

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**Активність I та II комплексів дихального ланцюга у
скелетних м'язах щурів за умов ураження ацетамінофеном
та різного забезпечення раціону протеїном**

Магістерська робота

Рівень вищої освіти – перший (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 600М група
Паращик Ангеліна Іванівна

Керівник:

кандидат біологічних наук
доцент **Волощук О.М.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2023 р.
Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П

Чернівці – 2023

ЗМІСТ

ВСТУП	
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Особливості метаболічних процесів за умов нестачі протеїну.....	
1.2. Механізми токсичного дії ацетамінофену.....	
1.3. Особливості структурно-функціональної організації ензиматичних комплексів дихального ланцюга.....	
1.4. Значення співвідношення лактату до пірувату для функціонування скелетних м'язів.....	
1.5. Особливості вмісту лактатдегідрогенази у скелетних м'язах.....	
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
ВИСНОВКИ	
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	
ДОДАТКИ	

Вступ

Ацетамінофен (парацетамол) – достатньо розповсюджений засіб, який використовується для зменшення болю, зокрема у скелетних м'язах, оскільки послаблює дію простагландинів (PG). Препарат вважається безпечним при дотриманні меж терапевтичного дозування. Дозволена разова доза для дорослих людей становить 500 мг, для дітей – 350 мг [10]. Метаболізм ацетамінофену пов'язаний із утворенням токсичних метаболітів із високою окислювальною здатністю, які перевантажують клітинні антиоксидантні системи, що призводить до значного окиснювального стресу [39]. Водночас передозування цим препаратом може викликати ураження різних органів. Найбільш розповсюджене ураження ацетамінофеном печінки та нирок [30]. Проте відомі випадки токсичного ураження скелетних м'язів [29]. Враховуючи те, що скелетні м'язи беруть участь у формуванні опорно-рухової системи, то наслідком їх токсичного ураження може бути порушення їхньої функціональної активності [29]. Значну роль у зниженні функції м'язів відіграють дисметаболичні порушення у мітохондріях. Мітохондрії відіграють важливу роль у процесах метаболізму, а також вони є основними продуцентами клітинної енергії та вільних радикалів [15]. Важливий показник енергетичного забезпечення – активність комплексів дихального ланцюга.

Токсичне ураження комплексів дихального ланцюга мітохондрій скелетних м'язів щурів за умов дефіциту білка в раціоні характеризується зниженням їхньої ферментативної активності. Це пов'язано з тим, що токсичне пошкодження комплексів дихального ланцюга призводить до зниження синтезу білків дихального ланцюга [16], що в свою чергу призводить до гальмування їх активності, зниження ефективності дихання мітохондрій і збільшення продукції активних форм кисню.

Основою для розвитку, підтримки та відновлення всіх клітин людського організму є білки [7]. Порушення їх надходження в організм

може призвести до негативних наслідків. Протеїни складають до 20 % від загальної маси і приблизно 50 % сухої маси тіла людини. Зменшення протеїнів свідчить про білково-енергетичну недостатність (БЕН), що в свою чергу супроводжується порушенням здоров'я, зокрема початком первинної білково-енергетичної недостатності – маразм та квашиоркор [3]. Також можливі порушення психічного здоров'я, набряки, відмова органів, виснаження та атрофія (зменшенням розмірів органів або тканин) [28]. У разі тривалої БЕН починається розпад білків печінки, шкіри та непосмугованих м'язів, викликане пригніченням біосинтезу білків в організмі. Також процес розпаду білків різних тканин та органів супроводжується збільшенням витрат енергії організмом [31].

Мета роботи – дослідження активності ензимів дихального ланцюга у скелетних м'язах щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити активність NADH-дегідрогенази та сукцинатдегідрогенази у мітохондріях скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.
2. Визначити вміст пірувату та лактату у мітохондріях скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.
3. Визначити активність лактатдегідрогенази у мітохондріях скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Особливості метаболічних процесів за умов нестачі протеїну

Білкова маса тіла відіграє важливу роль в процесах росту та функціональної активності організму. Білки забезпечують роботу різних органів людського організму [28]. Отримання необхідної кількості білка є важливішим, ніж досягнення цільової потреби в енергії для підтримки балансу азоту [3]. Правильне функціонування білкового катаболізму відіграє важливу роль у метаболізмі в людському організмі. Руйнування великих поліпептидних ланцюгів для вивільнення незамінних амінокислот забезпечує клітини необхідними субстратами для синтезу білка. Внутрішньоклітинний розпад білків забезпечує підтримку енергетичних потреб внутрішніх органів [7].

За будовою білок – це лінійний полімер, що складається з α -L-амінокислот. При перетравленні білок розпадається на амінокислоти, які впливають на правильне функціонування тканин організму та беруть участь у процесах їхнього росту. Порушення співвідношення амінокислот в організмі зменшує швидкість білкового синтезу. Для підтримки необхідної кількості амінокислот в організмі потрібно споживати білок у достатній кількості. Рекомендованими нормами споживання білка для осіб від 19 років становить 0,8 г білка на 1 кг маси тіла [32]. Для спортсменів цю кількість білка прийнято розглядати для одного прийому їжі. У літературних джерелах є дані, які вказують, що людям, які зазвичай виконують вправи на опір, де застосовуються скелетні м'язи, потреба у протеїні значно вища, ніж у тих, хто веде сидячий спосіб життя [4].

Зменшення вмісту протеїну в організмі свідчить про білково-енергетичну недостатність (БЕН) і спричиняє численні ускладнення для організму. БЕН розглядається як низка патологічних станів, викликаних різним співвідношенням білків і калорій. Недостатнє споживання

дієтичного білка супроводжується порушенням балансу м'язів, спостерігається зменшення білків у тканинах органів, компонентах крові, що викликає гіпопротеїнемію (вміст білків у крові знижується до 3-5%), також зменшується вміст калію та води в організмі [3]. За умов відсутності нормального споживання білка в м'язах активуються процеси для забезпечення організму амінокислотами, щоб відбувався постійний синтез ендогенних білків у основних гомеостатичних органах [8]. Найбільш очевидною ознакою початку білково-енергетичної недостатності є затримка росту. Найбільше уражаються тканини, що мають високу здатність до регенерації і є чутливими до дефіциту поживних речовин. До таких тканин належать кишечник, кістковий мозок. Інший тип тканин, ті що є більш сприйнятливими до недостатньої кількості поживних речовин, печінка та підшлункова залоза [35].

Білки організму поділяються на: соматичні та вісцеральні [33]. До соматичних належать білки скелетних м'язів, до вісцеральних – білки у вісцеральних органах, зокрема у печінці. Відповідно до цього БЕН є первинною та вторинною. Первинна характеризується ураженням соматичного відділу, при цьому енергетична недостача жирів та вуглеводів є обмежуючим фактором. Такий стан БЕН називається маразм і є характерним для дітей та літніх людей. Вторинна БЕН називається квашиоркор, під час неї уражаються вісцеральні білки. Квашиоркор характеризується більш серйозними наслідками, оскільки у цьому випадку виснажуються і соматичні, і вісцеральні запаси білка, що в свою чергу призводить до атрофії внутрішніх органів та виснаження м'язів. Також вторинна БЕН супроводжується зниженням концентрації білка в крові, що призводить до негативних наслідків, таких як анемія, гіпоплазія кісткового мозку, жирова дистрофія печінки, тощо [33]. При маразмі втрачається підшкірний жир та м'язи, це відбувається через значну втрату енергії та поживних речовин. Квашиоркор проявляється зміною кольору шкіри та

волосся, анемією, імунодефіцитом та ранньою смертю [34]. В обох формах БЕН погіршується клітинний імунітет, оскільки відомо, що функція багатьох клітин імунної системи залежить від метаболічного шляху, для функціонування якого використовуються різні поживні речовини. Найбільш помітні зміни клітинного імунітету за умов БЕН стосуються бактерицидної функції нейтрофілів, системи комплементу та продукування імуноглобуліну А (IgA) [35].

Окрім недостатньої кількості білка, вуглеводів та жирів наступною основною причиною білково-енергетичної недостатності є тяжкі та хронічні інфекції. Знижується ступінь засвоєння поживних речовин, збільшуються метаболічні потреби організму [34]. При інфікуванні бактеріями вивільнюються цитокіни, що може викликати анорексію, супроводжуватися зниженням рівня альбуміну в крові. Навіть за короткий час нестача протеїнів може призвести до летальних випадків [8].

Білкова нестача супроводжується порушенням засвоєння макро- та мікроелементів. При надмірній втраті енергії організм починає використовувати жирову тканину та м'язи, оскільки вони є основним органом інсуліностимульованого поглинання глюкози і беруть важливу роль у підтримці її рівноваги у організмі. Як наслідок, відбувається виснаження м'язів, порушення балансу азоту, зниження здатності організму регулювати температуру та накопичувати воду [9]. Важка БЕН пов'язана з атрофією слизової оболонки тонкої кишки, що впливає на здатність всмоктувати та перетравлювати речовини, що надходять в організм [34].

1.2 Механізми токсичної дії ацетамінофену

Ацетамінофен (N-ацетил-пара-амінофенол, АРАР) – лікарський препарат, також відомий як парацетамол, може входити до складу інших ліків. Має знеболюючі та жарознижуючі властивості. Парацетамол є активним метаболітом фінацетину, що зробило його безпечною заміною

раніше застосовуваного фенілацетилену. Максимальна разова доза для дорослих людей становить 500 мг, для дітей – 350 мг [10]. Хоч ацетамінофен вважається доволі безпечним безрецептурним лікарським засобом, однак передозування ним викликає серйозні наслідки.

Парацетамол метаболізується здебільшого в печінці (рис. 1), під час цього він проходить два шляхи: кон'югацію з глюкуроною та сірчаною кислотами. При кон'югації з сірчаною кислотою під час передозування відбувається швидке насичення препаратом. Мала частина, приблизно 5-9%, метаболізується цитохромом P450 (головним чином CYP 2E1) [36], що продукує проміжний метаболіт – N-ацетилбензохінонімін (NAPQI). За нормальних умов цей метаболіт швидко виводиться із сечею шляхом кон'югації з глутатіоном (GSH), проте при отруєнні кількість N-ацетилбензохіноніміну зростає. Надмірне утворення NAPQI починає виснажувати GSH, що викликає ковалентне зв'язування сульфгідрильних груп у клітинних білках. Основними мішенями зазвичай є мітохондріальні білки.

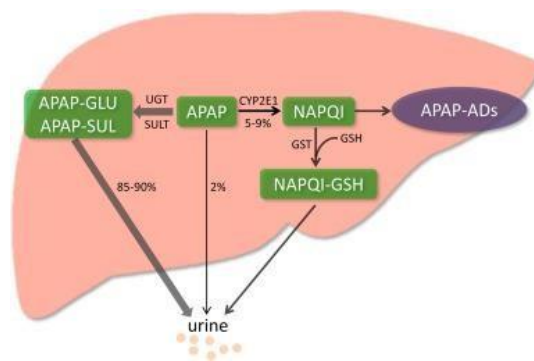


Рис 1. Метаболічна активація ацетамінофену [36].

Отруєння ацетамінофеном викликає токсичне ураження багатьох органів організму, в тому числі і скелетних м'язів. Внаслідок цього може відбутися порушення функціональної активності опорно-рухової системи [12]. Оскільки до кінця дія парацетамолу ще не вивчена, у літературі можна знайти декілька варіантів його механізму. Парацетамол діє як фактор, що впливає на ферилпротопорфірин IX, зменшуючи його катіон-радикал в

межах сайту пероксидази ферменту простагландин-Н-синтаза (PGHS). У свою чергу ферилпротопорфірин утворює радикали тирозону замість циклооксигенази, які необхідні для каталізу реакції окиснення АК. Оскільки гідропероксиди жирних кислот окислюють порфірин, інгібування циклооксигенази парацетамолом ускладнюється.

Інший варіант можливої дії парацетамолу полягає в його стимулюючій дії на низхідні серотонінергічні шляхи, які беруть участь у гальмуванні больових відчуттів.

Також не менш важливим механізмом є участь ацетамінофену в ендоканабіноїдній системі. У літературі показано, що в головному і спинному мозку мишей парацетамол підлягає деацетилюванню до *n*-амінофенолу. Далі відбувається взаємодія *n*-амінофенолу з арахідоною кислотою за дії гідролази амідів жирних кислот (ФААН). Така реакція інгібує утворення активного метаболіту N-арахідоноїлфеноламіну, який підвищує активність ендоканабіноїдної системи [11].

Споживання ацетамінофену спортсменами під час болю в м'язах є досить поширеним. Вважається, що препарат діє шляхом пригнічення простагландинів (PG), які синтезуються у скелетних м'язах і впливають на метаболізм протеїну в них. Зокрема, PGF₂ і PGE₂ збільшують синтез і деградацію білка скелетних м'язів. Сам по собі PGE₂ виконує болезаспокійливу функцію. Синтезується PG на двох рівнях:

- 1) шляхом контролю активності кількох ліпаз;
- 2) контроль активності PG-ендопероксид-ГН-синтази (циклооксигенази).

Інгібування ацетамінофеном циклооксигенази змінює рівень PG у скелетних м'язах [13]. Безрецептурні дози препарату блокують циклооксигеназу, яка регулює синтез м'язового білка, що призводить до його зменшення у скелетних м'язах. Також у літературі описані випадки, що постійне споживання інгібіторів ЦОГ послаблює гіпертрофію м'язів і

відновлення росту після атрофії (втрати м'язової маси), що в процесі старіння призведе до негативних наслідків, що пов'язане з виникненням мітохондріальної дисфункції [14].

Окрім того, передозування ацетамінофеном є основною причиною медикаментозної гострої печінкової недостатності. Саме мітохондріальна дисфункція є основою ушкодження печінки [36]. У процесі пошкодження основними мішенями проміжного метаболіту АРАР є мітохондріальні білки. NAPQI також впливає на функціонування I та II комплексів дихального ланцюга. Метаболіт спричиняє витік електронів з дихального ланцюга, утворюючи супероксидні радикали, які в свою чергу у мітохондріях дисмутуються за участі супероксиддисмутази (MnSOD) до пероксиду водню (H_2O_2) і молекулярного кисню (O_2) або реагують з ендogenous оксидом азоту (NO) з утворенням пероксинітриту ($ONOO^-$) [37]. Після цього H_2O_2 детоксикується за дії GSH чи нейтралізується антиоксидантними ферментами у гепатоцитах, зокрема каталазою. В результаті GSH починає виснажуватися від надмірної кількості вільних радикалів і це призводить до збільшення $ONOO^-$, що викликає пошкодження мітохондріальної ДНК [38].

Рекомендованим клінічним антидотом проти токсичного отруєння парацетамолом є N-ацетилцистеїн (NAC) [36]. N-ацетилцистеїн – це сірковмісна амінокислота, яка є похідною амінокислоти L-цистеїну. Препарат мінімізує гепатотоксичність, викликану ацетамінофеном. Він має захисну дію при введенні на етапі окиснювального ураження, коли GSH виснажується. Надлишок NAC у печінці підтримує рівень АТР, слугуючи донором енергетичних субстратів для циклу Кребса. NAC підсилює утворення глутатіону, який є найпоширенішим антиоксидантом. Глутатіон сприяє детоксикації вільних радикалів кисню та токсичних речовин в організмі, виробляється він у печінці. Невеликі кількості парацетамолу метаболізуються цитохромом P450 до активного проміжного метаболіту

NAPQI. Далі відбувається кон'югація NAPQI з глутатіоном, після чого проміжний метаболіт виділяється разом із сечею. Високі дози ацетамінофену призводять до виснаження глутатіону. Ацетилцистеїн є донором цистеїну, що допомагає підвищити рівень глутатіону [36].

1.3 Особливості структурно-функціональної організації ензиматичних комплексів дихального ланцюга

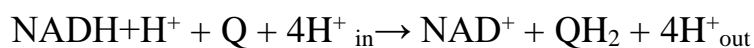
Мітохондрії – це двомембранні органели еукаріотичних організмів. У літературі їх часто називають «клітинними електростанціями». Така характеристика пов'язана зі здатністю утворювати АТФ шляхом окисного фосфорилювання. Енергія у вигляді АТФ утворюється шляхом окислюючого фосфорилювання ADP, вона є необхідною для забезпечення життєдіяльності організму. Перетворення ADP відбувається завдяки окисненню пірувату та NADH, які є продуктами гліколізу. Також цей процес є практично неможливим без участі кисню (аеробне дихання). При відсутності кисню (анаеробне дихання) весь механізм утворення енергії сповільнюється приблизно в 15 разів [15]. Серія окисно-відновних реакцій, виробництва АТФ називаються дихальним або електронно-транспортним ланцюгом (ЕТС). Дихальний ланцюг складається з комплексу білків та коферментів, які є вбудованими в мембрану, та відіграє центральну роль в метаболізмі клітинної енергії. Елементи дихального ланцюга відповідають за транспорт електронів від NADH до кінцевого акцептора – O₂. Вивільнена енергія, отримана завдяки переносу електронів, використовується для встановлення протонного градієнту через внутрішню мембрану. Мінімальні порушення діяльності дихального ланцюга пов'язані із захворюваннями організму, тому необхідно розуміти, як ці комплекси збираються, регулюються та як вони функціонують. У людини компоненти ЕТС складаються з чотирьох білкових комплексів:

- 1) NADH-дегідрогенази;

- 2) сукцинатдегідрогенази;
- 3) цитохром *bc₁*;
- 4) цитохром *c*-оксидази [16].

Комплекси I, III і IV функціонують як протонний насос, для цього вони використовують три різні механізми, а саме передачу через антипорт субодиниці (комплекс I), Q-цикл (комплекс III) та водозамкнений механізм (комплекс IV). Комплекс II не перекачує протони, але він сприяє відновленню убіхінону, який слугує джерелом електронів для комплексу III. Комплекс III приймає електрони у формі хінолу від I та II комплексів, які, у свою чергу, окислюють NADH і сукцинат. Потім комплекс III відновлює цитохром *c* і той переходить до комплексу IV, віддаючи свій електрон для остаточного відновлення кисню. Згенерований протонний градієнт використовується п'ятим компонентом системи, АТФ-синтазою, яка фосфорилує ADP до АТФ [40].

Комплекс I (NADH-дегідрогеназа). Цей фермент є найскладнішим з усіх ферментів мітохондрій, складається близько з 45 субодиниць (13 основних та 31 додаткових). Молекулярна маса цих субодиниць становить ~1 МДа. Має L-подібну форму, одна частина є вбудованою в мембрану, інша – знаходиться в мітохондріальному матриксі. Основні субодиниці складають внутрішню частину комплексу і містять усі каталітичні центри. Фермент відіграє основну роль у процесі клітинного дихання, оскільки майже 40% протонного градієнту для утворення енергії АТФ створюється ним. NADH-дегідрогеназний комплекс каталізує таку реакцію:



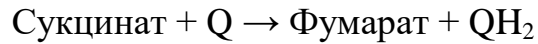
Інгібіторами цієї реакції є ротенон та пієрицин [17]. Реакція проходить шляхом окислення NADH у матриксі та передачі електронів через флавінмононуклеотид до убіхінону у внутрішній мембрані мітохондрій. Транслокація чотирьох протонів у міжмембранному просторі дозволяє одночасне проходження двох електронів до убіхінону [18]. Від

убіхінону електрони переносяться на третій комплекс дихального ланцюга (цитохром-*bc₁*). Електрохімічний потенціал, який утворився у ході реакції, використовується для синтезу АТФ. При високому протонному градієнті зв'язок комплексу з убіхінолом стає міцнішим, відповідно редокс-потенціал знижується, що пов'язано з зростанням його концентрації. Завдяки такому механізму відбувається зворотній транспорт електронів до NAD^+ [19]. Під час зворотного транспорту комплекс утворює супероксид, це відбувається в результаті переносу електрона від FMN до O_2 . В ході переносу утворюється радикал флавіну, який також переносить електрон, що залишився, на залізо-сірчані кластери (Fe-S) [18].

NADH -дегідрогеназний комплекс, як і другий комплекс дихального ланцюга, відіграє важливу роль у процесах старіння організму. При уповільненні старіння порушується функціонування першого комплексу, відбувається підвищення мітохондріального окиснювального стресу. Такі зміни найбільш помітні у м'язовій тканині. Отже, даний комплекс є важливим для правильного функціонування енергетичного обміну, та в спрямуванні енергії для скелетних м'язів [17].

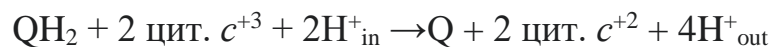
Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа). Сукцинатдегідрогеназа є другим комплексом дихального ланцюга. Даний фермент розташовується у внутрішній мембрані мітохондрій і є ключовим компонентом у клітинному метаболізмі. Складається з двох гідрофільних (А, В), повернених до матриксу, та двох гідрофобних (С, D – трансмембранні білки) субодиниць, які заковані у ядерному геномі. На субодиниці А розміщується FAD та сайт зв'язування сукцинату, субодиниця В містить три залізо-сірчані кластери ($2\text{Fe}-2\text{S}$, $4\text{Fe}-4\text{S}$ і $3\text{Fe}-4\text{S}$), які відповідають за окиснення сукцинату та перенесення електрона на хінон. Гідрофобні субодиниці утворюють цитохром *b650*, в якому розташовується сайт зв'язування убіхінону. Молекулярна маса мономеру становить від ~ 125 кДа до ~ 140 кДа [20].

Сукцинатдегідрогеназний комплекс каталізує окислення сукцинату до фумарату, відновлюючи убіхінон та убіхінол шляхом переносу атомів гідрогену на коферментну частину FAD, сприяючи відновленню пулу хінонів, субстрату комплексу III [40]:



На початку реакції електрони від сукцинату переносяться на FAD, який сприяє відновленню окисленню сукцинату, далі через залізосірчані кластери переходять до убіхінону. На відміну від NADH-дегідрогеназного комплексу, під час переносу електронів генерації протонного градієнту не відбувається. Протони, що утворилися під час окислення сукцинату, поглинаються при відновленні хінону, а до того перебувають у своєму місці утворення – матриксі. Тобто другий комплекс ЕТС функціонує як переносник електрону від сукцинату до убіхінону, який дифундує до третього комплексу та підлягає повторному окисленню [21].

Комплекс III (цитохром-*bc₁*). Цей комплекс є водорозчинним білком та відіграє основну роль у генерації протонного градієнту. Комплекс III необхідний для функціонування комплексу I і комплексу IV. Механізм дії комплексу називається Q-цикл, може здійснюватися лише у димерній формі [40]. Відповідає за окислення убіхінону з наступним відновленням цитохрому *c*:



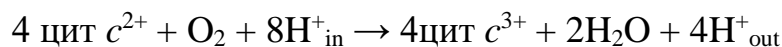
Під час реакції відбувається перенесення протонів з матриксу у міжмембранний простір. Транспорт протонів супроводжується утворенням протонного градієнту. Відновлений цитохром *c* в свою чергу переносить один електрон до комплексу IV.

Цитохром *bc₁* має облігатну гомодимерну структуру, складається з 11 субодиниць, 8 з яких є гідрофобними мембранними білками. Структура комплексу містить чотири окисно-відновні простетичні групи: FeS-центр, цитохром *c₁* (також відомий як CYS1) та два цитохроми *b* (також відомі як

MT-CYB), які утворюють головну субодиницю [40]. Цитохром *b* містить дві групи гему, названі гем b_L і гем b_H , складові низькопотенційного окисно-відновного ланцюга, тоді як цитохром c_1 містить гем c_1 , складову високопотенційного окисно-відновного ланцюга разом із Fe–S кластером. Молекулярна маса білка становить 12,5 кДа [22].

На додаток до каталітичних субодиниць, комплекс III містить надлишкові субодиниці, склад яких відрізняється для різних видів. Фермент ссавців містить вісім таких субодиниць: коровий 1 і коровий 2 білки (відомі також як UQCRC1 і UQCRC2) у матриксі та шість додаткових субодиниць. П'ять з них інкапсулюють каталітичне ядро (UQCRH, UQCRB, UQCRQ, UQCR10 і UQCR11) і одна з них відповідає відщепленому сигнальному пептиду [40].

Комплекс IV (цитохром *c*-оксидаза). Цей комплекс каталізує реакцію перенесення електронів з третього комплексу на кисень:



Під час реакції здійснюється окислення 4 молекул цитохрому *c* з подальшим відновленням O_2 до H_2O . При відновленні 4 протони захоплюються мітохондріальним матриксом, інші чотири – перекачуються через мембрану. Окрім утворення протонного градієнту, цитохромоксидаза бере активну участь в регуляції активності всього дихального ланцюга. Тож дефіцит цитохрому впливає на тканини з високим енергоспоживання, зокрема скелетні м'язи [23].

Структура комплексу складає гомодимер, що розташовується у внутрішній мембрані мітохондрій. Кожен мономер комплексу складається з 13 субодиниць, 3 з яких вбудовані в мембрану і кодуються мітохондріальною ДНК, інші кодуються в ядерному геномі [40]. Загальна молекулярна маса дорівнює близько 350 кДа. Субодиниця 1 (MT-CO1) містить у собі цитохроми *a* і a_3 , які зв'язуються між собою субодиницею та двома атомами купруму зі змінною валентністю, що використовується для

відновлення кисню до води [24]. Субодиниця 2 (MT-CO2) містить мідний центр CuA, первинний акцептор електронів від розчинного переносника цитохрому *c*. Третя основна субодиниця (MT-CO3), містить три міцно зв'язані фосфоліпіди, які регулюють поглинання кисню та його передачу до активного центру. Також у мономерній структурі комплексу IV була ідентифікована додаткова 14-та субодиниця (NDUFA4) [40]. Даний комплекс має найбільшу кількість факторів складання (майже 50), не зважаючи на невелику кількість субодиниць.

1.4 Значення співвідношення лактату до пірувату для функціонування скелетних м'язів

Піруватдегідрогеназний комплекс (PDC) займає ключову позицію в метаболізмі скелетних м'язів. Він забезпечує надходження енергії, отриманої з вуглеводів, у мітохондрії для окислення. PDC регулюється циклом фосфорилування-дефосфорилування. PDC має чотири ізоформи. Ізоформа PDC4 переважно експресується в скелетному та серцевому м'язах. Помітне збільшення PDC4 в скелетних м'язах людини відбувається під час тривалих фізичних вправ, після короткочасних вправ високої інтенсивності та тривалих фізичних вправ низької інтенсивності. Транскрипційна реакція PDC4, викликана фізичним навантаженням, посилюється, коли рівень глікогену в м'язах знижується перед тренуванням. Активність піруватдегідрогенази (PDH) підвищується протягом перших 2 годин фізичного навантаження низької інтенсивності, а потім знижується до рівня спокою, що відповідає можливості того, що підвищена експресія PDC4 впливає на активність PDH вже під час тривалого фізичного навантаження [41]. Значна частина пірувату в клітинах утворюється як кінцевий продукт гліколізу. В кінці метаболічного шляху фермент піруваткіназа каталізує перенесення фосфатної групи фосфоенолпірувату на ADP (субстратне фосфорилування). В ході такої

реакції утворюється АТР та піруват [42]. Після окисного декарбоксілювання утворюється ацетил-КоА, який вступає у цикл трикарбонових кислот. Піровиноградна кислота є центральним метаболітом вуглеводного обміну та одним із основних субстратів глюконеогенезу.

Скелетні м'язи є основним виробником молочної кислоти в організмі. Вони використовують лактат як паливо для дихання. Молочна кислота утворюється в організмі внаслідок відновлення PDC в анаеробних умовах і є кінцевим продуктом реакції гліколізу та глікогенолізу. Вивільнення та поглинання лактату включає трансмембранний транспорт, який опосередковується мембранним білком, який називається монокарбоксилатним транспортером (MCT) [44]. Вивільнений лактат може засвоюватись серцем, іноді мозком. Лактат є метаболічним проміжним продуктом, який виконує функцію обміну між різними клітинами всередині даного м'яза, або між м'язом і кров'ю, а також між м'язом та іншими різними тканинами. Переміщуючись між клітинами, він виконує три функції: основне джерело для дихання мітохондрій, основний глюконеогенний попередник та сигнальна молекула [43]. Швидкий транспорт лактату має важливе значення для функціональної активності м'язів [42].

Підвищення співвідношення між лактатом та піруватом є показником недостатнього енергопостачання клітин. Це показує домінування анаеробних обмінних процесів. У здорових людей співвідношення молочної та піровиноградної кислоти повинно становити приблизно 10:1. У разі виникнення гіпоксії активується анаеробний гліколіз, утворюється надлишок молочної кислоти. За умов недостачі інсуліну зменшується активність піруватдегідрогенази, це призводить до того, що піруват не трансформується в ацетил-КоА, а перетворюється в лактат. Крім того, гіпоксія гальмує ресинтез лактату в глікоген у печінці. Таким чином,

співвідношення лактат/піруват зсувається в бік лактату і формується надлишок останнього. При цьому можливості організму для виведення і знешкодження лактату можуть також бути зменшені.

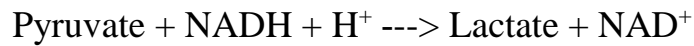
1.5 Особливості вмісту лактатдегідрогенази у скелетний м'язах

Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) – цитоплазматичний фермент, що бере участь у реакціях гліколізу та є важливим ензимом анаеробного метаболічного шляху. ЛДГ присутня майже у всіх тканинах організму, проте її найбільша концентрація в печінці, нирках та м'язах. Ензим належить до класу оксидоредуктаз. Структура ЛДГ являє собою тетрамер, що складається з 4 субодиниць. Кожна субодиниця утворена пептидним ланцюгом з 334 амінокислот. Молекулярна маса ензиму становить 144 кДа. Найбільшу активність фермент проявляє у серцевому м'язі, нирках, печінці, еритроцитах та скелетних м'язах.

Тетрамерний комплекс ЛДГ складається з двох різних ізоформ, LDH-A і LDH-B, що кодуються генами *Ldha* і *Ldhb*. Ізоферменти містять комплекси, які класифікують на LDH1 – містить чотири Н субодиниці (H₄), LDH2 – три Н та одну М субодиниці (M₁H₃), LDH3 – дві Н та дві М субодиниці (M₂H₂), LDH4 – одну Н та три М субодиниці (M₃H₁) і LDH5 – чотири М субодиниці (M₄). Ізоформа LDH-A (або М) переважає у печінці та скелетних м'язах, ізоформа LDH-B (або Н) переважає у серцевому м'язі. Всі ізоформи відрізняються спорідненістю до субстрату, концентрацією інгібування та ізоелектричною точкою [47].

L-лактат, що є субстратом для мітохондріальної лактатдегідрогенази (mL-LDH) через симпорт L-лактат/Н і антипорт L-лактат/піруват і L-лактат/оксалоацетат транспортується до мітохондрій. Після цього mL-LDH полегшує процес окислення L-лактату до пірувату.

Ензим бере участь у реакції окиснення глюкози. Також лактатдегідрогеназа регулює клітинний гомеостаз пірувату та лактату. Ізоформа LDH-A, каталізує перетворення пірувату на лактат:



Під час тренування, м'язи виснажуються і піруват перетворюється в молочну кислоту за участі ЛДГ. В еритроцитах піруват не метаболізується далі через відсутність мітохондрій, але залишається в цитоплазмі, перетворюючись на лактат. У цій реакції NADH окислюється до NAD⁺. Хімічна реакція протікає шляхом перенесення іона гідриду від NADH до пірувату. Ізоформа LDH-B діє у зворотньому напрямку перетворюючи лактат на піруват [46].

Норма лактатдегідрогенази в крові дорослих становить 240-480 Од/л. Підвищення рівня лактатдегідрогенази у організмі може свідчити про захворювання серця, печінки, нирок та скелетних м'язів. Також рівень лактатдегідрогенази може зростати у новонароджених, вагітних та після інтенсивних фізичних навантажень. Оскільки є багато умов підвищення активності ЛДГ, аналіз ферменту буде більш специфічним, якщо розділити його на ізоферментні фракції [47]. Якщо підвищення ферменту вказує на деструкцію тканин, то зниження рівня ЛДГ під час лікування свідчить про покращення функцій організму або хорошу відповідь на лікування при різних станах пошкодження організму. Хоч низький рівень ферменту зустрічається рідко, але знижений рівень ЛДГ може свідчити про наявність в плазмі специфічних інгібіторів активності ферменту або бути пов'язаний з генетичними порушеннями [48].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експеримент проводили на кафедрі біохімії за стандартною схемою: «білих безпородних щурах віком 2,5-3 місяці та масою 120-160 г. Маніпуляції та умови утримування тварин, що використовувались в ході експерименту, відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і наукових цілей», та рекомендаціям VII Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах». Дослідних тварин утримували в пластикових клітках з піщаною підстилкою і доступом до води *ad libitum*.

Модель дослідження передбачала поділ тварин на 4 групи:

1. Контроль (К) – інтактні тварини, що перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні;
2. ННР – тварини, які перебували на низькопротеїновому раціоні;
3. ТУ – щурі з ацетамінофен-індукованим ураженням на повноцінному раціоні;
4. ННР/ТУ – щурі, яким моделювали токсичне ураження на тлі елементарної нестачі протеїну.

Тварин утримували на раціоні, розробленому згідно рекомендацій Американського інституту нутриціології.

Експеримент тривав 28 діб, наприкінці всіх щурів виводили з експерименту за допомогою декапітації під легким ефірним наркозом» [53].

Виділення мітохондріальної фракції

Мітохондріальну фракцію скелетних м'язів виділяли методом диференційного центрифугування в середовищі, що містило 0,1 М хлорид калію, 0,05 М трис-НСl, 0,001 М хлорид магнію і 0,1 ЕДТА (рН 7,4) [25].

Охолоджені м'язи переносили у зважувальний стакан і визначили вагу тканини (3 г) потім подрібнювали ножицями на чашці Петрі. Далі у стакан додавали середовище виділення, об'єм якого перевищував у 4 рази

об'єм тканини. Далі цю суміш подрібнювали у гомогенізаторі. Отриманий гомогенат переносили в центрифужні стакани та центрифугували при 2-3⁰С 7 хв при 600 об/хв. Надосад знову центрифугували 5 хв при 2000 об/хв для видалення міофібрил. Отриманий супернатант фільтрували через 4 шари марлі і центрифугували 10 хв при 9000 об/хв. Отриманий осад мітохондрій двічі промивали 2 мл середовища виділення для видалення верхнього шару. Внутрішні стінки стакана підсушували фільтрувальним папером. Осад суспендували за допомогою піпетки. Отриману суспензію мітохондрій використовували для подальшого дослідження.

Визначення вмісту протеїну проводили за методом Лоурі

Визначення активності сукцинатдегідрогенази

Принцип методу базується на відновленні фериціаніду (III) калію ($K_3[Fe(CN)_6]$) жовтого забарвлення до безбарвного фериціаніду (II) калію ($K_4[Fe(CN)_6]$) за дії сукцинатдегідрогенази [27].

В центрифужні пробірки додавали по 1мл 0,1 мл фосфатного буферу (рН 7,8), що містив 25 мМ фериціаніду калію та інкубували їх протягом 5 хв при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 20% ТХО. Пробі центрифугували при 2000 об/хв 15 хв для осадження білка. Отриманий надосад фотометрували при 420 нм. Швидкість реакції розраховували як нмоль фериціаніду, що утворюється за хвилину на мг білка.

Ензиматичну активність сукцинатдегідрогенази розраховували за формулою: $A=1000m/2Mat$, де m – кількість відновленого фериціаніду в пробі, M – молекулярна маса фериціаніду, a – вміст білка в пробі (мг), t – час інкубації.

Визначення активності NADH-дегідрогенази

Визначення NADH-дегідрогеназної активності в мітохондріальній фракції скелетних м'язів проводили спектрофотометричним методом при 340 нм протягом 2 хв через 20 с [26].

В кювети додавали по 2 мл 0,02 М трис-фосфатного буфера (рН 7,4). Реакцію запускали додаванням по 0,02 мл мітохондріальної фракції скелетних м'язів щурів та 100 мкМ NADH. Активність ензиму розраховували з урахуванням коефіцієнту молярної екстинції – $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

Ензиматичну активність NADH-дегідрогенази виражали у нмоль NADH / хв на мг протеїну.

Визначення активності лактатдегідрогенази

Принцип методу базується на перетворенні пірувату в лактат з одночасним окисленням NADH. Швидкість зменшення абсорбції прямо пропорційна активності ЛДГ у пробі. Визначення проводили згідно інструкції до набору реактивів для «Визначення загальної активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) (кінетичний УФ метод).

Температура	Плюс 25 ⁰ С чи плюс 30 ⁰ С	Плюс 37 ⁰ С
Піпетувати, мкл	напівмікро	напівмікро
Буферний розчин (P1)	2000	2000
Інкубувати 5 хв, потім додати		
Зразок	50	25
Перемішати, інкубувати 1 хв, потім додати		
Розчин субстрату (P2)	500	500

Буферний розчин (P1) (рН 7,4) містив: ТРІС, піруват та ЕДТА

Розчин субстрату (P2) містив: NADH (16) мг розчинили з стабілізуючим розчином (гідроксид натрію 0,01 Н – 20 мл). Активність лактатдегідрогенази виражали у ммоль/хв на мг протеїну» [45].

Визначення вмісту пірувату

Принцип методу базується на утворенні гідразону при взаємодії піровиноградної кислоти з 2,4 динітрофенілгідразином. Інтенсивність утвореного забарвлення пропорційна кількості піровиноградної кислоти.

У пробірки з дослідними та холостими пробами додавали по 0,7 мл та 1 мл дистилляту. Далі перемішували і додавали по 1 мл 10% ТХО. Після цього інкубували 3 хв та центрифугували при 1500 об/хв протягом 15 хв. До центрифугату додавали ДНФГ (денітрофенілгідразин) та витримували у темному місці. Через 20 хв додавали по 1 мл розчину NaOH і колориметрували в кюветах при синьому світлофільтрі з довжиною хвилі 440 нм проти холостої проби.

Вміст ПВК вираховували за калібрувальним графіком.

Визначення вмісту лактату

Визначення вмісту молочної кислоти проводили спектрофотометричним методом.

До пробірок з 2 мл 0,2% розчину хлориду заліза (III) додавали 50 мкл дослідного матеріалу. Оптичну густину вимірювали при 390 нм відносно контролю (2 мл 0,2% розчину FeCl₃).

Вміст молочної кислоти визначали за калібрувальним графіком.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Скелетні м'язи – це тканини, що потребують великих затрат енергії, та є одними з найбільш динамічних та пластичних тканин організму. У людському організмі їхня частка складає приблизно 40% від усієї маси тіла. Основною функцією скелетних м'язів є перетворення хімічної енергії у механічну [50]. Оскільки функціонування м'язів потребує великих затрат енергії, двома основними шляхами, які забезпечують утворення енергії АТР, є окисне фосфорилування та анаеробний гліколіз. Анаеробний гліколіз здатен підтримувати роботу м'язів протягом кількох хвилин інтенсивної роботи. Проте лактат, що є кінцевим продуктом реакції, порушує функцію м'язів. Окисне фосфорилування забезпечує довшу підтримку роботи м'язів за рахунок ферментів дихального ланцюга [51]. Основними ферментами, які забезпечують функціонування дихального ланцюга, є NADH-дегідрогеназа (комплекс I) та сукцинатдегідрогеназа (комплекс II). Наслідком зниження їх активностей у скелетних м'язах може бути порушення роботи дихального ланцюга з наступним виникненням дефіциту АТР та підвищенням мітохондріального окиснювального стресу. Оксидативний стрес супроводжується підвищенням концентрації активних форм кисню (АФК), які переважно продукуються мітохондріями дихального ланцюга. Наслідком підвищення концентрації АФК може бути м'язова атрофія, що призводить до м'язової втоми [53].

Результати проведених досліджень показали, що за умов утримування щурів на низькопротеїновому раціоні в мітохондріальній фракції скелетних м'язів активність NADH-дегідрогенази (рис. 1) та сукцинатдегідрогенази (рис. 2) порівняно з контролем достовірно не змінюються. Отримані результати вказують, що за умов споживання низькопротеїнового раціону процеси енергетичного забезпечення у м'язах не порушуються. Відомо, що за умов нестачі білка в раціоні м'язова маса буде зменшуватися, оскільки м'язи містять 50-75% усіх білків організму.

М'язова маса залежить від нормального синтезу білків та їхньої деградації, тому при недостатньому харчуванні, травмах чи захворюваннях їхня функціональна активність знижується.

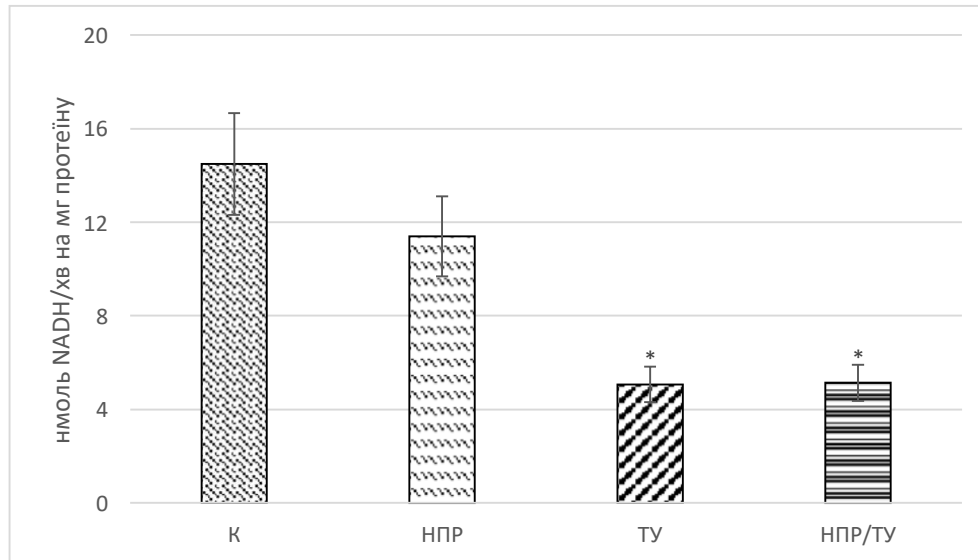


Рис. 1 NADH-дегідрогеназна активність у мітохондріях скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Примітка (тут і надалі): К – група тварин, які отримували повноцінний раціон; НПР – тварини, які перебували на низькопротеїновому раціоні; ТУ – тварини з ацетамінофен-індукованим ураженням, які перебували на повноцінному раціоні; НПР/ТУ – тварини, яким моделювали токсичне ураження на тлі утримання на низькопротеїновому раціоні

* – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $P < 0,05$.

Проте, нами встановлено, що за умов введення токсичних доз ацетамінофену спостерігається виражене зниження досліджуваних ензиматичних активностей (рис. 1, рис. 2). Активність NADH-дегідрогенази знижується в понад три рази, активність сукцинатдегідрогенази знижується приблизно вдвічі порівняно з контролем. При цьому у тварин, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну, активність досліджуваних ензимів достовірно не відрізняється від показників групи тварин, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном на тлі повноцінного харчування.

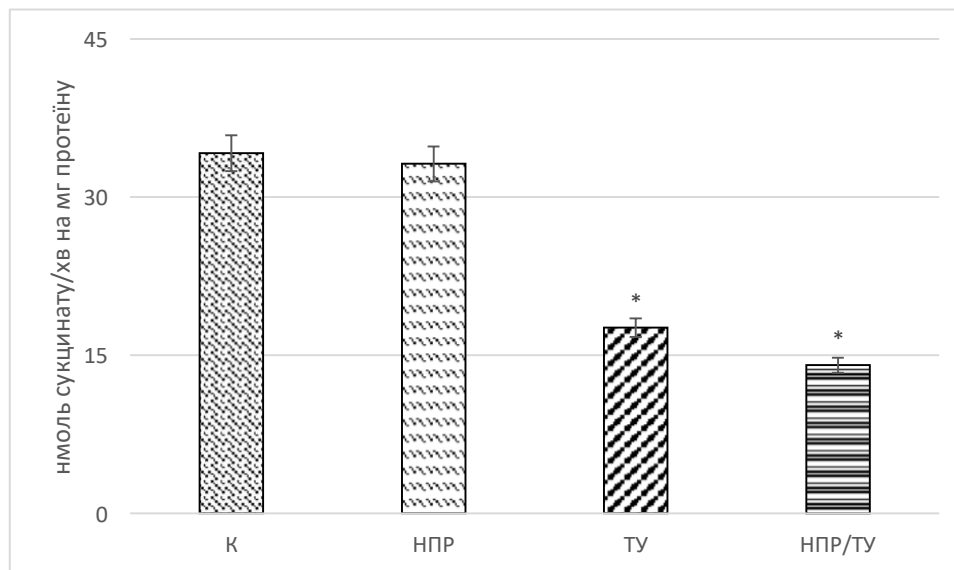


Рис. 2 Сукцинатдегідрогеназна активність у мітохондріях скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

У літературі показано [52], що порушення роботи комплексів I та II дихального ланцюга може призводити до метаболічної дисфункції, окиснювального стресу та формування енергетичного дисбалансу у скелетних м'язах. Також отримані результати можуть свідчити про порушення передачі електронів у дихальний ланцюг через I комплекс за досліджуваних умов. Імовірно, встановлене нами зниження досліджуваних ензиматичних активностей може бути пов'язано з посиленням накопиченням реактивного метаболіту *N*-ацетил-*p*-бензохіноніміну (NAPQI) за умов передозування ацетамінофеном. За нормальних умов цей метаболіт швидко виводиться із сечею шляхом кон'югації з глутатіоном (GSH), проте при токсичному ураженні кількість реактивного метаболіту швидко зростає. Надмірне утворення NAPQI починає виснажувати GSH, що викликає ковалентне зв'язування сульфгідрильних груп у клітинних білках. Внаслідок цього може відбутися порушення функціональної активності опорно-рухової системи [12]. Окрім того, посилене утворення NAPQI може індукувати окиснювальний стрес і надмірну кількість вільних радикалів. У стані спокою в скелетних м'язах присутні низькі концентрації активних

форм кисню (АФК), які виконують функцію сигналів у клітині, регулюють ріст, проліферацію та диференціацію. Містять один або кілька неспарених електронів. При окиснювальному стресі відбувається збільшення їхньої концентрації, в результаті чого починається посилене окиснювальне ушкодження ліпідів, білків та ДНК. Це призводить до порушення скоротливої здатності скелетних м'язів. Дослідження показали [54], що під час окиснювального стресу рівні посттрансляційних модифікацій білків, отриманих внаслідок окиснення, включаючи карбонілювання білка, підвищуються всередині волокон скелетних м'язів. Це свідчить про важливу роль цих волокон у функціонуванні скелетних м'язів. Показано, що кілька білків, зокрема міозин та актин, карбонілюються всередині м'язових волокон у тварин та людей, які зазнали порушення скоротливої здатності м'язів. Також до наслідків посиленого продукування АФК у скелетних м'язах є атрофія, що сприяє їхній втомі. До внутрішніх антиоксидантів, що захищають м'язи від перенасичення АФК належить глутатіонпероксидаза (GPX), для функціонування якої необхідний глутатіон. Регенерація GSH відбувається за участі глутатіоредуктази за допомогою відновних еквівалентів коензиму NADPH [55]. Фізична активність може відігравати значну роль у підвищенні вмісту АФК у скелетних м'язах. Під час фізичних вправ АФК також можуть виконувати роль стимуляторів поглинання глюкози з наступним підвищенням чутливості до інсуліну. Рівні окисного стресу у спортсменів залежать від обсягу, частоти та типу фізичного навантаження. Довготривала та помірна фізична активність захищає від окиснювального стресу, виробляючи GSH та АФК без їхнього істотного впливу на м'язи. Проте, найбільш виражене підвищення АФК у спортсменів пов'язане з пошкодженням м'язів під час фізичних вправ. Таке пошкодження відбувається у дві фази: пошкодження м'язів під час тренування, що пов'язано з структурою м'язових волокон; уповільнення запальної відповіді [56]. Імовірно, наслідком встановленого

нами зниження активностей I та II комплексів дихального ланцюга за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності буде ослаблення м'язової скоротливої здатності та формування втоми.

Оскільки нами встановлено зниження активності ензимів дихального ланцюга, то на наступному етапі роботи ми дослідили активність лактатдегідрогенази як ключового ензиму анаеробного перетворення пірувату.

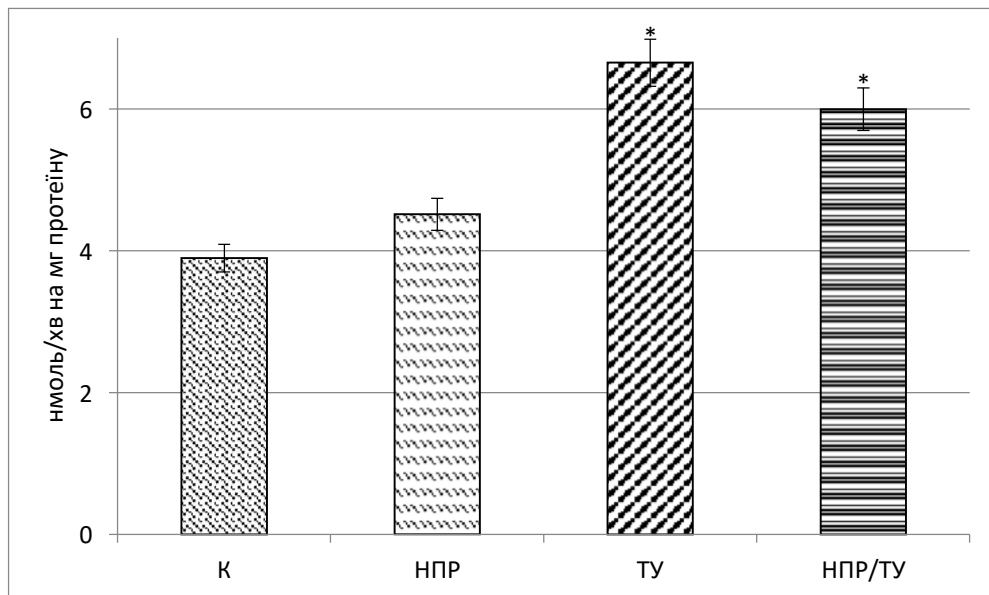


Рис. 3 Активність лактатдегідрогенази в цитозолі скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Відомо, що у скелетних м'язах знаходиться ізоформа лактатдегідрогенази LDH-A (або M), кожен з комплексів містить по чотири субодиниці. Ензим бере участь у метаболізмі глюкози. Ізоформа LDH-A володіє високою спорідненістю до пірувату, і каталізує реакцію перетворення пірувату на лактат. У ході цієї реакції NADH окислюється до NAD⁺. Також лактатдегідрогеназа виконує функцію підтримки гомеостазу при нестачі кисню, особливо під час фізичних навантажень на скелетні м'язи. За таких умов піруват за дії лактатдегідрогенази починає перетворюватися у молочну кислоту. За нормальних фізіологічних умов активність лактатдегідрогенази підвищується під час інтенсивних фізичних

вправ. Проте, підвищення активності ензиму у цитозолі скелетних м'язів може свідчити про м'язову дистрофію [47]. Нами встановлено, що активність лактатдегідрогенази у групі тварин, які перебували на низькопротеїновому раціоні, достовірно не змінюється (рис. 3). При цьому, вміст лактату (рис. 4) у цитозолі скелетних м'язів щурів також достовірно не змінюється, проте знижується вміст пірувату (рис. 5).

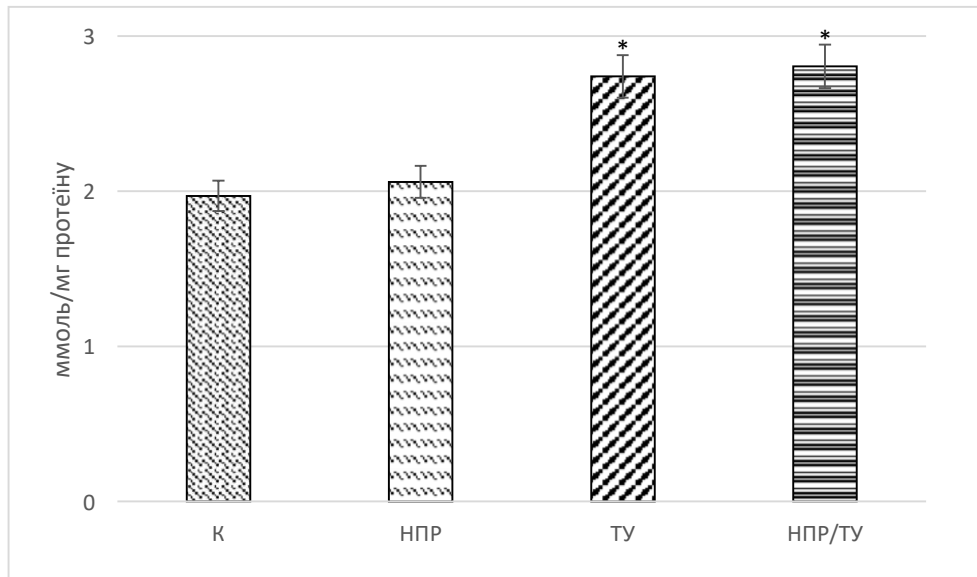


Рис. 4 Вміст лактату в цитозолі скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Встановлений факт свідчить, що, імовірно, у цитозолі скелетних м'язів за умов низькопротеїнового раціону піруват використовується для перетворення в інших метаболічних шляхах. Відомо, що піруват є кетокислотою, яка використовується для синтезу замісних амінокислот, однією з яких є аланін. Для забезпечення енергетичних потреб у м'язах посилюється катаболізм амінокислот, що сприятиме перетворенню пірувату на аланін [57]. Аланін в свою чергу регулює рівень карнозину в організмі, який відіграє важливу роль для гомеостазу скелетних м'язів. Цей дипептид здатен покращувати скоротливу здатність та брати участь у захисті від АФК. Показано, що у спортсменів вміст карнозину у скелетних м'язах більший, ніж у звичайних людей [58]. Тому отримані нами результати щодо змін вмісту пірувату у скелетних м'язах можуть свідчити

про посилення процесу синтезу аланіну. Також зниження вмісту пірувату може вказувати на порушення енергетичних процесів у скелетних м'язах за аеробних умов.

