



УДК 615.35: 616.61: 616.379 - 008.64 - 021.6

**EFFECT OF METHIONINE ON THE ENZYMES ACTIVITY OF THE RESPIRATORY
CHAIN OF MITOCHONDRIA OF KIDNEY
DIABETIC RATS**

**ВПЛИВ МЕТІОНІНУ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ СИСТЕМИ ЕНЕРГОЗАБЕЗ-
ПЕЧЕННЯ НИРОК ПРИ АЛОКСАНОВОМУ ДІАБЕТИ**

174

15 October, 2015

GENEVA, SWITZERLAND

M. Dikal

MD, PhD, Associate Professor
Higher State Educational Institution of
Ukraine
«Bucovinian State Medical University»
Department of Bioorganic and Biologic
Chemistry and Clinical Biochemistry

Ye. Ferenchuc

Assistant
Higher State Educational Institution of
Ukraine
«Bucovinian State Medical University»
Department of Bioorganic and Biologic
Chemistry and Clinical Biochemistry
Email: helenfer@mail.ru

М.В. Дікал

к.м.н., доцент кафедри біоорганічної і
біологічної хімії та клінічної біохімії
Вищого державного навчального за-
кладу України
«Буковинського державного медичного
університету»
м. Чернівці, Україна

Є.О. Ференчук

асистент кафедри біоорганічної і
біологічної хімії та клінічної біохімії
Вищого державного навчального за-
кладу України
«Буковинського державного медичного
університету»
м. Чернівці, Україна

Резюме: У досліджах на 50 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях вивчено стан системи енергозабезпечення у мітохондріях нирок при цукровому діабеті та за умов введення метіоніну. Для оцінки енергетичного стану клітини досліджували активність мітохондріальних ферментів: НАДН-дегідрогенази, сукцинатдегідрогенази та АТФ-ази. Встановлено позитивний вплив амінокислоти на роботу дихального ланцюга мітохондрій в умовах розвитку експериментального алоксанового діабету.

Ключові слова: метіонін, мітохондрії, діабет, НАДН-дегідрогеназа, сукцинат-дегідрогеназа, H^+ -АТФ-аза.

Abstract: We carried out a determination of NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase and H^+ -ATP-ase activity in the kidneys to investigate an influence of methionine on energy state of 50 albino non-linear male rats with diabetes. We detected a positive effect of amino acid on enzymes activity of mitochondrial respiratory chain in terms of development experimental diabetes.

Keywords: methionine, mitochondria, diabetes, NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase, H^+ -ATP-ase.

Вступ. Ушкодження нирок у хворих цукровим діабетом є одним із найважливіших питань сучасної діабетології та нефрології. Баланс між взаємозалежними метаболічними енергетичними процесами та змінами фізіологічних функцій при різних патологічних станах організму може бути досягнутим шляхом застосування антиоксидантів, зокрема важливими компонентами підтримки окислювального гомеостазу в клітинах та тканинах є сірковмісні сполуки. Неспецифічною реакцією організму при стресових ситуаціях є зворотна окислювальна модифікація сульфгідрильних груп, яка призводить до збільшення кількості дисульфідних зв'язків та посиленню жорсткості конфірмаційних структур білка. Така реакція змінює стан клітинних мембран, їх проникність і адгезивні властивості, впливає на активність ферментів, стан енергозабезпечення та проліферацію клітин [1, 2183].

Метіонін – незамінна амінокислота, необхідна для синтезу білків організму, бере участь у реакціях дезамінування, є компонентом аміноацил-тРНК-біосинтази, метаболізму гліцину, серину і треоніну, є важливою для гістидинового обміну, селеноамінокислотного та тирозинового метаболізму. Амінокислота є необхідною для синтезу холіну, адреналіну та глутатіону, виступає джерелом атома сірки для синтезу цистеїну та донором метильної групи, яка бере участь у процесах знешкодження токсичних речовин [2,5; 3, 1398].

Головним шляхом катаболізму метіоніну є втрата метильної групи і перетворення в гомоцистеїн, розпад якого іде по цистатіоніновому шляху з утворенням цистеїну і α -кетобутирату. Другий шлях перетворення полягає в переамінуванні амінокислоти до 4-метилтіо-2-кетобутирату та утворенні α -кетобутирату, який декарбоксилюється до пропіоніл-КоА з подальшим перетворенням у сукциніл-КоА і глюкозу. Таким чином незамінна амінокислота метіонін входить у цикл Кребса у вигляді проміжного продукту – сукциніл-СоА [4, 233].

Метою роботи було вивчення системи енергообміну нирок при цукровому діабеті та дослідження впливу метіоніну на активність ферментів дихального ланцюга мітохондрій нефроцитів за умов патології.

Матеріали і методи. Експеримент проводили на 50 білих статевозрілих щурах-самцях масою 0,16 – 0,18 кг. Цукровий діабет викликали шляхом внутрішньочеревним введенням 5% розчину моногідрату алоксану у дозі 150 мг/кг. Експерименти проводилися на 50 білих статевозрілих щурах-самцях з масою тіла – 0,16-0,18 кг. Тварини були розділені на підгрупи: контрольні тварини; тварини з явним цукровим діабетом (базальна глікемія 12,8-17,2 ммоль/л); 3) тварини з явним діабетом, яким упродовж семи днів інтрагастрально вводили метіонін у дозі 10 мг/кг.

Мітохондріальну фракцію отримували методом диференційного центрифугування [5]. Визначення НАДН-дегідрогеназної активності проводили спектрофотометричним методом [6]. Активність сукцинатдегідрогенази визначали за інтенсивністю відновлення калію фериціаніду [7], H^+ -АТФазну активність – за накопиченням неорганічного фосфату [8]. Вміст білка визначали за методом Лоурі [9]. Статистичну обробку отриманих даних проводили за критерієм Уїлкоксона. Результати вважалися достовірними при $p < 0,01$.

Результати та їх обговорення. Робота циклу Кребса спряжена з функціонуванням дихального ланцюга мітохондрій: вивільнення енергії, яка акумульована у відновних еквівалентах НАДН₂ та ФАДН₂, відбувається завдяки роботі дихального ланцюга. НАДН-дегідрогеназа – ключовий фермент I комплексу дихального ланцюга мітохондрій, по якому здійснюється перехід електронів від субстрату до кисню та який функціонально нерозривно пов'язаний із роботою циклу трикарбонових кислот [10, 555].

Визначення активності НАДН-дегідрогенази інформує про інтенсивність роботи першого етапу дихального ланцюга при патології та за умов корекції метіоніном. Спостерігається суттєве зниження ферментативної активності I комплексу мітохондрій нирок тварин з цукровим діабетом порівняно із показниками контрольної групи тварин та наближення рівня активності до показників контролю у групі тварин, яким вводили метіонін (рис. 1). Зниження активності першого ферменту системи енергозабезпечення мітохондрій у тварин з експериментальним діабетом можна розглядати як наслідок поступового порушення обміну речовин та дисбалансу між циклом трикарбонових кислот та дихальним ланцюгом мітохондрій.

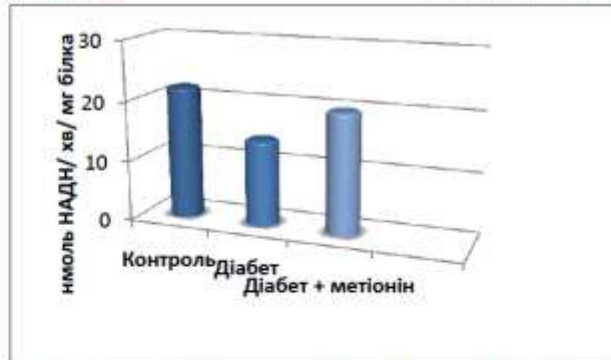


Рис. 1 Активність НАДН-дегідрогенази у мітохондріях нирок при алоксановому діабеті та корекції метіоніном, достовірність різниці порівняно з контролем $p < 0,01$.

Сукцинатдегідрогеназа, ключовий фермент II комплексу дихального ланцюга мітохондрій, володіє великим запасом каталітичної потужності, що дозволяє зберігати активність при різноманітних фізіологічних станах організму. Оскільки сукцинатдегідрогеназа не є лімітуючим ферментом циклу Кребса, фермент виконує важливі регуляторні функції у системі енергетичного метаболізму клітин. В циклі трикарбонових кислот СДГ каталізує окислення бурштинової кислоти до фумаролу, і дозволяє із високим ступенем достовірності оцінювати функціональну активність усього мітохондріального комплексу [11, 133; 12, 14].

Причиною зростання сукцинатдегідрогеназної активності при алоксановому діабеті (рис. 2) може бути інтенсифікація циклу Кребса та необхідність посилення енергозабезпечення клітинного дихання для адаптації клітинного метаболізму в умовах гальмування ферментативної активності I комплексу дихального ланцюга нефроцитів. При введенні метіоніну суттєвих відмінностей між дослідною та контрольною групою тварин не спостерігається.

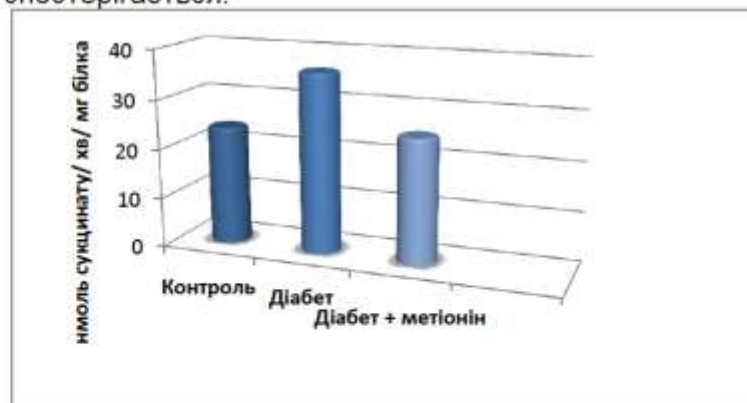


Рис. 2 Активність сукцинатдегідрогенази у мітохондріях нирок при алоксановому діабеті та корекції метіоніном, достовірність різниці порівняно з контролем $p < 0,01$.

Ферментною системою, що відповідає за синтез АТФ за рахунок енергії електрхімічного потенціалу та підтримку критичного рівня мембранного потенціалу під час процесу розпаду АТФ, є протонна АТФ-аза. Використовуючи іони H^+ і OH^- , які знаходяться по обидва боки мембрани, фермент може працювати і як АТФ-аза, і як АТФ-синтетаза [13, 1745; 14, 1965]. Встановлено, що АТФ-азна активність ензиму достовір-

но знижується в мітохондріях нирок діабетичних тварин та зростала після семиденного уведення метіоніну: активація НАД-залежного окислення супроводжується інтенсивнішим утворенням АТФ (рис. 1, рис.3).

Причиною зміни АТФ-азної активності може бути підвищена потреба у продукції АТФ у ранній діабетичний період, а зростаюча активність фермента забезпечує критичний рівень протонного потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани за рахунок гідролізу макроергічних сполук. Зафіксоване зростання активності протонної АТФ-ази, імовірно, є наслідком зниження активності дегідрування субстратів, гальмуванням швидкості транспорту електронів між окремими дихальними переносниками, що викликає порушення генерації трансмембранного потенціалу іонів водню.

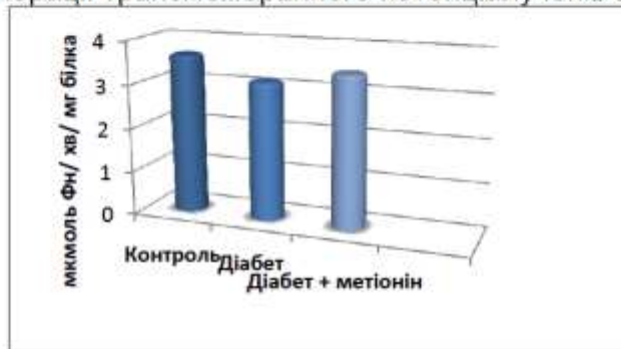


Рис. 3 Активність АТФ-ази у мітохондріях нирок при алоксановому діабеті та корекції метіоніном, достовірність різниці порівняно з контролем $p < 0,01$.

Виявлені особливості енергетичного обміну можуть бути пов'язані з активацією пероксидного окислення ліпідів, викликаного експериментальним цукровим діабетом, що призводить до дестабілізації мембран мітохондрій, і може бути причиною зниження активності досліджуваних ферментів. При застосуванні метіоніну усі досліджувані показники наближаються до значень, отриманих у групі контрольних тварин.

Висновок. У нирках тварин з експериментальним цукровим діабетом відбуваються суттєві порушення функціонування роботи дихального ланцюга мітохондрій, що супроводжується зміною енергетичного балансу в органах: спостерігається зниження НАДН-дегідрогеназної та АТФ-азної активностей та підвищення рівня активності сукцинатдегідрогенази. Ступінь порушення мітохондріального окислення і процесів синтезу АТФ корелює із інтенсивністю оксидативного стресу та ступенем вираженості патології. Вивчення активності мітохондріальних ферментів показало, що при семиденному введенні метіоніну ферментативна активність мітохондрій нефроцитів достовірно змінюється, наближаючись до показників контролю.

Список літератури:

1. The kidney and homocysteine metabolism / Allon N Friedman [et al.] // Journ. of the American Society of Nephrology. – 2001. – Vol.12. – P. 2181 – 2189.
2. Наумов А.В. Роль нарушенных процессов метилирования и обмена метионина в патогенезе заболеваний человека // Журнал ГрГМУ. – 2007. – № 1. С. 4–7.
3. Methionine metabolism in an animal model of sepsis / A. Semmler [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. – 2008. – Vol.46. – P. 1398 – 1402.
4. Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism / Stadtman E.R [et al.] // Mol Cell Biochem. – 2002. – Vol.3. – P. 233 – 235.
5. Егорова М.В. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические приемы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // Сиб. мед. журн. – 2011. – Т. 26, № 1, Вып. 1. – С.22 – 28.

6. Sharova I.V. Rotenone-insensitive NADH oxydation in mitochondrial suspension occurs by NADH dehydrogenase of respiratory chain fragments / I.V. Sharova, N.L. Vekshin // *Biophysic.* – 2004. – Vol. 49, № 5. – P. 814 – 821.

7. Методы биохимических исследований / Н.Д. Ещенко, Г.Г. Вольский, М.И. Прохорова – Л.: ЛГУ, 1982. – С. 210 – 212.

8. Габибов М.М. Влияние гипербарической оксигенации на активность протонной АТФ-азы митохондрий различных тканей крыс / М.М. Габибов // *Укр. биохим. журн.* – 1986. – Т. 58, №5. – С.81 – 83.

9. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N. I. Rosebrough, A. L. Farr, R. I. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193,–№ 1.– P. 2.

10. Grivennikova K.G. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I / K.G. Grivennikova, A.D. Vinogradov // *Bioch. Biophys.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 553 – 561.

11. Hajjawi O.S. Succinate Dehydrogenase: Assembly, Regulation and Role in Human Disease / O.S Hajjawi // *Eu. J. Sc. Res.* – 2011. – Vol.51, № 1. – P. 133 – 142.

12. Rich P. R. The mitochondrial respiratory chain / P.R. Rich // *Essays Biochem/* –2010. – Vol. 47. – P. 1–23.

13. Feldkamp Th. F1F0-ATPase Activity and ATP Dependence of Mitochondrial Energization in Proximal Tubules after Hypoxia Reoxygenation / Th. Feldkamp, A. Kribben, J. M. Weinberg // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 1742 – 1751.

14. Lenaz G. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject / G.Lenaz // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12. P. 961–1008.

