

Структурно-функціональний стан внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів за моделювання гіпобіозу у щурів

С.Д. Мельничук, С.В. Хижняк, В.С. Морозова, В.М. Войцицький

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Structure-Functional State of Internal Mitochondrial Membrane of Hepatocytes during Modeling of Hypobiosis in Rats

S.D. MELNYCHUK, C.V. KHYZHNYAK, V.S. MOROZOVA, V.M. VOYTSITSKY

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Формування штучного гіпобіотичного стану веде до гіпометаболізму, який супроводжується зниженням енергозабезпечення теплокровного організму і потребує дослідження протікання біоенергетичних процесів у клітинах. Найповніше уявлення про інтенсивність процесів перетворення енергії за участю мітохондрій дає комплексний підхід, який включає дослідження активності ферментів дихального ланцюга, вмісту цитохромів, а також аналіз структурного стану внутрішньої мембрани мітохондрій, що і обумовило мету даного дослідження за моделювання вуглекислотного гіпобіозу у щурів.

В стан штучного гіпобіозу (протягом 2,5–3 годин) щурів вводили методом «закритої судини» Бахмет'єва-Джайя-Анжуса. Об'єктом дослідження були препарати внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів. Активність ферментів дихального ланцюга та вміст цитохромів у мембрані визначали спектрофотометрично за стандартними методиками. За допомогою 1-анілінонафталін-8-сульфонату (АНС) та пірену оцінювали структурно-динамічні властивості мембран. Зміни мікров'язкості ліпідної компоненти мембран визначали за ступенем ексімеризації пірену, що локалізується у зоні жирно кислотних ланцюгів фосфоліпідів. Конформаційні модифікації білкових молекул у мембранах оцінювали за ефективністю гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції.

Розвиток гіпобіозу супроводжується неоднозначними змінами в активності ферментів дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів: активність ферментів перших ланок спряження дихального ланцюга (НАДН-КоQ-оксидоредуктази та КоQ-цитохром *c*-оксидоредуктази) дещо зростає, в той час як активність цитохром *c*-оксидоредуктази (кінцева ланка спряження) знижується в середньому на 37%. Подібні зміни характерні для вмісту функціонально-активних цитохромів: вміст цитохромів груп *b* та *c* зростає, а групи *a* знижується у середньому на 26%. Крім того, показано пригнічення АТФ-синтетазної активності мітохондрій.

Методом флуоресцентних зондів встановлено зниження мікров'язкості анулярних (приблизьких) ліпідів внутрішньої мембрани мітохондрій в умовах гіпобіозу. Зміни параметрів флуоресценції мембранозв'язаного АНС вказує на модифікацію поверхневої (полярної) ділянки мембран. Результати вимірювання триптофанової флуоресценції свідчать про конформаційні зміни білкових молекул.

Таким чином, пригнічення енергетичної здатності мітохондрій гепатоцитів за умов гіпобіозу обумовлено зниженням функціональної активності кінцевої ланки спряження дихального ланцюга та перенесення електронів від субстрату окислення, в тому числі, можливо, і в результаті структурної модифікації внутрішньої мітохондріальної мембрани, про що свідчать зміни упорядкованості ліпідного та білкового компонент мембрани.

Formation of artificial hypobiotic state leads to hypometabolism accompanied by a decrease in energy supply of homoiothermic organism and requires the study of bioenergetic processes course in cells. The profound understanding of the intensity of energy conversion with mitochondria is given by complex approach including the investigation of the activity of respiratory chain enzymes, cytochrome content and the analysis of structural state of mitochondria internal membrane, this has stipulated the research aim to model carbon dioxide hypobiosis in rats.

An artificial hypobiotic state (within 2.5–3 hours) in rats was induced by Bakhmet'ev-Andjus-Gaja method of 'close tank'. The research objects were preparations of internal membrane of hepatocyte mitochondria. The activity of respiratory chain enzymes and cytochrome content in the membrane were determined spectrophotometrically by standard methods. Structural and dynamical properties of membranes were evaluated with 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) and pyrene. The changes in microviscosity of membrane lipid components were determined by the degree of eximerization of pyrene localized in the area of fatty acid chains of phospholipids. Conformational modifications of protein molecules in membranes were assessed by the efficiency of quenching with acrylamide of tryptophan fluorescence.

The development of hypobiosis is accompanied by ambiguous changes in the activity of respiratory chain enzymes of hepatocyte mitochondria: the enzyme activity of first links in coupling of respiratory chain (NADH-Q oxidoreductase and Q-cytochrome *c*-oxidoreductase) is slightly increased, while the activity of cytochrome *c*-oxidoreductase (coupling final link) is reduced by about 37%. Such changes are characteristic for content of functionally active cytochromes: content of cytochromes *b* and *c* increases and decreases in *a* group by 26% in average. Moreover the inhibition of ATP-synthetase activity of mitochondria has been shown.

By the method of fluorescent probes we have established the decrease in microviscosity of anular lipids of mitochondria internal membrane during hypobiosis. The changes in fluorescence parameters of membrane-connecting ANS indicate the modification of membrane surface (polar) sites. The results of tryptophan fluorescence measurement testify to the conformational changes of protein molecules.

Thus, inhibition of energy capacity of hepatocyte mitochondria during hypobiosis is stipulated by decreased functional activity of final link in the coupling of the respiratory chain and transfer of electrons from oxidation substrate, including, possibly as a result of structural modification of mitochondria internal membrane, as evidenced by the changes in orderliness of membrane lipid and protein components.