrosom pecheny y antyoksydantnaya systema tkaney krysa pry dlytelnom deystviy kholoda. *Byologicheskyye membrany.* 1992; 9 (6): 622–7. [Russian].
10. Egorova MV. Vydelenye mytokhondriy yz kletok y tkaney zhyvotnykh y cheloveka: sovremennyye metodycheskiye pryemy. *Syb med zhurn.* 2011; 26 (1): 22–8. [Russian].
11. Lapach SN. *Statysticheskiye metody v medyko-byologicheskyykh yssledovaniyakh s yspolzovaniyem Ekhel. MORYON,* 2000. 320 p. [Russian].
12. Eshchenko ND, Volskiy GG Prokhorova MY. *Metody byokhymicheskyykh yssledovaniy.* L: LGU. 1982: 210 – 2. [Russian].
13. Sokolovskyy VV. O metode razdelnogo opredeleniya askorbynovoy, degydroaskorbynovoy y dyketogulonovoy kyslot v byologicheskyykh tkanyakh. *Lab delo.* 1974; 3: 160–2. [Russian].

УДК 577.126+577.164.2+577.152.1:576.311.347:616.45:616.61-092.9

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПОЛ, СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНА С, СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В МИТОХОНДРИЯХ НАДПОЧЕЧНИКОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕФРОПАТИИ И ПРИМЕНЕНИЯ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА

Ференчук Е. А., Бевзо В. В.

Резюме. Показано, что в условиях экспериментальной нефропатии возрастает скорость образования ТБК-активных продуктов как спонтанным, так и аскорбат-индуцированным путем и снижается содержание аскорбиновой кислоты в гомогенате надпочечников крыс. В то же время в митохондриях надпочечников экспериментальных животных при патологии увеличивается уровень ТБК-активных продуктов и подавляется сукцинатдегидрогеназная активность.

Семидневное введение восстановленного глутатиона на фоне нефропатии нормализовало содержание аскорбиновой кислоты в гомогенате надпочечников крыс. Тогда как показатели скорости ПОЛ в гомогенате надпочечников, содержания ТБК-активных продуктов и сукцинатдегидрогеназной активности в митохондриях надпочечников животных только приближались к значениям интактной группы.

Ключевые слова: нефропатия, восстановленный глутатион, ПОЛ, витамин С, сукцинатдегидрогеназа, надпочечники, митохондрии, крысы.

UDC 577.126+577.164.2+577.152.1:576.311.347:616.45:616.61-092.9

Study of Intensity of Lipids Peroxidation, Content of Vitamin C, Activity of Succinate Dehydrogenase in Adrenal Cells of Rats in Conditions of Experimental Nephropathy and Introduction of Exogenous Glutathion

Ferenchuk Ye. A., Bevzo V. V.

Abstract. The topicality of the study of changes in the adrenal glands in conditions of experimental nephropathy is determined by the influence of glucocorticoid hormones on the metabolic processes of the organism and their possible role in the regulation and complication of the pathological process. Protection against oxidative stress in the body is carried out by various antioxidants, one of them is glutathione. Glutathione serves several vital functions including antioxidant defense, detoxification of xenobiotics and their metabolites, regulation of cell cycle progression, maintenance of redox potential, modulation of immune function.

As oxidative stress and energy imbalance accompany many illnesses, *the purpose of the work* was to investigate the intensity of spontaneous and ascorbate-dependent lipid peroxidation, the content of vitamin C in the adrenal glands, and changes in succinate dehydrogenase activity in adrenal mitochondria by experimental nephropathy and glutathione introduction.

Material and methods. The experiment was carried out on male albino rats with the body weight 0.16–0.18 kg. The animals were introduced a single intraperitoneal dose of folic acid (250 mg/kg) for modeling nephropathy. Exogenous glutathione was introduced intragastral (100 mg/kg) during 3 days after intoxication with folic acid. The isolation of the mitochondrial fraction was performed by differential centrifugation. The intensity of spontaneous and ascorbate-dependent lipid peroxidation in rat adrenal mitochondria was evaluated by the formation of malonic dialdehyde by the color reaction with thiobarbituric acid. The content of vitamin C was determined by the ability to eliminate 2,6-dichlorophenolindophenol. Succinate dehydrogenase activity was determined by the amount of reduced ferricyanide.

Results and discussion. Results were estimated using nonparametric T-Wilcoxon criterion. The level of significance was $P < 0.01$.

It was shown that under conditions of experimental nephropathy, the rate of formation of TBA-active products increased both spontaneously and ascorbate-induced. The content of ascorbic acid in the adrenal homogenate of rats experimental nephropathy decreased. At the same time, in the mitochondria of the adrenal glands of experimental animals with pathology, the level of TBA active products increased and succinate dehydrogenase activity was suppressed.

Conclusions. Our results demonstrate that introduction of glutathione during 7 days normalized the content of ascorbic acid in the adrenal homogenate of rats with experimental nephropathy. The rate of peroxidation of lipids in the adrenal homogenate, the content of TBA-active products, and the succinate dehydrogenase activity in the adrenal mitochondria of animals with experimental nephropathy under influence of glutathione approximated the values of the intact group. Perhaps the tripeptide may slow or stop the progression of kidney disease and its complications.

Keywords: nephropathy, reduced glutathione, peroxidation of lipids, vitamin C, succinate dehydrogenase, adrenal glands, mitochondria, rats.

Стаття надійшла 12.04.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування