

УДК 616.33:577.121.7:577.125.33

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВИРАЗКОВИХ УРАЖЕНЬ ШЛУНКА

Дворщенко К.О.¹, Савко У.В.¹, Вакал С.Є.¹, Тодор І.М.², Остапченко Л.І.¹

¹ Київський національний дослідницький університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, відділ біохімії, вул. Володимирська 64, 01033 Київ;

² Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, відділ механізмів протипухлинної терапії, вул. Васильківська, 45, 03022, Київ.

Надійшла до редакції 15.11. 2008

Встановлено, що при експериментальній виразці шлунка зростає вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у мітохондріях печінки щурів. Показано, що за умов стресової та етанолової експериментальних моделях виразки шлунка в мітохондріях печінки відбувається роз'єднання процесів окиснення і фосфорилування та зниження їх енергопродуктивності.

Ключові слова: виразка шлунка, печінка, мітохондрії, перекисне окиснення ліпідів, окисне фосфорилування.

ВСТУП

Актуальною проблемою сучасної гастроентерології є підвищення захворюваності та розповсюдження патології органів травної системи, зокрема виразкової хвороби шлунка [11, 14]. Виразкова хвороба не обмежується місцевими дефектами слизової поверхні шлунка, а обумовлює комплексні зміни інших органів травної системи [8]. Однією з перших на патологічну зміну реагує печінка, центральний орган хімічного гомеостазу, де створюється єдиний обмінний та енергетичний пул для метаболізму білків, вуглеводів та жирів.

При впливі на організм ряду негативних факторів, таких як стрес, алкоголь, використання нестероїдних протизапальних препаратів, можуть утворюватись симптоматичні виразки шлунка [5, 10, 12, 16, 17].

Механізм адаптації організму на дію несприятливого чинника залежить від стану енергетичних процесів у клітині. Трансформована енергія з хімічних сполук використовується організмом для забезпечення всіх фізіологічних потреб, а також для можливої відповіді на негативні впливи. Енергетичний статус клітин на пряму пов'язаний з функціонуванням мітохондрій, оскільки в них відбуваються процеси, які трансформують енергію в клітині до молекул АТФ [15]. Клітини печінки характеризуються активним метаболізмом, тому при виникненні мітохондріальних порушень, гепатоцити гостро реагують на нестачу макроергічних сполук [20].

Таким чином, процеси перетворення енергії в мітохондріях визначають стійкість організму в екстремальних станах при дії пошкоджуючих агентів. На даний час малодослідженим залишається питання реакції-відповіді мітохондрій на негативні впливи різної інтенсивності та природи.

В зв'язку з цим важливим стає питання дослідження структурно-функціонального стану мітохондрій печінки щурів за умов впливу таких пошкоджуючих факторів, як етиловий спирт та стрес.

Тому метою роботи було дослідити структурно-функціональний стан мітохондрій печінки щурів за умов стресової та етанолової експериментальних моделях виразки шлунка.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідах використовували щурів лінії Вістар обох статей вагою 180 - 230 г., яких утримували на стандартному раціоні віварію. Етанолову модель виразки шлунка створювали за методом [22]. Для цього щурам перорально вводили етиловий спирт (1 мл 96% C₂H₅OH на 200 г ваги) та через 1 годину декапітували. Для створення стресової виразки шлунка у тварин використовували модель іммобілізаційного водоімерсіюного холодового стресу [24]. Після іммобілізації щурів у спеціальних патронах, тварин розміщували в резервуарах з водою, температура якої складала 23оС. Через 3 години щурів виймали з патронів та декапітували. Після декапітації тварин, з гомогенату печінки щурів

виділяли мітохондрії згідно методу [7] при температурі таючого льоду.

Вміст дієнових кон'югатів (поглинають ультрафіолетові промені довжиною 232 нм) та кетодієнів та супряжених трієнів (спектр поглинання 278 нм) визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом [1, 4], шифових основ – флюориметричним методом [3]. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [9].

Визначення функціонального стану мітохондрій печінки в різних метаболічних станах вивчали полярографічним методом [13]. Дихання мітохондрій реєстрували за допомогою кисневого електроду типу Кларка. В якості субстрату окиснення використовували янтарну кислоту в концентрації 5 мМ. АДФ додавали в пробу в кількості 266 нМоль. Концентрація білка в комірці дорівнювала 2 мг/мл. Вміст білка в кожній пробі визначали за методом Лоурі [18]. Із хроноамперограм розраховували швидкості дихання до внесення АДФ (V2), в присутності АДФ (V3) та після вичерпання АДФ (V4) в нг-атом O₂ х хв⁻¹ х мг білка⁻¹, а також відношення V3/V4 – дихальний контроль за Чансом (ДКЧ) і АДФ/О – ступінь спряження дихання та окисного фосфорилування.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [6]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за

t-критерієм Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнювальними показниками при P<0,05. Розрахунки та побудову графіків виконували на комп'ютері з використанням прикладних програм: „Origin 7.0” та „Microsoft Excel 2003”.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одним з головних та універсальних механізмів пошкодження клітин під дією негативних впливів є порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, яке призводить до розвитку окисного стресу. В результаті відбувається інтенсифікація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у мембранних структурах, таких як мітохондрії, ядра, клітинні мембрани тощо. Це в свою чергу може призвести до загибелі клітини в цілому [19, 21, 23].

Тому нами були проведені дослідження вмісту продуктів пероксидації ліпідів у мітохондріях печінки щурів за умов стресової та етанолової моделей виразки шлунка.

Встановлено, що при дії комбінованого стресу в мітохондріях гепатоцитів зростає вміст первинних продуктів ПОЛ: дієнових кон'югатів – в 2,2 рази та кетодієнів і супряжених трієнів – в 2,5 рази порівняно з контролем (табл. 1).

При введенні етанолу щурам, у мітохондріальній фракції печінки збільшувався вміст дієнових кон'югатів - в 1,8 рази та кетодієнів і супряжених трієнів – в 2,6 рази відносно контролю.

Таблиця 1

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у мітохондріях печінки щурів за умов експериментальної виразки шлунка, (M ± m, n=10)

Група тварин Досліджуваний параметр	контроль	стрес	етанол
Дієнові кон'югати, нМоль х мг білка ⁻¹	381,81 ± 37,22	839,67 ± 79,31*	678,75 ± 64,38*
Кетодієни і супряжені трієни, нМоль х мг білка ⁻¹	127,27 ± 10,64	313,64 ± 26,15*	327,27 ± 29,58*
ТБК-активні сполуки, нМоль х мг білка ⁻¹	598,29 ± 54,36	1678,32 ± 139,64*	1255,95 ± 108,18*
Шифові основи, ум. од. х мг білка ⁻¹	62,67 ± 5,87	133,82 ± 14,03*	143,24 ± 12,81*

Примітки: *- p< 0,05 щодо контролю

Показано, що у тварин, які піддавались стресовому впливу, вміст проміжних продуктів ПОЛ - ТБК-активних сполук у мітохондріях печінки зростає у 2,8 рази, а за умов дії етилового

спирту вміст цього продукту збільшувався в 2 рази (табл. 1).

При дослідженні кінцевих продуктів ПОЛ у мітохондріальній фракції печінки щурів при стресі

спостерігалось збільшення вмісту шифових основ у 2,1 рази, а при дії етилового спирту їх кількість зростала у 2,3 рази відносно контрольних мітохондрій.

Таким чином, при дії стресу та етанолу на організм у мітохондріях печінки щурів відбувається активація генерації активних кисневих метаболітів, що викликає радикальні порушення мембранних структур мітохондрій. Наслідком таких змін може бути порушення головної функції мітохондрій – трансформації хімічної енергії субстратів у електрохімічний потенціал градієнту концентрації протонів на мембрані, в результаті чого виділяється енергія, яка акумулюється в макроергічних зв'язках АТФ. В зв'язку з цим для оцінки функціонального стану мітохондрій печінки щурів, які піддавались впливу стресу та етанолу, необхідно було визначити параметри фосфорилуючого дихання.

Оскільки печінка є центральним органом хімічного гомеостазу, де створюється єдиний обмінний та енергетичний пул для метаболізму білків, вуглеводів та жирів, вона потребує великої кількості енергії для протікання всіх обмінних процесів. Основним джерелом енергії є процеси аеробного окиснення циклу Кребса та аденіннуклеотиди, утворення яких відбувається в мітохондріях гепатоцитів [2].

Одним з основних параметрів, що характеризують енергетичний обмін мітохондрій, є їх здатність поглинати кисень та залежність швидкості дихання від присутності акцепторної системи (АДФ + Фн).

При вивченні функціонального стану мітохондрій гепатоцитів встановлено, що за умов впливу стресового фактору зростала швидкість дихання (табл. 2).

Група тварин Досліджуваний параметр	контроль	стрес	етанол
Швидкість дихання V_2 , нг-атом O_2 x xv^{-1} x мг білка ⁻¹	20,68 ± 1,75	25,41 ± 2,12*	16,82 ± 1,28*
Швидкість дихання V_3 , нг-атом O_2 x xv^{-1} x мг білка ⁻¹	49,84 ± 3,28	44,13 ± 2,15*	28,96 ± 2,59*
Швидкість дихання V_4 , нг-атом O_2 x xv^{-1} x мг білка ⁻¹	15,52 ± 1,06	27,92 ± 2,26*	17,83 ± 1,21*
ДКЧ	3,32 ± 0,31	1,58 ± 0,13*	1,61 ± 0,06*
[АДФ]/[О]	1,76 ± 0,09	1,21 ± 0,06*	1,45 ± 0,07*

Примітки: *- $p < 0,05$ щодо контролю

Інтенсивність мітохондріального окиснення під час фосфорилування екзогенного АДФ достовірно знижувалась. Швидкість дихання у стані спокою (V_4) суттєво зростала відносно контролю.

При дії етилового спирту спостерігалось статистично значиме зниження швидкості дихання мітохондрій гепатоцитів. Також зменшувалась інтенсивність дихання мітохондрій у фосфорилуючому стані. При цьому при вичерпанні АДФ у стані V_4 швидкість дихання зростала.

Коефіцієнт дихального контролю Чанса в мітохондріях печінки щурів був знижений на 52% за умов дії обох досліджуваних чинників, енергопродуктивність мітохондрій гепатоцитів також зменшувалась відносно контролю. Так, коефіцієнт [АДФ]/[О] при дії стресу знижувався на 31%, а за умов дії етанолу – на 18% (табл. 2).

Отримані результати експериментальних досліджень свідчать, що за умов впливу як

стресового фактору, так і етанолу в мітохондріях гепатоцитів щурів відбувається роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування, яке призводить до виникнення енергетичного дефіциту в клітині та зростанню утворення активних кисневих метаболітів.

ВИСНОВКИ

Таким чином, згідно проведених експериментальних досліджень встановлено, що за умов стресової та етанолової експериментальних моделей виразки шлунка, у гепатоцитах спостерігається мітохондріальна дисфункція, яка проявляється інтенсифікацією процесів ПОЛ у мітохондріях, роз'єднанням процесів окиснення і фосфорилування та зменшенням енергопродуктивності цих органел. Виявлені структурно-функціональні зміни мітохондрій свідчать про

розвиток окисного стресу та порушення енергетичного балансу у клітинах печінки.

Література

1. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лабораторное дело. - 1988. - № 2. - С. 60-63.
2. Гепатоцит. Функционально-метаболические свойства / И.В. Гулак, А.М. Дудченко, В.В. Зайцев и др. - М.: Наука, 1985. - 270 с.
3. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах // Лабораторное дело. - 1984. - № 9. - С. 540-546.
4. Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы "перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита" в биологических жидкостях. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2003. – 80 с.
5. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. – Новосибирск, Наука, 1983. – 232 с.
6. Плохинский М.А. Математические модели в биологии. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. – 265 с.
7. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой. – 1989. – Изд-во Моск. Универ. – С. 406.
8. Свиницкий А.С., Соловьева Г.А. Патогенез язвенной болезни в свете современных представлений // Сучасна гастроентерол і гепатол. – 2000. – Вып. 1. – С. 26 – 28.
9. Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г. // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66 – 68.
10. Фурдуй Ф.И. Стресс и здоровье. – Кишенёв: Штица, 1990. – 239 с.
11. Харченко Н.В. Деякі проблеми сучасної гастроентерології // Укр. мед. часопис. – 2003. – №5(37). – С. 68 – 74.
12. Харченко Н.В., Родонезская Е.В. Современные взгляды на проблему алкогольной болезни печени // Сучас. гастроентерол. – 2004. - №4 (18). – С. 5-12.
13. Chance B., Williams G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. – Adv. Enzymol. – 1956. – Vol. 17. – P. 65-134.
14. Coursol C.J., Sanzari S.E. Impact of Stress Ulcer Prophylaxis Algorithm Study // Ann. Pharmacother. – 2005. – Vol. 39. - P. 810 - 816.
15. Devin A. and Rigoulet M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2007. - Vol. 292. – P. C52 - C58.
16. Kraut J.A. and Kurtz I. Toxic Alcohol Ingestions: Clinical Features, Diagnosis, and Management // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2008. - Vol. 3. - P. 208-225.
17. Lindros K.O. Alcoholic liver disease: pathobiological aspects // J. Hepatol. - 1995. - Vol. 23. - P. 7 – 15.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193, №1. – P.265-275.
19. Mantena S.K., King A.L., Andringa K.K., Eccleston H.B., Bailey S.M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases // Free Radic. Biol. Med. – 2008. - Vol. 44(7). – P. 1259-1272.
20. De Minicis S., Brenner D.A. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2008. – Vol. 23 Suppl 1. – P. S98-103.
21. Richter C., Kass G.E.N. Oxidative stress in mitochondria: Its relationship to cellular Ca homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation // Chem. Biol. Interact. - 1991. - Vol. 77. - P. 1 – 23.
22. Robert A. Cytoprotection by prostaglandins // Gastroenterol. – 1979. – Vol. 77, №4, part 1. – P. 761 – 767.
23. Sigolo C.A., Mascio P.D., Kowaltowski A.J. et al. Trans,trans-2,4-decadienal induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress // J. Bioenerg. Biomembr. – 2008. - Vol. 40(2). – P. 103-109.
24. Takagi K. and Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery process of the stress ulcer // J. Pharmacol. – 1968. – Vol. 18. – P. 9 – 18.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ЖЕЛУДКА

Дворщенко Е.А., Савко У.В., Вакал С.Е., Тодор И.Н., Остапченко Л.И.

Установлено, что при экспериментальной язве желудка увеличивается содержание продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях печени крыс. Показано, что при стрессовой и этаноловой экспериментальных моделях язвы желудка в митохондриях печени происходит разобщение процессов окисления и фосфорилирования и снижение их энергопродуктивности.

Ключевые слова: язва желудка, печень, митохондрии, перекисное окисление липидов, окислительное фосфорилирование.

STRUCTURALLY FUNCTIONAL STATE OF RAT LIVER MITOCHONDRIA AT STOMACH ULCER LESIONS

Dvorshchenko C.O., Savko U.V., Vakal S.E., Todor I.M., Ostapchenko L.I.

It is fixed, that at an experimental stomach ulcer the content of lipid peroxidation products in liver mitochondria of rats increases. It is shown, that at stress and ethanol experimental models of stomach ulcer in liver mitochondria there is disconnection of processes of oxidation and phosphorylation and their reduction of energy production.

Key words: stomach ulcer, liver, mitochondria, lipid peroxidation, oxidative phosphorylation.