

**Влияние серусодержащего полихинона гипоксена на некоторые функции  
изолированных митохондрий печени крысы**

Е.В. Гришина, Я.В. Хаустова, А.М. Закаров, \* М.К. Кузьмич, Е.И. Маевский  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,  
\*ЗАО «Корпорация Олифен», Москва, Россия,

Гипоксия лежит в основе патогенеза многих заболеваний и являются неизбежным атрибутом ряда физиологических состояний, связанных с высокоинтенсивными нагрузками. Это обстоятельство стимулирует поиск новых антигипоксантов и изучение механизма действия уже известных своей активностью препаратов. Среди эффективных противогипоксических средств наше внимание привлек препарат гипоксен (ранее называемый олифен) [1, 2, 3], содержащий серусодержащий полихинон. Высокое значение окислительно-восстановительного потенциала гипоксена (по разным оценкам от 350 до 680 мВ) послужило основанием для предположения о том, что в основе механизма защитного действия гипоксена лежит его взаимодействие с дыхательной цепью митохондрий (МХ) в качестве акцептора восстановительных эквивалентов или шунта, наподобие менадиона (витамина К<sub>3</sub>). Однако отсутствие «разобщающего» эффекта на уровне МХ, выделенных из печени животных, которым вводился препарат [4], наряду со способностью гипоксена снижать температуру тела и уменьшать потребление кислорода животными, не может быть интерпретировано лишь с позиций представлений о влиянии шунтирующих дыхательную цепь веществ [5]. Шунтирование дыхательной цепи - обход реакций, связанных с генерацией электрохимического потенциала ионов водорода, и соответствующей пунктов аккумуляции энергии в виде ресинтеза АТФ или в других энергозависимых процессах, - должно вызывать частичную диссипацию энергии, увеличение теплопродукции и повышение потребления кислорода, то есть в эффекты, противоположные тем, которые описаны в экспериментах на животных, получавших гипоксен. Тем не менее, именно изучение *in vitro* влияния гипоксена на уровне изолированных МХ могло прояснить в некоторой мере ситуацию с возможным шунтированием дыхательной цепи гипоксеном. Другим, не альтернативным первой гипотезе, механизмом противогипоксического действия гипоксена может быть уменьшение генерации свободных радикалов или защита от их повреждающего действия при гипоксии и реоксигенации - эффект, известный для некоторых

соединений, имеющих хиноновую природу [6]. Тем более, что развитие окислительного стресса является одной из основных причин постгипоксического повреждения и гибели клеток и тканей [7]: в условиях недостатка кислорода образование активных форм кислорода (АФК) возрастает как в цитозоле, так и в МХ, особенно интенсивно при последующей реоксигенации [1,8]. И, наконец, известно, что значимым повреждающим фактором при гипоксии и реоксигенации является увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция. В связи с этим можно было предположить, что гипоксен уменьшает повреждающее действие повышенных концентраций ионов кальция. Эти предположения побудили нас к исследованию влияния гипоксена *in vitro* на дыхание и степень сопряжения окислительного фосфорилирования в изолированных МХ в присутствии добавленной гидроперекиси (моделирующей избыток АФК) и при моделировании гипоксического торможения дыхательной цепи ротеноном, который провоцирует генерацию АФК в МХ подобно гипоксическому воздействию [8-11]. Кроме того, исследовалось влияние гипоксена на кинетику аккумуляции ионов кальция и кальциевую емкость изолированных МХ.

#### **МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ**

МХ выделяли из печени крыс линии Wistar массой 200-250 г методом дифференциального центрифугирования по стандартной методике. Среда выделения содержала 0,3 М сахарозы, 10 мМ HEPES (рН 7,4). Дыхание МХ регистрировали полярографически с помощью закрытого кислородного электрода (Кларка) в термостатируемой ячейке объемом 1 мл при температуре 27°C и постоянном перемешивании. Среда инкубации содержала 125мМ КСl, 3 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 10 мМ HEPES (рН 7,4), 0,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,25 мМ ЭГТА (или без ЭГТА, как указано в подписях к рисункам). Концентрации добавляемых субстратов и кофакторов: 8 мМ 3-гидроксипурувата, 5 мМ сукцината, 5 мМ малата с 0,5 мМ пирувата, 5 мМ 2-оксоглутарат, 1 мМ NADH, 0.1 мМ цитохром С.

Кинетику аккумуляции ионов кальция регистрировали с помощью Са-селективного электрода. Концентрацию МХ белка определяли по методу Лоури.