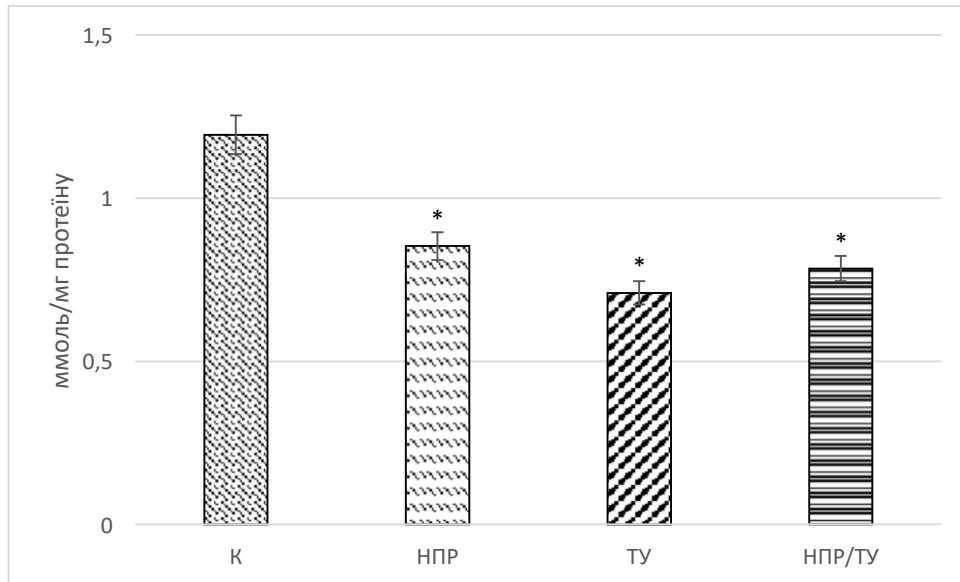


Рис. 5 Вміст пірувату в цитозолі скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Водночас за умов токсичного ураження ацетамінофеном показане нами зниження активності ензимів дихального ланцюга супроводжується вираженим зростанням активності лактатдегідрогенази (рис. 3), накопиченням лактату (рис. 4) на тлі зниження вмісту пірувату (рис. 5) та зростанням співвідношення лактат/піруват (рис. 6). Оскільки скелетні м'язи використовують лактат як субстрат для утворення АТФ у анаеробних умовах, встановлений факт свідчить про активацію анаеробних процесів утворення АТФ у клітині. Відомо, що лактатдегідрогеназа – це ключовий ензим, який бере участь в реакціях окиснення пірувату за анаеробних умов та каталізує оборотну реакцію між піруватом та лактатом. Підвищення активності лактатдегідрогенази у скелетних м'язах характерне при їхньому ураженні та м'язовій дистрофії [59]. За умов порушення аеробного енергопостачання активуються процеси анаеробного енергозабезпечення.

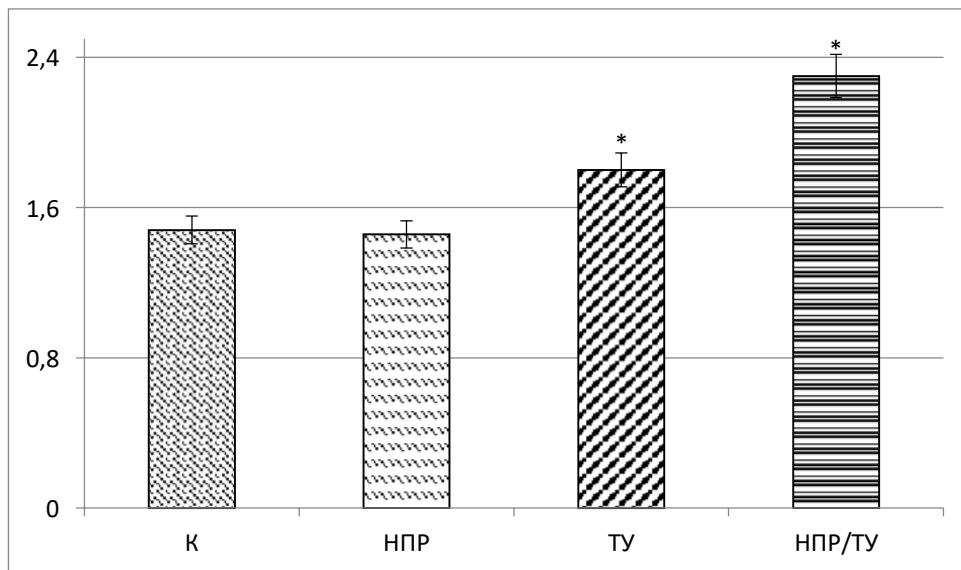


Рис. 6 Співвідношення лактат/піруват в цитозолі скелетних м'язів щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Для оцінки співвідношення аеробного до анаеробного метаболізму визначають співвідношення лактат/піруват, оскільки цей показник є важливим параметром для оцінки енергетичного стану клітини [60]. Результати проведених досліджень показали підвищення співвідношення лактат/піруват у цитозолі скелетних м'язів тварин, які утримувались за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну (рис.6). Такі результати можуть свідчити про переключення аеробних на анаеробні механізми енергозабезпечення клітини. Отримане співвідношення показує домінування анаеробних обмінних процесів у скелетних м'язах.

За нормальних умов співвідношення лактат/піруват становить 10:1 і відображає баланс між анаеробним і аеробним метаболізмом організму. У літературі показано [61], що підвищення співвідношення лактат/піруват може свідчити про порушення клітинного дихання або про дефекти мітохондріального окиснювального фосфорилування. Внаслідок підвищеного співвідношення відбувається збільшення відновних еквівалентів (надлишок NADH і відсутність NAD⁺). Можливою причиною підвищеного співвідношення лактат/піруват у цитозолі скелетних м'язів є дисфункція дихального ланцюга.

Отже, встановлені нами результати показали, що за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну у скелетних м'язах спостерігається порушення роботи ключових ензимів NADH-дегідрогенази (I комплекс) та сукцинатдегідрогенази (II комплекс) дихального ланцюга, на тлі активації анаеробних механізмів енергозабезпечення, про що свідчить підвищення активності лактатдегідрогенази та співвідношення лактат/піруват.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у тварин, які споживали низькопротеїновий раціон не спостерігається достовірного зниження активності ферментів дихального ланцюга, проте спостерігається зниження вмісту пірувату, що може вказувати на посилене використання його в інших метаболічних шляхах.
2. Встановлено, що максимально виражені зміни активностей ензимів I та II комплексів дихального ланцюга характерні для тварин, яких утримували за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну. У тварин вказаної групи активність NADH-дегідрогенази (I комплекс дихального ланцюга) знижується в понад три рази, активність сукцинатдегідрогенази (II комплекс) знижується приблизно вдвічі порівняно з контролем. Наслідком чого може бути порушення скоротливої здатності скелетних м'язів.
3. Показано, що за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну у цитозолі скелетних м'язів щурів спостерігається підвищення активності лактатдегідрогенази та зростання співвідношення лактат/піруват на тлі зниження вмісту пірувату та підвищення вмісту лактату.

Отже, отримані результати свідчать про порушення аеробних механізмів та активацію анаеробних механізмів енергозабезпечення скелетних м'язів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну.