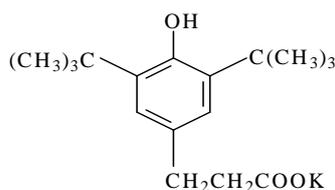


ВЛИЯНИЕ ФЕНОЗАНА КАЛИЯ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ

Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4 . E. mail: zhigacheva@mail.ru

Митохондрии, являясь одним из регуляторов энергетического метаболизма, играют важную роль в ответе организма на стрессовые воздействия. Приблизительно 1-3% потребляемого митохондриями кислорода в результате 1 или 2 электронного восстановления образует активные формы кислорода (АФК). В физиологических состояниях антиоксидантная система нейтрализует излишнюю продукцию АФК и поддерживает их концентрацию на довольно низком пикомолярном уровне [1]. Сдвиг антиоксидантно - прооксидантного соотношения в сторону увеличения продукции АФК приводит к развитию окислительного стресса. Можно предположить, что основным свойством препаратов, обладающих адаптогенной активностью, является снижение продукции активных форм кислорода (АФК), а, следовательно, и снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в биологических мембранах. Поскольку известно, что пространственно-затрудненные фенолы в большинстве случаев обладают антиоксидантными свойствами в качестве объекта исследования был выбран фенозан калия (калиевая соль 2,6-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-пропионовой кислоты).



Фенозан калия

Для активации ПОЛ использовали модель «старения» - инкубацию митохондрии печени в солевой среде.

Материалы и методы

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [2]. Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 минут, второе – при 9000 g , 10 минут. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань: среда – 1:0.25. Среда выделения: 0,25 М сахараза, 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4.

Скорости дыхания митохондрий из печени крыс регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий печени содержала : 0.25 М сахарозу, 10 мМ трис-НCl, 2 мМ MgSO₄, 2 мМ КН₂Р₀₄, 10 мМ КCl (рН 7.5) (28°С).

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [3]. Липиды экстрагировали из 3–5 мг митохондриального белка смесью хлороформ : метанол = 2 : 1 (по объему). Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1: 10. Митохондрии гомогенизировали в течение 1 мин при температуре 10°С. Затем к смеси добавляли равный объем дистиллированной воды, быстро смешивали и переносили в 12 мл центрифужные стаканы. (Промывание водой необходимо для удаления флавиновых компонентов, имеющих максимум флуоресценции в области 520 нм). Центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Отбирали 3 мл нижнего (хлороформного) слоя и добавляли 0,3 мл метанола. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания –

420-470 нм Результаты выражали в относительных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка.

Метилвые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом суммарной фракции липидов мембран митохондрий [4] или с помощью одностадийного метилирования жирных кислот, исключая экстракцию липидов [5]. МЭЖК очищали методом тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинах с силикагелем. Для количественного контроля процедуры метанолиза использовали внутренний стандарт - пентадекан. Метилвые эфиры ЖК экстрагировали гексаном и анализировали полученные растворы.

Идентификацию МЭЖК проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) и по величинам индексов удерживания [6]. ГХ-МС осуществляли на хроматомасс-спектрометре Hewlett-Packard-6890 с масс-селективным детектором HP-5972. МЭЖК разделяли на капиллярной колонке HP-5MS (30 м × 0,25 мм, слой фазы 0,25 мкм) при программировании температуры от 60 до 285 °С со скоростью 5°С/мин. Температура испарителя – 250°С, детектора – 280°С. Масс-спектры получали, в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 eV и скорости сканирования 1 сек, на декаду масс в области 40-450 аеи.

Количественный анализ метилвых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе "Кристалл 2000М" (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой SPB-1 (50 м × 0,32 мм, слой неполярной фазы 0,25 мкм). Анализ МЭЖК проводили при программировании температуры от 120 до 270° С со скоростью 4°С/мин. Температура инжектора и детектора - 270°С; скорость газа-носителя гелия 1,5мл/мин. Анализировали по 2 мкл гексановых растворов. Количественное содержание МЭЖК в образцах рассчитывали по отношению площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующим найденным метилвым эфирам ЖК.