Водный раствор гипоксена вносили в инкубационную среду перед добавлением суспензии МХ так, чтобы конечная концентрация гипоксена составляла 30 мкг на мл при концентрации МХ 2-4 мг белка в мл. Эффект гипоксена регистрировали сразу после его добавления к МХ или после преинкубации с МХ в присутствии гипоксена. Для моделирования влияния АФК в инкубационную среду с МХ вносили раствор гидроперекиси в конечной концентрации 98 –120 мкМ за 1,5 минуты до добавления

200 мкМ ADP. В экспериментах с ингибированием фосфорилирующего дыхания ADP добавляли в конечной концентрации 2 мМ и через 1 мин в инкубационную ячейку вносили ротенон (20-25 нМ на мг белка).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гипоксен не оказывал существенного влияния на дыхание изолированных МХ печени при окислении малата в присутствии пирувата. Однако при окислении 3-гидроксибутирата - NAD-зависимого субстрата, окисляющегося только до ацетоацетата и не вступающего в цикл Кребса, гипоксен вызывал торможение потребления кислорода, особенно выраженное в 4 состоянии - после фосфорилирования добавленного АДФ (табл.1). Одновременно наблюдалось увеличение дыхательного контроля (ДК), что отражает повышение степени сопряженности окислительного фосфорилирования в МХ. При окислении сукцината и 2-оксоглутарата добавка Гипоксена приводила к некоторому повышению потребления кислорода и скорости фосфорилирования АДФ.

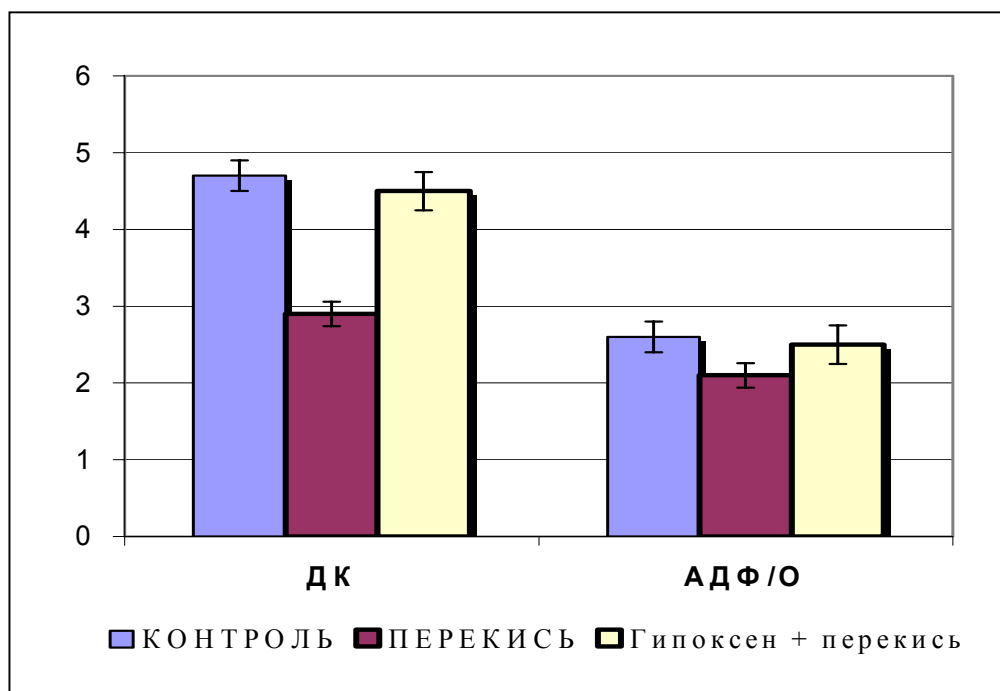
**Таблица 1.**

**Оценка влияния Гипоксена на дыхание МХ печени крысы.**

субстраты	V2	V3	V4	ДК	АДФ/О	Vфосф.
α-кетоглутарат контроль (n=11)	14,5 ± 1,1	68,6 ± 6,7	17,3 ± 1,7	4,05 ± 0,3	2,3 ± 0,2	150,7 ± 19,2
α-кетоглутарат +гипоксен (n=10)	15,1 ± 1,0	71,9 ± 6,1	17,6 ± 1,6	4,4 ± 0,3	2,3 ± 0,3	168,0 ± 29,0
сукцинат контроль (n=10)	26,6 ± 1,6	108,4 ± 6,4	34,1 ± 2,1	3,2 ± 0,1	1,23 ± 0,07	134,2 ± 12,2
сукцинат +гипоксен (n=10)	26,7 ± 1,6	119,2 ± 5,2	40,0 ± 3,6	3,1 ± 0,2	1,18 ± 0,08	141,0 ± 11,8
2-гидроксибутират (n=7)	12,3 ± 0,8	49,0 ± 1,5	21,4 ± 2,1	2,4 ± 0,1	1,9 ± 0,2	93,6 ± 13,1
2-гидроксибутират + гипоксен (n=8)	10,7 ± 0,8	45,7 ± 2,3	16,4* ± 1,6	3,0 ** ± 0,3	2,0 ± 0,2	89,3 ± 9,2

