



УДК 577.18:577.23

© 2012

А. П. Бурлака, О. Б. Кучменко, І. І. Ганусевич, С. М. Лукін,
Є. П. Сидорик, Д. М. Петухов, Н. В. Делеменчук,
член-кореспондент НАН України Г. В. Донченко

Протекторний вплив активації біосинтезу убіхінону на функціонування ланцюга транспорту електронів мітохондрій клітин органів щурів при введенні доксорубіцину

За дії на організм тварин доксорубіцину виявлено пошкодження ланцюга транспорту електронів у мітохондріях, про що свідчить утворення триплетних структур з $g = 2,007$ в спектрах ЕПР. Ці пошкодження можуть служити маркером токсичності доксорубіцину і мішенню для здійснення терапевтичних впливів. При цьому встановлено зниження ефективності функціонування детоксикаційної системи клітин. Показано захисний ефект комплексу ЕПМ (α -токоферилацетат, 4-оксисбензойна кислота, метіонін) щодо мітохондрій і ендоплазматичного ретикулума клітин органів за токсичних впливів доксорубіцину. Виявлено зниження рівня убісеміхінону — радикальної форми убіхінону — в органах тварин, яким вводили доксорубіцин в терапевтичній дозі.

В останні роки активно досліджуються механізми виникнення дисфункцій мітохондрій та пов'язане з цими процесами наростання швидкості генерування супероксидних радикалів і радикалів оксиду азоту в соматичних клітинах та активація генерування цих молекул лейкоцитами, лімфоцитами, тромбоцитами через визнання їх ролі в етіології ряду патологій, зокрема серцево-судинних і онкологічних. Причиною виникнення окисних пошкоджень є не сам процес генерування активних форм кисню (АФК), а порушення механізмів регуляції їх утворення та елімінації. Механізм цих явищ до кінця не з'ясовано. Тому дослідження механізму виникнення дисфункції мітохондрій, окисного стресу та розробка нових стратегій регуляції цих процесів є актуальним завданням сучасної медицини [1, 2]. Доксорубіцин, антибіотик антрациклінового ряду, є ефективним антинеопластичним агентом, використання якого обмежується високою токсичністю по відношенню до печінки, серця та інших органів [3]. Показано, що застосування антиоксидантів (наприклад, вітаміну Е, убіхінону (CoQ)) може сприяти підвищенню антинеопластичної активності доксорубіцину за рахунок зменшення рівнів АФК, продукованих мітохондріями. Крім того, при застосуванні антиоксидантів зменшувалися інші токсичні ефекти від прийому доксорубіцину [3, 4]. CoQ відіграє

центральну роль у біоенергетичних процесах, є важливим жиророзчинним антиоксидантом тощо [5, 6]. При порушенні регуляції та рівня біосинтезу CoQ його кількість, що надходить з їжею, не може повністю забезпечити ним фізіологічні потреби організму ссавців, особливо за умов розвитку чи наявності патологій, що пов'язані з порушенням біоенергетичного обміну організму [5, 6].

У зв'язку з вищесказаним метою роботи було дослідження стану компонентів ланцюга транспорту електронів (ЛТЕ) у мітохондріях та швидкості генерування супероксидних аніон-радикалів і оксиду азоту в тканинах печінки і серця щурів за умов введення доксорубіцину та дії комплексу попередників і модуляторів біосинтезу CoQ.

Матеріали і методи. У досліджах використовували щурів-самців масою 180–220 г. Тварин було поділено на три групи: 1 — контрольні (інтактні) тварини; 2 — тварини, яким вводили доксорубіцин; 3 — тварини, яким на фоні введення доксорубіцину вводили α -токоферилацетат, 4-оксibenзойну кислоту (ПОБК) і метіонін (комплекс ЕПМ).

Доксорубіцин (доксорубіцин-КМП, доксорубіцину гідрохлорид, ВАТ “Київмедпрепарат”, Україна) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 2,2 мг/кг маси тіла щоденно протягом 8 днів [7, 8]. Щурам контрольної групи вводили фізіологічний розчин у такому ж об'ємі. Біологічно активні сполуки тварини отримували перорально протягом 8 днів паралельно з введенням доксорубіцину. Тварин декапітували з урахуванням вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами. У мітохондріях печінки визначали активність сукцинат- і NADH-убіхінон-оксидоредуктазних систем [9, 10], цитохромоксидазну активність [11]. Білок визначали методом Лоурі [12]. Ступінь пошкодження компонентів електронтранспортного ланцюга мітохондрій, рівень швидкості генерування супероксидних радикалів та оксиду азоту оцінювали методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) на комп'ютеризованому спектрометрі PE-1307. Для визначення рівня генерування NO NO-синтазами використовували спіновий уловлювач — діетилдитіокарбамат, а реєстрацію проводили при температурі рідкого азоту (77 К). Швидкість генерування супероксидних радикалів визначали із застосуванням спінового уловлювача — 4-гідрокси-2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-оксил при кімнатній температурі [13]. Отримані результати оброблені за допомогою методів варіаційної статистики. Числові дані наведені у формі середньої величини зі стандартною похибкою ($M \pm m$). Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стьюдента (t).

Результати дослідження. Спектри ЕПР тканини печінки щурів досліджуваних груп наведено на рис. 1. В отриманих спектрах ЕПР контрольної тканини печінки основний внесок роблять Fe-S-білки N-1b, N-2, N-3, N-4, N-5, S-1, Fe-S Rieske. Такий вигляд, інтенсивність та співвідношення сигналів ЕПР у спектрі характеризує функціональний стан мітохондрій контрольної тканини печінки. Спектр ЕПР тканини печінки тварин, яким вводили доксорубіцин, має відмінності, які можна трактувати як зсув у редокс-стані мітохондрій у бік окиснення, яке характеризується зниженням активності одних центрів, інтенсифікацією інших та зростанням рівнів утворення супероксидних аніон-радикалів та NO. Спостерігається зниження ефективності функціонування NADH-убіхінон-оксидоредуктазного комплексу, зокрема його Fe-S-білків N-2, N-1b. Fe-S-білок N-2 є критично важливим компонентом процесу трансформації енергії в I пункті спряження окиснення та фосфорилування в ЛТЕ, при пошкодженні якого повністю втрачається здатність мітохондрій синтезувати АТФ, а кисень відновлюється до супероксидних аніон-радикалів. Крім того, у спектрі ЕПР цієї тканини виявляється новий сигнал з $g = 2,02$, що характеризує Fe-S-білок S-3, який функціонує в сукцинатдегідрогеназі, активність якого зростає при пошкодженні комплексу

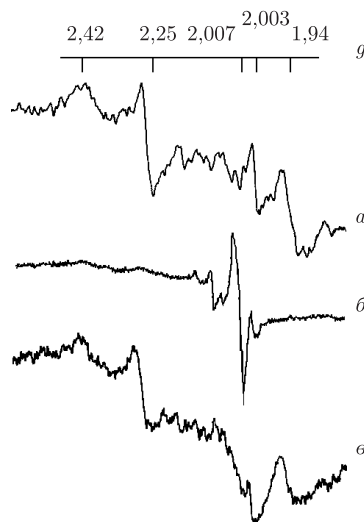


Рис. 1. Спектри ЕПР тканин печінки: *a* — інтактних тварин; *б* — тварин, яким вводили доксорубіцин; *в* — тварин, яким вводили доксорубіцин та комплекс ЕПМ



Рис. 2. Спектри ЕПР тканин серця: *a* — інтактних тварин; *б* — тварин, яким вводили доксорубіцин; *в* — тварин, яким вводили доксорубіцин та комплекс ЕПМ

су І Гріна та розвитку компенсаторних процесів шляхом переключення мітохондрій на гліколітичний шлях синтезу АТФ. Окиснення залізо-сірчаних білків N-комплексу відбувається при частковому блокуванні початкової ділянки ЛТЕ перед Fe-S-білком N-1b та/або зменшенні швидкості метаболічних процесів, таких як реакції циклу Кребса і окиснення жирних кислот, а також при суперкомпенсації енергозатрат при ліполізі [2].

Аналіз одержаних спектрів ЕПР (рис. 1, 2) показує, що характерною ознакою тканини печінки, серця та інших паренхіматозних органів тварин, які отримували доксорубіцин у терапевтичній дозі, є утворення триплетного сигналу ЕПР з $g = 2,007$, зниження активності центру N-2 в NADH-CoQ-оксидоредуктазі мітохондрій та зростання рівня сигналу ЕПР з $g = 2,03$, який характеризує утворення комплексів NO з негемовими білками, зниження активності цитохрому P-450 у системі детоксикації мікросом клітини ($g = 2,25; 2,42$),

зниження рівня убісеміхінону в мітохондріях ($g = 2,003$). Описані вище зміни в ЛТЕ мітохондрій і в мікросомах призводять до втрати мітохондріями здатності синтезувати АТФ і переключення на генерування супероксидних аніон-радикалів (див. рис. 1, 2).

Застосування в протекторних цілях комплексу ЕПМ приводить до відновлення транспорту електронів по ЛТЕ мітохондрій, що супроводжується відновленням структури спектрів ЕПР та зниженням рівня генерування супероксидних радикалів мітохондріями. У спектрах ЕПР органів тварин не реєструється триплетний сигнал ЕПР ($g = 2,007$), зростає рівень сигналу ЕПР від FeS-центру N-2 в NADH-CoQ-оксидоредуктазі. Інтенсивність триплетного сигналу ЕПР відповідає рівню комплексів NO-FeS-білок, утворених при взаємодії оксиду азоту з FeS-білками дихального ланцюга мембран мітохондрій, зокрема з білками N і S кластерів у NADH-убіхінон-оксидоредуктазі. Високі рівні комплексів NO з FeS-білками в мітохондріях клітин є ознакою вираженості окисної реактивності клітин, що може призвести до формування клітинної гіпоксії.

Триплетні структури з $g = 2,007$ у спектрах ЕПР відображають ступінь пошкодження комплексів електронтранспортного ланцюга мембран мітохондрій (див. рис. 1, 2) [2]. Вираженість змін сигналів у спектрах ЕПР корелює з рівнем продукування оксиду азоту. Кінетику формування сигналу ЕПР з триплетною структурою за $g = 2,007$ використовують як молекулярний маркер злоякісної трансформації клітин [2]. Звертає на себе увагу те, що в наших дослідженнях спостерігаються подібні зміни в ЛТЕ мітохондрій, хоча тварини не мали пухлин.

Пошкодження компонентів ЛТЕ мітохондрій за дії доксорубіцину пов'язане з активацією синтезу NO мітохондріальною NOS та утворенням комплексів NO-FeS в залізосірчаних білках N-1a, N-1b та N-2 комплексу I, що ініціює генерування супероксидних радикал-аніонів, формує розвиток клітинної гіпоксії та активує матриксні металопротеїнази.

Введення доксорубіцину спричиняє пошкодження ЛТЕ мітохондрій, порушення функціонування системи детоксикації в клітинах печінки, що полягає в утворенні комплексів NO-цитохром P-450 (див. рис. 1). Молекулярна перебудова доксорубіцину цитохромом P-450 в ендоплазматичному ретикулумі клітин печінки і цитозольною НАДН-дегідрогеназою кардіоміоцитів (див. рис. 1, 2) призводить до формування ліпофільних деоксіягліконів, які, на відміну від доксорубіцину, здатні проникати через внутрішню мембрану і пошкоджувати її компоненти, зокрема інгібувати активність оксидо-редуктазних комплексів I і II ЛТЕ в мітохондріях, посилювати генерування АФК. 7-Деоксіяглікон, основний метаболіт доксорубіцину, конкурує з убіхіноном — акцептором електронів, витісняючи його з ЛТЕ, що спричинює “витік” електронів на молекулярний кисень з утворенням супероксидного аніон-радикала [3].

У результаті проведених досліджень показано, що за умов введення доксорубіцину тваринам пошкоджується ЛТЕ мітохондрій і мікросом клітин, зростає швидкість генерування супероксидних радикалів у тканинах печінки ($1,75 \pm 0,15$ нмоль/(г сирової тканини · хв) проти $0,2 \pm 0,02$ у контролі, $p < 0,05$) і серця ($1,95 \pm 0,01$ нмоль/(г сирової тканини · хв) проти $0,24 \pm 0,01$ в контролі, $p < 0,05$). Разом з цим у тканинах вказаних органів достовірно зростає рівень оксиду азоту порівняно з контрольними тваринами (у печінці $3,14 \pm 0,08$ нмоль/г сирової тканини проти $1,5 \pm 0,08$ у контролі, у серці $2,98 \pm 0,21$ нмоль/г сирової тканини проти $1,57 \pm 0,1$ у контролі, $p < 0,05$). При застосуванні комплексу ЕПМ на фоні введення доксорубіцину достовірно знижується швидкість генерування супероксидних радикалів у тканинах печінки ($0,91 \pm 0,23$ нмоль/(г сирової тканини · хв)) і серця ($1,03 \pm 0,34$ нмоль/(г сирової тканини · хв)). Такі ж зміни відбуваються і з вмістом оксиду азоту — рівень цього медіатора наближається-

ся до величин, характерних для контрольних тварин (у печінці $1,91 \pm 0,35$ нмоль/г сирії тканини, у серці $1,86 \pm 0,12$ нмоль/г сирії тканини).

Введення тваринам доксорубіцину викликає зменшення цитохром *c*-оксидазної активності в мітохондріях печінки і серця (табл. 1). Цитохром *c*-оксидаза є термінальною оксидазою ЛТЕ мітохондрій, яка здатна швидко реагувати у відновленому стані з NO з утворенням комплексу нітрозилцитохрому аз. У разі зв'язування NO з іонами заліза гему блокується транспорт електронів у цих ділянках ЛТЕ мітохондрій, що порушує мітохондріальне дихання. Взаємодія NO з цитохром *c*-оксидазою супроводжується відновленням молекули кисню, внаслідок чого підвищується рівень відновлених компонентів ЛТЕ.

При введенні тваринам доксорубіцину достовірно зменшується NADH-убіхінон-оксидоредуктазна активність у мітохондріях печінки порівняно з контрольними показниками. Крім того, зростає відсоток дефіциту убіхінону для цього ферментного комплексу. В мітохондріях серця активність комплексу I не змінюється, хоча відсоток дефіциту CoQ підвищується, що свідчить про зменшення доступності CoQ для цього комплексу (див. табл. 1). При застосуванні комплексу ЕПМ відбувається зростання рівня NADH-убіхінон-оксидоредуктазної активності в мітохондріях печінки до контрольних величин; відсоток дефіциту CoQ для цієї ферментної системи зменшується (див. табл. 1) і є навіть дещо нижчим, ніж у контролі. В мітохондріях серця при введенні комплексу ЕПМ NADH-убіхінон-оксидоредуктазна активність не змінюється, а відсоток дефіциту CoQ зменшується і є нижчим за величину в контролі (див. табл. 1).

Нами показано, що сукцинат-убіхінон-оксидоредуктазна активність у мітохондріях печінки і серця достовірно зменшується при введенні доксорубіцину. При цьому відсоток дефіциту CoQ для комплексу II як в мітохондріях печінки, так і в мітохондріях серця дещо зростає (див. табл. 1). При застосуванні комплексу ЕПМ відбувається достовірне зростання рівня сукцинат-убіхінон-оксидоредуктазної активності в мітохондріях печінки і серця. Також зменшується відсоток дефіциту CoQ для цієї ферментної системи, хоча ця величина і залишається трохи вищою за контрольні показники (див. табл. 1).

Отже, за умов введення доксорубіцину втрачається одна з основних умов нормальної життєдіяльності клітин — здатність підтримувати гомеостаз редокс-стану, сукупності окисно-відновних компонентів. Дисфункція мітохондрій, насамперед мітохондріальних фермен-

Таблиця 1. Активність комплексів I, II і IV в мітохондріях печінки і серця тварин при введенні доксорубіцину та за дії комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n = 6$)

Показник	Орган	Контроль	Д	Д + ЕПМ
NADH-убіхінон-оксидоредуктазна активність, мМ NADH за 1 хв на 1 мг білка	Печінка	$12,26 \pm 1,41$	$7,45 \pm 1,01^*$	$15,93 \pm 2,42^\#$
	Серце	$4,86 \pm 0,11$	$5,18 \pm 0,41$	$5,47 \pm 0,42$
Дефіцит убіхінону для NADH-убіхінон-оксидоредуктазного комплексу, %	Печінка	19,34	39,15	16,77
	Серце	11,87	21,22	4,93
Сукцинат-убіхінон-оксидоредуктазна активність, мМ окисненого сукцинату за 1 хв на 1 мг білка	Печінка	$16,38 \pm 0,83$	$12,66 \pm 1,29^*$	$19,71 \pm 2,96$
	Серце	$14,90 \pm 0,24$	$7,76 \pm 0,87^{**}$	$26,32 \pm 1,43^{***\#\#}$
Дефіцит убіхінону для сукцинат-убіхінон-оксидоредуктазного комплексу, %	Печінка	41,8	50,6	45,6
	Серце	89,76	94,36	87,56
Цитохром <i>c</i> -оксидазна активність, мМ окисненого цитохрому <i>c</i> за 1 год на 1 мг білка	Печінка	$1,69 \pm 0,26$	$1,18 \pm 0,13^*$	$1,43 \pm 0,04$
	Серце	$4,97 \pm 0,07$	$3,12 \pm 0,16^{***}$	$4,01 \pm 0,69$

Примітка. Різниця достовірна порівняно з контролем: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; різниця достовірна порівняно з групою тварин, які отримували доксорубіцин: # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$.

тних комплексів I і III лежить в основі розвитку окисного стресу і, як наслідок, усіх відомих форм гіпоксії та є молекулярним механізмом, який визначає порушення енергетичного обміну [2]. При застосуванні комплексу ЕПМ спостерігається захисний ефект на мітохондрії клітин печінки і серця, про що може свідчити відновлення електронного транспорту в дихальному ланцюгу. Це виявляється у зменшенні утворення нітрозильних комплексів з Fe-S-білками, що запобігає порушенню функціонування ферментних комплексів ЛТЕ. Досліджуваний комплекс ЕПМ є мітохондріальнотропним та виявляє властивості до відновлення транспорту електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, пошкоджених доксорубіцином.

Таким чином, за дії на організм тварин доксорубіцину виявлено пошкодження ЛТЕ мітохондрій, при цьому зареєстровано утворення триплетних структур з $g = 2,007$ в спектрах ЕПР. Ці пошкодження можуть служити маркером токсичності доксорубіцину та мішенню для здійснення терапевтичних впливів. За цих умов відмічено зниження ефективності функціонування детоксикаційної системи клітин. В органах тварин, яким вводили доксорубіцин у терапевтичній дозі, виявлено зниження рівня убісеміхінону — радикальної форми CoQ. Показано захисний вплив комплексу ЕПМ на мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум клітин органів за умов токсичних впливів доксорубіцину.

1. Зоров Д. Б., Банникова С. Ю., Белоусов В. В. и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия. – 2005. – **70**, вып. 2. – С. 265–272.
2. Бурлака А. П., Сидорик Є. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. – Київ: Наук. думка, 2006. – 228 с.
3. Ватутин М. Т., Калинин Н. В., Кетинг Е. В. Антрациклиновая кардиомиопатия. – Донецк: ДонДШП, 2001. – 236 с.
4. Quiles J. L., Huertas J. R., Battino M. et al. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity // Toxicology. – 2002. – **180**, No 1. – P. 79–95.
5. Донченко Г. В. Биохимия убихинона (Q). – Киев: Наук. думка, 1988. – 240 с.
6. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q // Biochim and Biophys. Acta. – 2004. – **1660**, No 1–2. – P. 177–199.
7. Капелько В. И., Хаткевич А. Н., Дворянцев С. Н. и др. Сократительная функция и энергетический метаболизм сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии // Кардиология. – 1997. – № 2. – С. 31–35.
8. Muhammed H., Kupur C. K. R. Influence of ubiquinone on the inhibitory effect of adriamycin on mitochondrial oxidative phosphorylation // Biochem. J. – 1984. – **214**. – P. 493–498.
9. Ziegler D., Doeg K. A. Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase (complex II) // Methods in Enzymology. – New York, 1967. – Vol. 10. – P. 231–235.
10. Hatefi Y., Rieske J. S. Preparation and properties of DPNH-coenzyme Q reductase (Complex I of the Respiratory Chain) // Methods in Enzymology. – New York, 1967. – Vol. 10. – P. 235–239.
11. Гулидова Г. П., Сорочкина И. Н. Некоторые условия спектрофотометрического определения активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в митохондриях мозга // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1967. – **63**, № 1. – С. 41–44.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, No 1. – P. 265–275.
13. Бурлака А. П., Данко М. Й., Сидорик Є. П. Кінетичні закономірності швидкості генерування і вмісту радикалів кисню в мембранах ендоплазматичного ретикулуму при хімічному канцерогенезі печінки і молочних залоз // Доп. НАН України. – 1994. – № 10. – С. 141–145.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

Надійшло до редакції 23.05.2011

А. П. Бурлака, Е. Б. Кучменко, И. И. Ганусевич, С. М. Лукин,
Е. П. Сидорик, Д. Н. Петухов, Н. В. Делеменчук,
член-корреспондент НАН Украины Г. В. Донченко

**Протекторный эффект активации биосинтеза убихинона
на функционирование цепи транспорта электронов митохондрий
клеток органов крыс при введении доксорубицина**

При действии на организм животных доксорубицина выявлено повреждение цепи транспорта электронов в митохондриях, о чем свидетельствует образование триплетных структур с $g = 2,007$ в спектрах ЭПР. Эти повреждения могут служить маркером токсичности доксорубицина и мишенью для осуществления терапевтических воздействий. При этом установлено снижение эффективности функционирования детоксикационной системы клеток. Показан защитный эффект комплекса ЕПМ (α -токоферилацетат, 4-оксибензойная кислота, метионин) на митохондрии и эндоплазматический ретикулум клеток органов при токсических воздействиях доксорубицина. Выявлено снижение уровня убисемихинона — радикальной формы убихинона — в органах животных, которым вводили доксорубицин в терапевтической дозе.

A. P. Burlaka, O. B. Kuchmenko, I. I. Ganusevich, S. M. Lukin, E. P. Sidorik,
D. M. Petukhov, N. V. Delemenchuk,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine G. V. Donchenko

**Protective effect of ubiquinone biosynthesis activation on mitochondrial
electron-transport chain function in rats under doxorubicin
administration**

The mitochondrial electron-transport chain function is found to be impaired in animals treated with doxorubicin, which is evidenced by the formation of triplet structures with $g = 2.007$ in EPR spectra. These damages may serve as a doxorubicin toxicity marker and as a target for therapeutic treatment. A decrease in the efficiency of the functioning of cellular detoxification systems is also found. The protective effect of the EPM complex on mitochondria and endoplasmic reticulum under doxorubicin-induced toxicity is demonstrated. A decrease in the ubiquinone radical — ubisemiquinone — level was found in organs of animals treated with doxorubicin in therapeutic dosage.