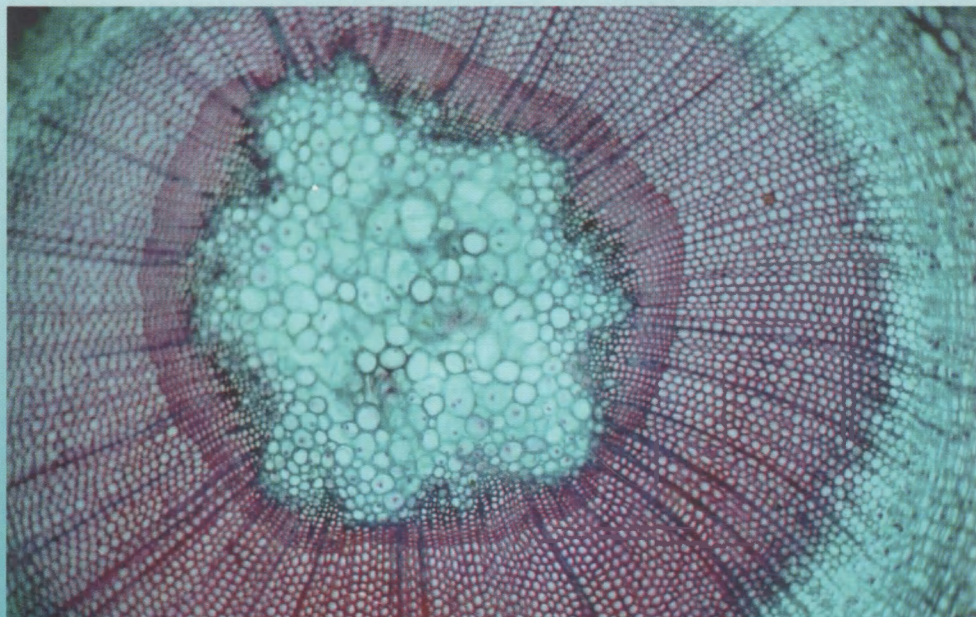


Национальная академия наук Беларуси
Институт биофизики и клеточной инженерии
Министерство образования Республики Беларусь
Белорусский государственный университет
Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И КЛЕТочНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОСИСТЕМ

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ



**XI СЪЕЗД БЕЛОРУССКОГО ОБЩЕСТВЕННОГО
ОБЪЕДИНЕНИЯ ФОТОБИОЛОГОВ И БИОФИЗИКОВ**

17 – 20 июня 2014 г., Минск, Беларусь

**СБОРНИК СТАТЕЙ
В двух частях
Часть 1**

РЕГУЛЯЦИЯ ХИНОНАМИ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ

Н.Г. Крылова¹, В.Т. Чешевик², Т.А. Кулагова¹, И.Б. Заводник²

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
Гродно, Беларусь*

В настоящее время митохондрии рассматриваются не только как основные продуценты АТФ в клетке, но и как важные участники процессов внутриклеточной сигнализации. Активные формы кислорода (АФК) являются побочным продуктом работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ)

митохондрий. Канцерогенез, некоторые нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, диабет ассоциируется с нарушением функционирования митохондрий и повышением внутриклеточной концентрации АФК. В связи с этим, перспективным является поиск митохондриально-направленных терапевтических средств, способных регулировать окислительное фосфорилирование и редокс-процессы в митохондриях.

Бензо- и нафтохиноны относят к группе соединений, способных акцептировать электроны из ЭТЦ митохондрий. Показано, что хиноны могут индуцировать генерацию АФК, участвуя в редокс-цикле с молекулярным кислородом, и шунтировать ЭТЦ, передавая электроны на комплекс II, убихинон или комплекс IV. Менадион, ибеденон и коэнзим Q₁ могут восстанавливать функционирование ЭТЦ в условиях дисфункции комплекса I. Цель настоящей работы – изучить влияние хинонов (2-метил-1,4-нафтохинон – менадион, 2,3,5-триметил-1,4-бензохинон – ТМБХ и коэнзим Q₀ – CoQ₀) в концентрации 1·10⁻³ моль/л на трансмембранный митохондриальный потенциал и продукцию АФК.

Было изучено влияние хинонов на трансмембранный потенциал митохондрий (φ) клеток глиомы крысы линии С6 с использованием флуоресцентного зонда JC-1. Определяли отношение интенсивностей (I₅₉₀/I₅₄₀) для двух длин волн испускания λ₁=590 нм и λ₂=540 нм (длина волны возбуждения λ_{ex}=490 нм), которое пропорционально значению φ. Из данных, представленных в таблице 1, видно, что при инкубировании клеток менадионом, ТМБХ и CoQ₀ в течение 20 мин происходит снижение φ до 55±7%, 68±7% и 74±7 % относительно контрольного образца. При доведении к опухолевым клеткам линии С6 ингибиторов митохондриальных комплекса I (ротенон 1·10⁻⁶ моль/л – РТ) и комплекса II (теноилтригидрацетон 1·10⁻⁶ моль/л – ТТФА) регистрируется снижение φ. При действии менадиона на клетки в присутствии РТ митохондриальный потенциал был равен значению φ для клеток, не подвергавшихся воздействию ингибитора, и составлял 51±2% относительно контроля. Так как ингибирование комплекса I приводит к снижению φ на 28±4%, а менадион не оказывает аддитивного действия, можно предположить, что этот хинон ингибирует комплекс I ЭТЦ митохондрий клеток С6. Экспозиция клеток с CoQ₀ на фоне РТ приводит к дополнительному уменьшению φ до 56±6% относительно контроля. Это свидетельствует, что CoQ₀ не восстанавливает активность комплекса I. Выявлено, что добавление ТМБХ на фоне РТ приводит к повышению φ на 8%. Эти данные свидетельствуют о восстановлении дыхательной активности митохондрий в присутствии ТМБХ.

Таблица 1 – Изменение митохондриального потенциала в клетках глиомы крысы линии С6 при действии хинонов

	I ₅₉₀ /I ₅₄₀ , % от контроля			
		РТ	ТТФА	РТ+ТТФА
ДМСО	100	72±4	87±6	78±7
менадион	55±7	51±2	45±4	54±10
ТМБХ	68±7	80±5	87±1	68±13
СоQ ₀	74±7	56±6	65±6	54±2

Митохондриальный потенциал при действии менадиона и СоQ₀ на фоне ТТФА снижается до 45±4% и 65±6%, то есть данные хиноны проявляют сочтанное с ингибитором действие. Поскольку при действии ТМБХ повышается ϕ на фоне РТ и не изменяется ϕ при ингибировании комплекса II, можно предположить, что ТМБХ способствует обратному потоку электронов в ЭТЦ митохондрий.

Следует отметить, что при одновременном ингибировании комплексов I и II снижение трансмембранного потенциала митохондрий не превышает 30% относительно контроля. Высокое значение ϕ при ингибировании комплексов I и II может поддерживаться как за счет поступления электронов с глицерол-6-фосфат дегидрогеназы и/или ЕТФ-дегидрогеназы непосредственно на комплекс III, так и за счет АТФ-гидролазной активности F₁F₀-АТФ синтазного комплекса.

Нами установлено, что менадион, ТМБХ и СоQ₀ не влияют на ϕ изолированных митохондрий печени крыс, как при окислении в качестве субстрата смеси 5·10⁻³ моль/л глутамата с 2·10⁻³ моль/л малата (глу/мал), так и 5·10⁻³ моль/л сукцината. При ингибировании комплекса I в условиях окисления глу/мал менадион и ТМБХ восстанавливают функционирование ЭТЦ: регистрируется повышение ϕ с 36±4% до 100±1% и 81±7 % при действии менадиона и ТМБХ на фоне воздействия РТ.

Для выявления роли хинон-индуцированных редокс-процессов в регуляции ϕ исследовали продукцию митохондриальных супероксидных анион-радикалов в клетках линии С6 с использованием флуоресцентного зонда mitoSOX, а также генерацию пероксида водорода изолированными митохондриями с использованием 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина (DCF). Оценивали интенсивность флуоресценции зондов (I⁴⁰_{mitoSOX} и I⁴⁰_{DCF}) через 40 мин после воздействия хинонов. Выявлено, что при действии менадиона, ТМБХ и СоQ₀ на клетки глиомы наблюдается значительное снижение продукции O₂⁻ в митохондриях. Как показано в таб-

таблица 2, $\Gamma^{40}_{\text{mitoSOX}}$ снижается до 87%, 52% и 77% при действии менадиона, ТМБХ и CoQ_0 , соответственно.

Установлено, что при окислении глу/мал в ЭТЦ изолированных митохондрий продукция H_2O_2 снижается до 48% и 60% при действии ТМБХ и CoQ_0 . Ингибирование комплекса I индуцирует повышение генерации АФК на 48%. Воздействие менадиона и ТМБХ на фоне РТ уменьшает продукцию H_2O_2 до 50% относительно контроля.

Таблица 2 – Продукция АФК митохондриями при действии хинонов

	изолированные митохондрии				клетки линии С6
	Γ^{40}_{DCF} , % от контроля				
	глу/мал		сукцинат		$\Gamma^{40}_{\text{mitoSOX}}$, % от контроля
	РТ		РТ		
контроль	100	148±11	100	71±10	100
менадион	118±15	49±15	67±12	33±12	87±7
ТМБХ	48±10	51±11	17±10	8±8	52±5
CoQ_0	60±12	85±9	42±16	21±11	77±5

При использовании сукцината в качестве субстрата дыхания хиноны вызывают уменьшение продукции H_2O_2 митохондриями до 17% (ТМБХ), 6% (CoQ_0) и 67% (менадион) от контрольного уровня. Добавление РТ в условиях окисления сукцината приводит к снижению генерации АФК.

Таким образом, исследованные хиноны нарушают функционирование ЭТЦ митохондрий в клетках, что выражается в снижении митохондриального потенциала и концентрации генерируемых АФК. 2,3,5-триметил-1,4-бензохинон восстанавливает функционирование ЭТЦ митохондрий в условиях ингибирования комплекса I или II.