**Примечание.** \*P< 0,05, \*\* P< 0,1 при сравнении с соответствующим показателями в контроле и при инкубации с гипоксеном; V2, V3, V4,- соответственно скорости дыхания в 2, 3, 4 состояниях, выраженные в нг-ат О в мин. на мг белка МХ. ДК - дыхательный контроль по Чансу-Вильямсу – отношение V3 к V4.

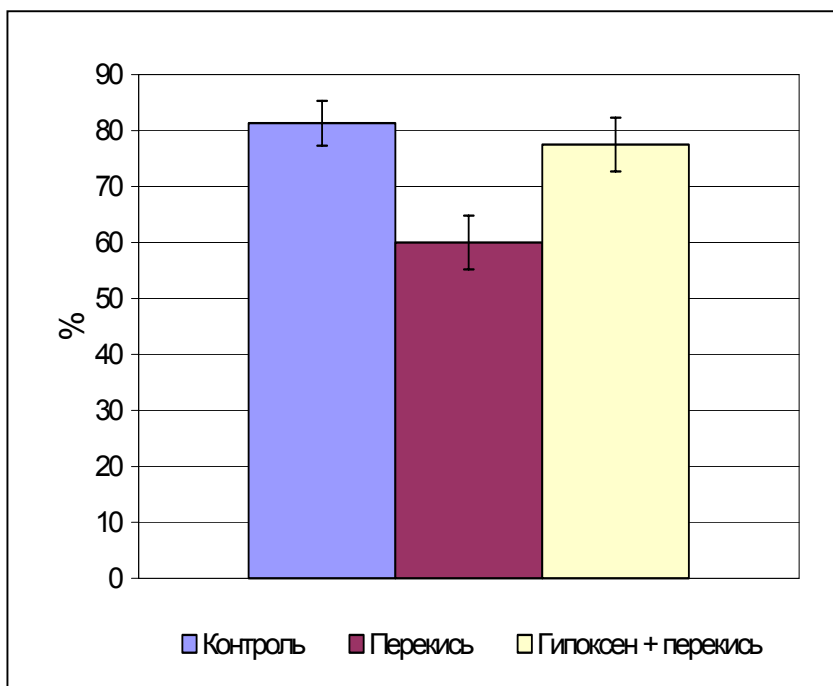
При моделировании повреждающего действия АФК на МХ путем добавления гидроперекиси фосфорилирующее дыхание регистрировали через 1,5 минуты инкубации с гидроперекисью после добавки 200 мкМ АДФ. Оказалось, что при окислении сукцината ни гидроперекись, ни гипоксен не влияли на параметры дыхания и фосфорилирования. При окислении 3-гидроксибутирата добавка гидроперекиси в концентрации 98-120 мкМ приводила к снижению ДК в среднем на 40 - 45%, в основном за счет увеличения скорости дыхания в состоянии 4, и к уменьшению отношения АДФ/О. Добавление раствора гипоксена (30 мкг на мл) в инкубационную среду перед внесением МХ (2 мг белка в мл) препятствовало разобщающему действию гидроперекиси при окислении 3-гидроксибутирата: на 94% восстанавливалась величина ДК, одновременно возрастало отношение АДФ/О (рис. 1). Таким образом, гипоксен препятствует повреждающему действию гидроперекиси на фосфорилирующее окисление в первом комплексе МХ - наиболее чувствительном к АФК участке дыхательной цепи.



**Рис. 1** Влияние гидроперекиси и гипоксена на ДК и АДФ/О митохондрий печени крысы. Добавки: 2-гидроксибутират – 8мМ, АДФ – 200мкМ, гидроперекись – 98-120 мкМ, гипоксен –30 мкг/мл, МХ-1-2 мг белка). P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub> приведено при сравнении с соответствующим показателями в контроле и при инкубации с гидроперекисью и гипоксеном, соответственно.

Известно, что повреждение NADH-дегидрогеназного комплекса дыхательной цепи МХ (например, в процессе старения при повреждении дыхательной цепи АФК) сопровождается снижением чувствительности дыхания к специфическому ингибитору – ротенону [12]. В наших экспериментах концентрацию ротенона подбирали таким

образом, чтобы скорость дыхания снижалась на ~80% при окислении 3-гидроксibuтирата во время фосфорилирования 2 мМ АДФ (не лимитированное акцептором фосфорилирующее дыхание). В таких условиях инкубация МХ с гидроперекисью в течение 1 минуты уменьшала ингибирующее действие ротенона до 60%. Предварительное внесение гипоксена в инкубационную среду на фоне той же концентрации гидроперекиси восстанавливало исходную величину ингибирующего действия ротенона (рис. 2).

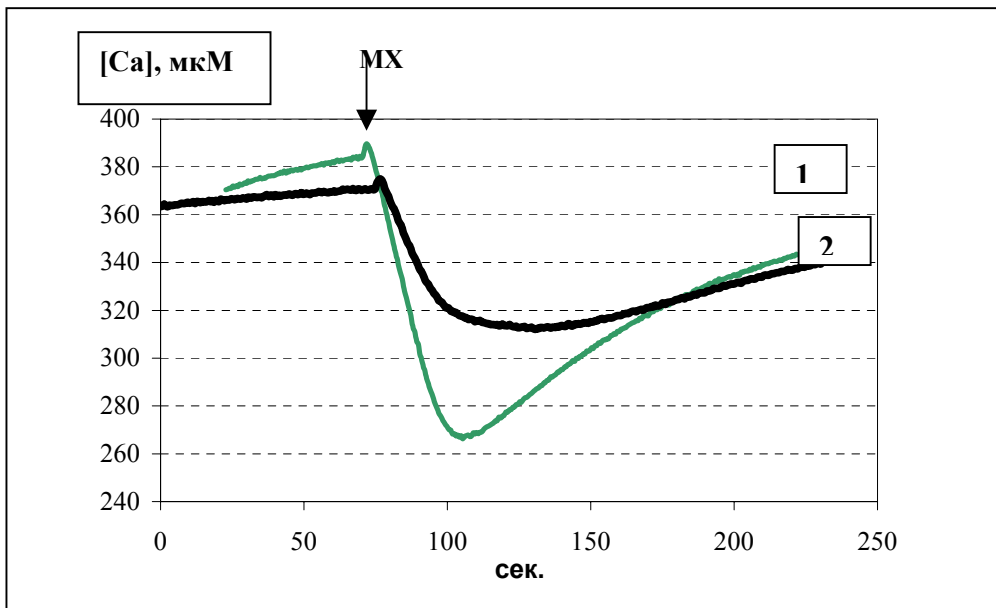


**Рис. 2. Процент ингибирования ротеноном фосфорилирующего дыхания МХ печени крысы при окислении 3-гидроксibuтирата.** Добавки: АДФ – 2мМ, ротенон – 20-25 нМ/мг белка, МХ-2мг белка.

Поскольку ротенон ингибирует именно сопряженный с аккумуляцией энергии поток восстановительных эквивалентов, который обеспечивает ресинтез АТФ и генерацию АФК, уменьшение чувствительности дыхательной цепи к ротенону под действием гидроперекиси указывает на диссипацию энергии: либо гидроперекись инициирует транспорт электронов по ротенон-нечувствительному пути, либо вызывает разобщение окислительного фосфорилирования. Восстановление гипоксеном чувствительности МХ к ингибированию ротеноном в присутствии гидроперекиси, наряду с показанным приростом АДФ/О и ДК свидетельствует о «энергосберегающем» сопрягающем эффекте гипоксена.

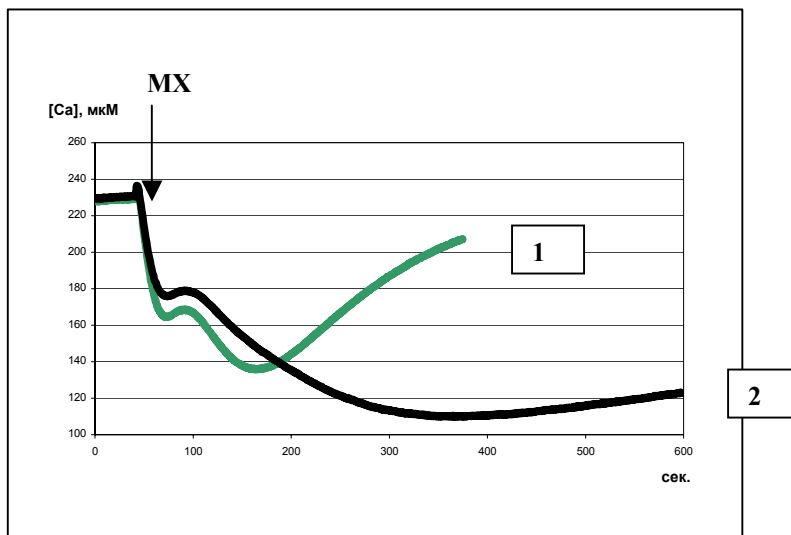
Как показано на рис. 3 преинкубация МХ с гипоксеном способствует торможению аккумуляции ионов кальция и одновременно повышает длительность удержания ионов кальция в МХ при окислении сукцината, в то время, как при

окислении 2-оксоглутарата преинкубация МХ с гипоксеном способствует существенному увеличению способности МХ удерживает аккумулированные ионы кальция.



**Рис.3 Кривая, характеризующая митохондриальный цикл: аккумуляцию, удержание и выход ионов кальция из МХ при окислении сукцината.**  
 Среда инкубации: 155 мМ сахарозы, 2,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 4мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> / К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> (рН 7,4). Субстрат окисления – 5 мМ сукцината. Стрелкой показано внесение в кювету суспензии МХ (1мг).

1 – кальциевый цикл после преинкубации МХ при 0°С в СИ; 2 - кальциевый цикл после преинкубации МХ при 0°С с гипоксеном (30мкг/мл). Время преинкубации 6 мин.



**Рис.4 Кривая, характеризующая митохондриальный цикл: аккумуляцию, удержание и выход ионов кальция из МХ при окислении 2-оксиглутарата и малата.**

Среда инкубации: 155 мМ сахарозы, 2,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 4мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> / К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> (рН 7,4). Субстрат окисления – 5 мМ 2-оксиглутарата и 2,5 мМ малата.

Стрелкой показано внесение в кювету суспензии МХ (1мг).

**1** – кальциевый цикл после преинкубации МХ при 0°C в СИ; **2** - кальциевый цикл после преинкубации МХ при 0°C с гипоксеном (30мкг/мл). Время преинкубации 1 мин.

Представленные данные свидетельствуют о том, что составными компонентами механизма противогипоксического действия гипоксена на уровне МХ могут быть следующие факторы: защита I комплекса дыхательной цепи от повреждающего, в частности разобщающего, действия гидроперекиси, повышение степени сопряжения окислительного фосфорилирования, снижение способности МХ аккумулировать избыточные количества ионов кальция и более стабильное удержание аккумулированных ионов кальция.

Работа поддержана грантом РФФИ: 04-04-97279, 2004г. Научоград.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Медведев Ю.И., Толстой А.Д.// Гипоксия свободные радикалы в развитии патологических состояний организма, М., 2000, 227 с.
2. Смирнов В.С., Кузьмич М.К.// кн. Гипоксен, СПб-М., 2001 г, 193 с.
3. Александрова А.Е., Енохин С.Ф., Медведев Ю.В. //В сб. Гипоксия. Механизмы, адаптация, коррекция. Материалы 2-ой Всероссийской конф., М, 1999. С. 5.
4. Лукьянова Л.Д.//В монографии "Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты": Ред. Л.Д. Лукьянова, И.Б. Ушаков., М., Воронеж, 2004. С. 8-50.
5. Скулачев В.П.// кн. Энергетика биологических мембран, М. Наука, 564 с.
6. James A.M., Cocheme H.M, Smith R.A.J., Murphy M.P.// Journal of Biological Chemistry 2005. Vol. 280. N 22. P 21295-21312.
7. Papa S., Skulachev V.P.//Molec. Cell. Biochem. 1997. Vol. 174. P. 305-319.
8. Turrens J.F.//J Physiol 2003. Vol. 552. N. 2. P. 335-344.
9. Vanden Hoek T. L., Shao Z., Li C., Schumacker P. T., Becker L. B. //Journal of Molecular and Cellular Cardiology 1997. Vol. 29. N 9. P. 2441-2450.
10. Becker LB, vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. //Am J Physiol 1999. Vol 277 (6 Pt 2). H2240-246.
11. Veitch K, Hombroeckx A, Caucheteux D, Pouleur H, Hue L// Biochem. J 1992. Vol. 281. P. 709-715.
12. Lenaz G., D Aurelio M., Merlo Pich M., Genova M.L., Ventura B., Bovina C., Formigini G, G. Parenti Castelli // BBA 2000. Vol. 1459. P. 397-404.