В экспериментах по изучению устойчивости животных (белых мышей и крыс) к стрессовым воздействиям моделировали гемическую, гипобарическую, цитотоксическую гипоксии, острое алкогольное отравление. Исследовали также устойчивость мышей к сочетанному действию физической нагрузки и низкотемпературному стрессу.

Модель гипобарической гипоксии – белых мышей (самцы, вес 25 г.) помещали в стеклянную барокамеру, соединенную с вакуумным насосом и создавали в камере разряжение, соответствующее высоте 11,5 тысяч метров над уровнем моря. Скорость подъема 100 м/сек.

2. **Модель цитотоксической гипоксии.** Мышам внутрибрюшинно вводили азид натрия в дозе 20 мг/кг.

3. **Модель гемической гипоксии.** Мышам внутрибрюшинно вводили нитрит натрия в дозе 250 мг/кг.

4. **Модель сочетанного действия низкотемпературного стресса и мышечной нагрузки.** Мышам привязывали 500 мг грузики и помещали в ванну с температурой 2°С.

5. **Модель острого алкогольного отравления.** Мышам подкожно вводили этанол в дозе 140 мг/кг.

6. **Модель острой гипобарической гипоксии** - в барокамере создавали разряжение, соответствующее высоте 9,0 тысяч метров над уровнем моря. «Подъем» крыс проводили в первую минут до 5 тыс. м., а в каждую последующую еще на одну тысячу метров (Время нахождения крыс «на высоте» 9,0 тысяч метров над уровнем моря –10,0 минут).

Всем опытным животным за 45 минут до воздействия внутрибрюшинно вводили исследуемый препарат в выбранной дозе

Результаты и обсуждение

Инкубация митохондрий в гипотоническом растворе KCl вызывала слабое набухание митохондрий, что согласуется с данными *Earnshaw M. J., Truelove B., 1968*. Чтобы усилить этот эффект мы ввели в среду инкубации неорганический фосфат, также вызывающий набухание митохондрий [7-9]. В результате усиливалась генерация АФК митохондриями, что приводило к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). При этом

интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ возрастала в 3-4 раза. Введение препарата фенозана калия в среду инкубации митохондрий приводило к снижению флуоресценции продуктов ПОЛ, и это снижение зависело от концентрации фенозана калия в среде инкубации. Препарат в концентрации 10^{-5} ; 10^{-6} и 10^{-7} М оказывал слабое воздействие на интенсивность перекисного окисления липидов. В концентрациях 10^{-8} - 10^{-16} и 10^{-18} - 10^{-22} М фенозан калия снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольного уровня (рис.1).

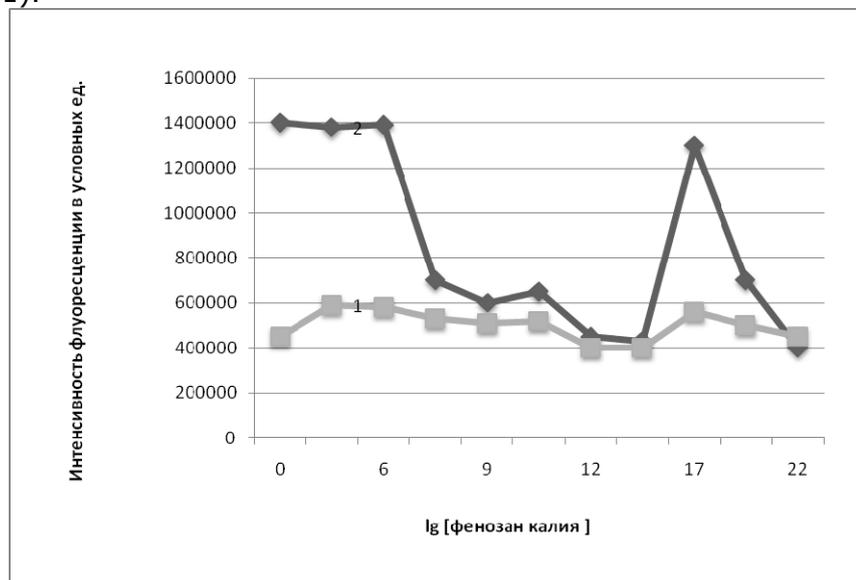


Рис 1. Интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс в присутствии различных концентраций. По оси ординат интенсивность флуоресценции/мг белка, по оси абсцисс – концентрация фенозана калия в М. Условные обозначения: 1-контроль; 2-«старение»

Дозовая зависимость проявлялась и во влиянии фенозана калия на скорости транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий при окислении NAD-зависимых субстратов. Препарат в концентрациях, снижающих интенсивность процессов ПОЛ до контрольных величин, повышал скорости окисления NAD-зависимых субстратов (рис.2). При этом скорости окисления NAD-зависимых субстратов в присутствии АДФ возрастали на 10-15% и на 18-21% - в присутствии разобщителя. Полученные данные позволяют предположить, что наиболее эффективное использование препарата возможно в концентрационном интервале 10^{-9} - 10^{-14} М.

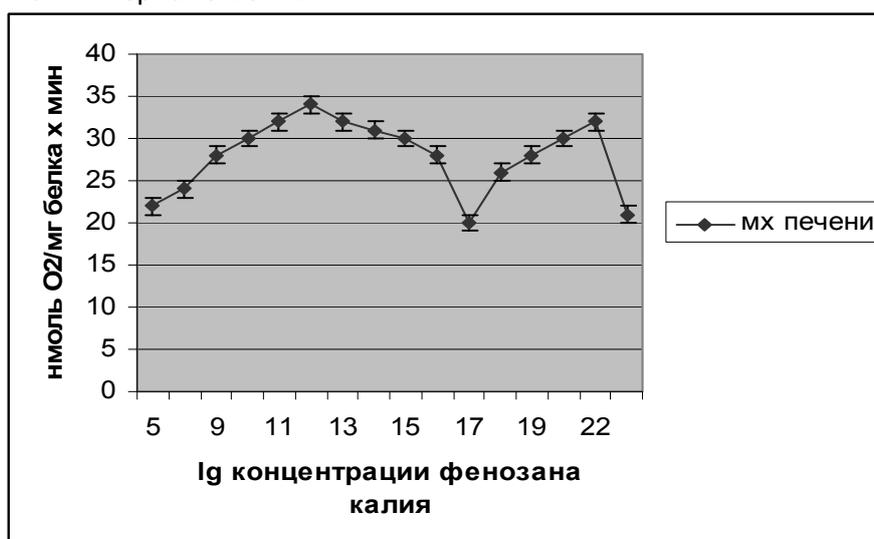


Рис.2. Влияние фенозана калия на скорости дыхания митохондрий печени . В среде инкубации митохондрий печени 4мМ глутамат, 1мМ малат, рН 7,5. Дополнительные добавки 10^{-6} М FCCP(карбонилцианид-п-трифторметоксибензилгидразон)

Действительно, уже через 1 час после введения крысам препарата в дозе 10^{-14} М происходило увеличение содержания ненасыщенных и снижение содержания насыщенных жирных кислот в мембранах митохондрий печени (таблица 1).

Таблица 1. ВЛИЯНИЕ ФЕНОЗАНА КАЛИЯ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС (представлены результаты шести опытов). Здесь и в последующих таблицах $M \pm m$

Группа	Относительное содержание жирных кислот в %.				
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
Контроль	24,6±0,7	2,5±0,1	18,9±0,3	11,4±0,3	15,0±0,4
Фенозан калия 1 час после инъекции	16,5±0,3	1,4±0,1	14,6±0,5	8,9±0,1	18,5±0,1
Фенозан калия 3 часа после инъекции	18,4±0,3	2,2±0,6	14,5±0,7	6,9±1,0	26,5±1,7
Группа	Относительное содержание жирных кислот в %.				
	18:3	20:4	Неидентифицированные	K ₁	K ₂
Контроль	4,1±1,3	22,0±0,7	1,5±0,20	1,27±0,10	1,67±0,30
Фенозан калия 1 час после инъекции	14,8±0,2	23,6±0,2	1,7±0,10	2,16±0,06	2,90±0,10
Фенозан калия 3 часа после инъекции	12,2±0,9	18,0±0,5	1,3±0,5	2,00±0,01	3,20±0,40

Содержание стеариновой кислоты уменьшалось в 1,3 раза, пальмитиновой – в 1,5 раза. В это же время содержание линолевой и линоленовой кислот увеличивалось в 1,2; 3,6 раза соответственно. В результате отношение ненасыщенных кислот к насыщенным (коэффициент K₁) возрастало с 1,27±0,10 до 2,16±0,06. Соотношение же суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот с 18 углеродными атомами к стеариновой кислоте (коэффициент K₂) возрастало в 1,7 раз. Сходные изменения жирнокислотного состава мембран митохондрий наблюдались при адаптации животных к холоду в работе *Спиридоновой В.А с соавторами* [10]. Через 3 часа в суммарной фракции липидов мембран митохондрий процентное содержание насыщенных жирных кислот оставалось сниженным, а ненасыщенных даже несколько возрастало. Рост содержания ненасыщенных жирных кислот с 18 углеродными атомами в липидах мембран митохондрий, возможно, оказывал влияние максимальные скорости окисления NAD-зависимых субстратов.

Действительно, между коэффициентом ненасыщенности C₁₈ жирных кислот в мембранах митохондрий ($\Sigma \text{ненасыщенные } C_{18} \text{ жирные кислоты} / C_{18:0}$) и максимальными скоростями окисления NAD-зависимых субстратов наблюдалась корреляция с коэффициентом корреляции $r = 0,76489$ (рис. 3). Взаимосвязь между коэффициентом ненасыщенности жирных кислот с 18 углеродными атомами и максимальными скоростями окисления NAD-зависимых субстратов, вероятно, обусловлена содержанием линолевой кислоты – одной из основных ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина, обеспечивающего эффективную работу дыхательной цепи митохондрий за счет образования суперкомплексов дыхательных переносчиков [11].

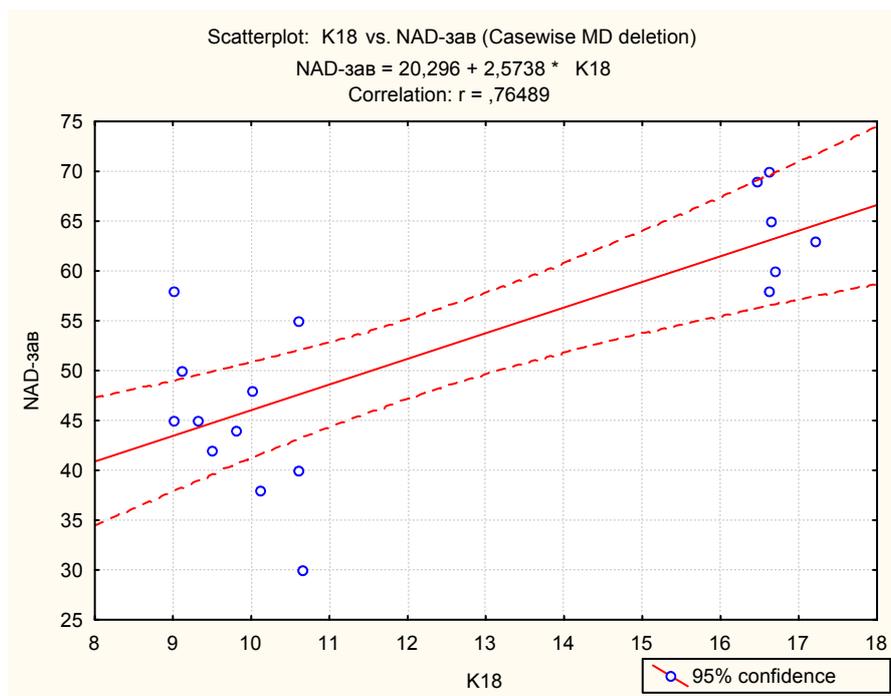


Рис. 3. Корреляция между коэффициентом ненасыщенности C_{18} жирных кислот и максимальными скоростями окисления NAD-зависимых субстратов
По оси ординат – максимальные скорости окисления NAD-зависимых субстратов; по оси абсцисс коэффициент ненасыщенности C_{18} жирных кислот

Это предположение согласуется с данными, полученными *Paradies G.* с соавторами [2004] показавшими наличие тесной корреляции между снижением содержания кардиолипина в субмитохондриальных частицах из сердца быка и потерей активности I комплекса дыхательной цепи [11].

Основываясь на этих данных можно предположить, что препарат в данной концентрации будет оказывать защитный эффект при стрессовых воздействиях за счет предотвращения снижения содержания в липидах мембран ненасыщенных жирных кислот с 18 углеродными атомами.

Изучение протекторных свойств препарата проводили на модели острой гипобарической гипоксии. Острая гипобарическая гипоксия (ОГГ) приводила к 25% снижению максимальных скоростей окисления NAD-зависимых субстратов. При этом уменьшалась и эффективность окислительного фосфорилирования: дыхательный контроль по Чансу снижался с $3,51 \pm 0,04$ до $2,27 \pm 0,03$. Внутривенная инъекция 10^{-6} М фенозана калия за 45 минут до стрессового воздействия предотвращала изменения биоэнергетических характеристик митохондрий печени, обусловленных острой гипобарической гипоксией (таблица 2).

Таблица 2. ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И ФЕНОЗАНА КАЛИЯ НА СКОРОСТИ ОКИСЛЕНИЯ NAD-ЗАВИСИМЫХ СУБСТРАТОВ (Скорости окисления представлены в нг молях O_2 /мг. белка мин). (Число экспериментов – 10).

Группа	V_0	V_3	V_4	V_3/V_4	FCCP
Контроль	$6,5 \pm 1,4$	$28,1 \pm 1,1$	$8,0 \pm 0,4$	$3,51 \pm 0,04$	$27,5 \pm 1,0$
ГГ	$7,3 \pm 1,2$	$21,2 \pm 1,6$	$9,3 \pm 0,2$	$2,27 \pm 0,03$	$19,4 \pm 2,0$
ГГ+ Фенозан калия	$8,3 \pm 1,6$	$28,4 \pm 1,3$	$7,8 \pm 0,7$	$3,62 \pm 0,07$	$32,4 \pm 2,5$

Среда инкубации: содержала 0.25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, 2 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, 10 мМ KCl, pH 7.5. Дополнительные добавки: 200 мкМ ADP, 10^{-6} М FCCP (карбонилцианид-р-трифторметоксифенилгидразон), 4 мМ глутамат, 1 мМ малат.

Таблица 3. ПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕНОЗАНА КАЛИЯ. (Представлены результаты 10 опытов)

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	Фенозан калия 10^{-14} М
Подъем на высоту 11,5 тыс. м (гипобарическая гипоксия)	Время жизни в минутах % выживших	4.0±1.1 20%	15.0± 2.8 50%
Инъекция азидата натрия 20 мг/кг (цитотоксическая гипоксия)	Время жизни в минутах % выживших	3.0±0.6 0%	11.0±1.1 50%
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг (гемическая гипоксия)	Время жизни в минутах % выживших	15.1±2.5 20%	53.5±3.0 60%
Плавание с грузом при температуре 2° С (низкотемпературный стресс в сочетании с мышечной нагрузкой)	Время жизни в минутах % выживших	3.2±0.6 0%	14.3±2.4 0%

Изменения в функциональных характеристиках митохондрий влияли и на физиологические показатели. В таблице 3 представлены данные по влиянию фенозана калия на устойчивость мышечной ткани к гипоксии и низкотемпературному стрессу. Видно, что внутрибрюшинная инъекция 10^{-14} М фенозана калия в 3,5-4,5 раз увеличивала продолжительность жизни и на 20-30% повышала выживаемость мышечной ткани при этих стрессовых воздействиях.

Протекторная активность препарата, по-видимому, обусловлена снижением интенсивности процессов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий, что предотвращает снижение процентного содержания ненасыщенных жирных кислот в липидах мембран, а, следовательно, препятствует снижению содержания кардиолипина, играющего важнейшую роль в биоэнергетических функциях митохондрий. Именно этот фосфолипид определяет активность переносчиков, включая анионные каналы и компоненты электрон-транспортной цепи митохондрий [11]. Он необходим для нормального функционирования I комплекса дыхательной цепи [11]. Фенозан калия предотвращая снижение содержания в липидах мембран митохондрий ненасыщенных жирных кислот с 18 углеродными атомами, главным образом линолевой кислоты, обеспечивает сохранение высокой активности NAD-зависимых дегидрогеназ.

Отметим, что дискретный характер полученных концентрационных зависимостей действия малых доз препарата в наших экспериментах качественно сходен с ранее опубликованными данными о действии сверхмалых доз биологически активных соединений [БАВ] на живые системы разной степени сложности [12,13]. В настоящее время действие сверхмалых доз биологически активных веществ объясняют по-разному: концентрированием биологически активного вещества, наличием высокоэффективных систем проведения и усиления рецепторного сигнала, адаптацией рецепторов к действию сверхмалых концентраций БАВ [13-15].

Наиболее вероятным, по-нашему мнению, объяснением феномена «перемены знака» эффекта препарата на интенсивность ПОЛ и энергетику митохондрий является образование наноассоциатов различной уровня сложности в зависимости от концентрации фенозана калия в растворе [16].

Литература

1. Boveris A, Cadenas E.. Cellular sources and steady-state of reactive oxygen species.// In: Oxygen, gene expression and cellular function. Clerch L and Massaro D, Eds. pp. 3–27. Marcel Dekker, New York
2. Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. Activation of external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats.// BBA, 1977, V. 501, P. 415-423
3. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues // Anal. Biochem. 1973, V. 52, P. 1–9.
4. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of macroscale method to the microscale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts // J. Chromatogr. 1979, V. 151, P. 384–390.
5. Wang J., H. Sunwoo, G. Cherian, I.S. Sim. Fatty acid determination in chicken egg yolk. A comparison of different methods// Poultry science 2000, V.79, P. 1168-1171
6. Golovina R.V., T.E. Kuzmenko. Thermodynamic evaluation interaction of fatty acid methyl esters with polar and non-polar stationary phases, based on their retention indices chromatographia// Chromatogr., 1977, V.10(9), P. 545-546.
7. Earnshaw M. J., Truelove B. Swelling and contraction of Phaseolus hypocotyls mitochondria// Plant Physiol., 1968, V.43, P.121-129
8. Kowaltowski A. J., Castilho R. F, Grijalba M. T., Bechara E. J. H , Vercesi AE. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alteration mediated by Ca²⁺ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation// Biological Chemistry 1996, V.271 (6), P.2929-2934.
9. O'Rourke B. Mitochondrial Ion Channels//Annual Review of Physiol., 2007, V.69, P.19-49
10. Спиридонова В.А., Агуреев А.П., Юськович А.К. Увеличение активности фосфолипазы A₂ в ткани печени при адаптации к холоду и внешний путь окисления НАДН.// Научн.докл. высш. школы. Биол. науки, 1982, №3, С. 16-21.
11. Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart. Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin// Circulation Research. 2004, V. 94, P. 53-59
12. Ашмарин И.П., Е. П. Каразеева, Т. В. Лелекова. Эффективность ультрамалых доз эндогенных биорегуляторов и иммуноактивных соединений//. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2005, 3, С. 109-116
13. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты / под общей ред. А.Б. Рубина. М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2007, С. 390–423
14. Булатов В.В., Хохоев Т.Х., Дикий В.В., Заонегин С.В., Бабин В.Н. Проблема малых и сверхмалых доз в токсикологии. Фундаментальные и прикладные аспекты.// Российский хим. журнал, 2002, Т. 46 (6), С. 58-62
15. Ерохин В.Н., Кременцова А.В., Семенов В.А., Бурлакова Е.Б. Влияние антиоксиданта – β- (4-гидрокси-3,5-дитретбутилфенил)пропионовой кислоты (фенозана) на развитие злокачественных новообразований // Изв. РАН. Сер. биол. 2007. № 5. С. 583–590.
16. Рыжкина И.С. Л. И. Муртазина, Ю. В. Киселева, Коновалов А.И. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ// Доклады Академии наук, 2009, Т. 428(4), С. 487–491