

**ОСОБЛИВОСТІ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ І Н<sup>+</sup>-АТФ-АЗНОЇ АКТИВНОСТІ В НИРКАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ 2,4-ДИНІТРОФЕНОЛОМ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЯ МЕЛАТОНІНОМ**

*У досліджах на 36 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях встановлено суттєве зниження сукцинатдегідрогеназної та Н<sup>+</sup>-АТФ-азної активності в мітохондріях нирок за умов уведення 2,4-динітрофенолу, що свідчить про розвиток енергодефіцитного стану організму. Застосування мелатоніну викликало підвищення активності сукцинатдегідрогенази та нормалізацію Н<sup>+</sup>-АТФ-азної активності.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** нирки, окиснювальний стрес, сукцинатдегідрогеназа, Н<sup>+</sup>-АТФ-аза, 2,4-динітрофенол, мелатонін.

**ВСТУП.** Сукцинатдегідрогеназа (СДГ) – один із найважливіших ферментів енергетичного обміну. СДГ є компонентом ІІ комплексу дихального ланцюга мітохондрій, який переносить водень від сукцинату на КоQ без участі NAD<sup>+</sup>, внаслідок чого забезпечує додатковий шлях надходження електронів у дихальний ланцюг мітохондрій і виконує компенсаторну функцію в енергозабезпеченні клітин у разі порушення NAD-залежного дихання [1, 5, 9].

Ключовим ферментом, що забезпечує спряження роботи дихального ланцюга та синтезу основних макроергічних сполук клітини – АТФ, є Н<sup>+</sup>-АТФ-аза, розташована у внутрішній мембрані мітохондрій [6, 11].

Мітохондрії продукують енергію АТФ за спряження протонного градієнта, який генерується при роботі дихального ланцюга, з фосфорилуванням ADP під дією F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-синтази [8, 12]. По дихальному ланцюгу передаються електрони від відновленого субстрату до кисню, а протони під дією різниці окисно-відновного потенціалу переносяться через внутрішню мембрану мітохондрій. Таким чином відбувається стабілізація градієнта протонного електрохімічного потенціалу, який з участю Н<sup>+</sup>-АТФ-ази запускає синтез АТФ [9, 13].

АТФ-аза мітохондрій може функціонувати як АТФ-синтаза або АТФ-гідролаза. Напрямок дії ферменту залежить від зміни балансу між рівнем електрохімічного градієнта протонів, що встановлює величину вільної енергії транслокації протонів через мембрану за градієнтом

© М. В. Дікал, Є. О. Ференчук, 2014.

і співвідношенням АТФ до ADP+P<sub>i</sub> та визначає величину вільної енергії синтезу АТФ. Ми визначали гідролізу активність Н<sup>+</sup>-АТФ-синтази. Окисно-відновні реакції, які каталізуються І, ІІ та ІІІ комплексами дихального ланцюга мітохондрій, спряжені з генерацією Δμ<sub>H<sup>+</sup></sub>, і Н<sup>+</sup>-АТФ-аза використовує енергію Δμ<sub>H<sup>+</sup></sub> для забезпечення функціонування клітин.

Ефективна реалізація роботи нирок супроводжується затратами енергії, що вказує на необхідність повноцінного функціонування системи енергозабезпечення мітохондрій нефроцитів при патології. Ферментативну активність компонентів дихального ланцюга нефроцитів тварин, яким вводили 2,4-динітрофенол (2,4-ДНФ), вивчено недостатньо, тому метою роботи було з'ясувати вплив мелатоніну на стан системи енергозабезпечення нефроцитів при введенні 2,4-ДНФ.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження проведено на 36 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 0,16–0,20 кг, які перебували в умовах віварію зі сталим температурним та світловим режимами. Їх поділили на три групи: 1-ша – контрольна група тварин; 2-га – тварини, в яких моделювали токсичне ураження шляхом внутрішньочеревного введення 0,1 % розчину 2,4-ДНФ у дозі 3 мг/кг одноразово; 3-тя – тварини, яким на фоні моделювання токсичного ураження 2,4-ДНФ для корекції вводили мелатонін ("Sigma", США) з розрахунку 3 мг/кг маси тіла. Через 2 год після навантаження проводили евтаназію щурів шляхом

декапітації під легким ефірним наркозом відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту експериментальних тварин (86/609 ЄЕС). Мітохондріальну фракцію отримували методом диференційного центрифугування [3]. Активність СДГ визначали за інтенсивністю відновлення калію фериціаніду [4],  $H^+$ -АТФ-азну активність – за накопиченням неорганічного фосфату [2], вміст білка – за методом Лоурі [10]. Отримані цифрові дані опрацьовували статистично.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати досліджень показали, що в групі тварин, яким

уводили 2,4-ДНФ, суттєво знижувалась сукцинатдегідрогеназна (рис. 1) та  $H^+$ -АТФ-азна (рис. 2) активність, що можна пояснити дією 2,4-ДНФ як класичного роз'єднувача процесів окиснення і фосфорилування [1, 5, 7].

Зміни енергетичного забезпечення нирок внаслідок зниження активності  $H^+$ -АТФ-ази, ймовірно, викликані зміною трансмембранного потенціалу  $H^+$  і порушенням функціонування спряженої системи окиснювального фосфорилування мітохондрій дихального ланцюга клітин, що свідчить про розвиток енергодефіцитного стану організму.

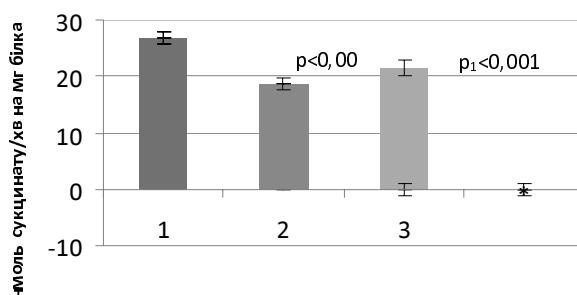


Рис. 1. Активність СДГ у мітохондріях нирок за умов уведення 2,4-ДНФ та мелатоніну (%): 1 – контроль; 2 – уведення 2,4-ДНФ; 3 – уведення мелатоніну; p – достовірність відмінностей порівняно з контролем.

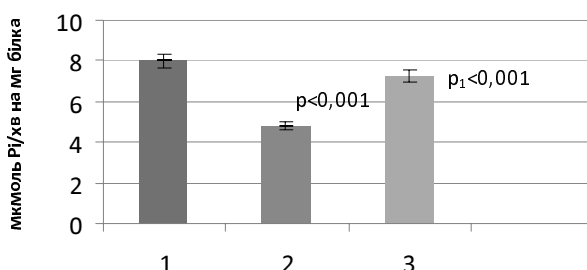


Рис. 2. Активність  $H^+$ -АТФ-ази в мітохондріях нирок за умов уведення 2,4-ДНФ та мелатоніну (%): 1 – контроль; 2 – уведення 2,4-ДНФ; 3 – уведення мелатоніну; p – достовірність відмінностей порівняно з контролем.

Уведення мелатоніну викликало зростання активності СДГ. Разом з тим, її рівень залишався нижчим порівняно з активністю ферменту в групі контрольних тварин. Посилення окиснення сукцинату спричиняло генерацію різниці потенціалів на мембрані мітохондрій та дозволяло прискорити енергозабезпечення клітин і підтримати їх функціонування за умов впливу пошкоджувального фактора. Зростання  $H^+$ -АТФ-азної активності за умов уведення мелатоніну можна розглядати як формування компенсаторно-приспосувального процесу підтримки мембранного потенціалу.

Встановлені зміни ферментативної активності вказують на порушення спряженості функціонування дихального ланцюга мітохондрій і є адаптивною реакцією на зниження електрохімічного потенціалу внутрішніх мітохондріальних мембран нефроцитів.

**ВИСНОВКИ.** 1. Уведення 2,4-динітрофенолу дослідній групі тварин призвело до пошкодження мітохондрій та пригнічення окиснення субстратів циклу трикарбонних кислот, порушення транспорту електронів дихальним ланцюгом, роз'єднання процесів дихання і

фосфорилування, зниження сукцинатдегідрогеназної активності й зменшення трансмембранного потенціалу з активацією  $H^+$ -АТФ-ази та, як наслідок, зниження компенсаторного потенціалу системи енергозабезпечення.

2. Корекція мелатоніном викликала підвищення активності сукцинатдегідрогенази та

нормалізацію  $H^+$ -АТФ-азної активності, оскільки мелатонін є донором електронів, забезпечує захист білкових молекул від окиснювальних пошкоджень, бере участь у захисті організму від окиснювального стресу, зв'язує вільні радикали та пришвидшує дію ферментів антиоксидантної системи.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вплив 2,4-динітрофенолу на дихальну активність та вміст АТФ у печінці щурів після гіпотермічного зберігання та наступної реперфузії / Д. В. Черкашина, О. М. Ткачова, О. Ю. Сомов [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 2. – С. 101–105.

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

3. 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. – **26**, № 1, вып. 1. – С. 22–28.

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

5. Роговий Ю. Є. Окисномодифіковані білки у нирках та печінці при інтоксикації 2,4-динітрофенолом та дії мелатоніну в експерименті / Ю. Є. Роговий, В. В. Белявський, М. В. Дікал // Клін. анат. та опер. хірургія. – 2011. – **10**, № 3. – С. 18–21.

6. Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection / Jan Minners, Ewout J. van den Bos, Derek M. Yellon

[et al.] // Cardiovascular Research. – 2000. – **47**. – P. 68–73.

7. Dryer S. E. Enhancement of Mitochondrial, Cyanide-resistant Superoxide Dismutase in the Livers of Rats Treated with 2,4-Dinitrophenol / S. E. Dryer, R. L. Dryer, A. P. Autor // J. Biol. Chem. – 1980. – **255**. – P.1054–1057.

8. Faccenda D. Molecular Regulation of the Mitochondrial  $F_1F_0$ -ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF1) / D. Faccenda, M. Campanella // Int. J. Cell Biol. – 2012. – **40**, № 12. – P. 2698–2701.

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

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

11. Tielens A. G. M. Mitochondria as we don't know them / A. G. M. Tielens // Trends in Biochem. Sciences. – 2002. – **27**, № 11. – P. 564–572.

12. Weber J. ATP synthesis driven by proton transport in  $F_1F_0$ -ATP synthase / J. Weber, E. Alan // FEBS Letters. – 2003. – № 545. – P. 61–70.

13. Yoshida M. ATP synthase – a marvellous rotary engine of the cell / M. Yoshida, E. Muneyuki, T. Hisabori // Nature. – 2001. – **2**. – P. 669–678.

**М. В. Дікал, Е. А. Ференчук**

БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ЧЕРНОВЦЫ

### ОСОБЕННОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ И $H^+$ -АТФ-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ПОЧКАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИНТОКСИКАЦИИ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛОМ И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ

#### Резюме

*В опытах на 36 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах установлено существенное снижение сукцинатдегидрогеназной и  $H^+$ -АТФ-азной активности в митохондриях почек в условиях введения 2,4-динитрофенола, что свидетельствует о развитии энергодефицитного состояния организма. Применение мелатонина вызвало повышение активности сукцинатдегидрогеназы и нормализацию  $H^+$ -АТФ-азной активности.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: почки, окислительный стресс, сукцинатдегидрогеназа,  $H^+$ -АТФ-аза, 2,4-динитрофенол, мелатонин.

**PECULIARITIES OF SUCCINATE DEHYDROGENASE AND H<sup>+</sup>-ATPASE, ACTIVITY  
IN THE KIDNEYS OF RATS WHEN INTOXICATED WITH 2,4-DINITROPHENOL  
AND THE CORRECTION OF MELATONIN**

**Summary**

*The influence of oxidative phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol on 36 albino non-linear male rat succinate dehydrogenase and H<sup>+</sup>-ATP-ase activity in the kidneys was investigated. 2,4-dinitrophenol led to decrease of activity of the investigated enzymes as compared with the control. The use of melatonin resulted in improvement of mitochondrial functional state, was registered increase of succinate dehydrogenase activity and normalization of H<sup>+</sup>-ATP-ase activity.*

**KEY WORDS: kidneys, oxidative stress, succinate dehydrogenase, H<sup>+</sup>-ATP-ase, 2,4-dinitrophenol, melatonin.**

Отримано 21.07.14

**Адреса для листування:** М. В. Дікал, Буковинський державний медичний університет, Театральна площа, 2, Чернівці, 58002, Україна.