

УДК 591.139;577.71;612.67

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСОВ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МОДУЛЯТОРОВ БИОСИНТЕЗА КОФЕРМЕНТА Q НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА СТАРЫХ КРЫС

Е.Б. Кучменко^{1}, Д.Н. Петухов¹, Г.В. Донченко¹, Л.С. Мхитарян², С.В. Тимошук³,
Н.А. Струтинская³, Г.Л. Вавилова³, В.Ф. Сагач³*

¹Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, ул. Леонтовича, 9,
01601, Киев; факс: (+38-044) 234-71-78; эл. почта: kuchmeh@yahoo.com

²Национальный научный центр "Институт кардиологии им. акад. Н.Д. Стражеско"
АМН Украины, ул. Народного ополчения, 5, 03151, Киев;
факс: (+38-044) 275-42-09; эл. почта: laura_mkhitaryan@ukr.net

³Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, ул. Богомольца, 4,
01024, Киев; факс: (+38-044) 256-20-00; эл. почта: sni-timoshchuk@biph.kiev.ua

Показано, что при старении происходят изменения активности ферментных систем транспорта электронов в митохондриях сердца старых крыс и возрастает чувствительность митохондриальной поры переходной проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) к действию индукторов её открытия - Ca^{2+} и фениларсинооксида. Также наблюдается активация процессов свободнорадикального окисления липидов и белков.

При введении крысам комплекса биологически активных соединений (БАС) – предшественников и модуляторов биосинтеза убихинона, который состоит из α -токоферол ацетата, пара-оксибензойной кислоты и метионина, наблюдается повышение содержания убихинона, коррекция функциональной активности ферментных систем цепи транспорта электронов в митохондриях, снижение интенсивности свободнорадикального окисления липидов и белков в тканях сердца, а также снижение чувствительности митохондриальной поры переходной проницаемости к действию индукторов её открытия. Указанный комплекс может быть рекомендован к использованию для коррекции митохондриальной дисфункции при разных патологических состояниях сердечно-сосудистой системы и при старении.

Ключевые слова: убихинон, старые крысы, свободнорадикальное окисление липидов и белков, митохондриальная пора переходной проницаемости.

ВВЕДЕНИЕ. Согласно современным представлениям о функциональном значении реакций свободнорадикального и перекисного окисления, окислительного фосфорилирования митохондрий в регуляции внутриклеточного метаболизма, ведущую роль в процессах старения играет повреждение структуры митохондрий и нарушение их функций, таких как поддержание мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$), уровня АТР, дыхания, скорости наработки АФК и др [1, 2]. Это сопровождается

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода, МРТР – митохондриальная пора переходной проницаемости, CoQ – убихинон, кофермент Q, ПОБК – 4-гидроксибензойная кислота, NQR – NADH-убихинон-оксидоредуктаза, SQR – сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза, ФАО – фениларсиноксид, ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота.

* - адресат для переписки

повышением содержания Ca^{2+} , накоплением и продолжительным токсическим действием свободных радикалов, а также изменением функционального состояния ферментов системы антиоксидантной защиты. Показано, что открытие МРТР, которое происходит в условиях критически возросших концентраций Ca^{2+} и АФК, сопровождается дисфункцией митохондрий и функциональными нарушениями сердца.

Прогрессирующее увеличение продукции свободных радикалов с возрастом коррелирует с уменьшением числа функционально активных митохондрий в клетке, продукцией АТР, снижением биосинтеза белка и утечкой из митохондрий H_2O_2 [3]. Цепь транспорта электронов является одним из основных источников супероксид-анион-радикала. Митохондрии аккумулируют повреждения, причинённые действием АФК, намного быстрее, нежели другие компартменты клетки, что приводит к развитию митохондриальной дисфункции и клеточной гибели при многих патологических состояниях и при старении [4].

С возрастом наблюдается увеличение окислительных повреждений вследствие как интенсификации окислительного стресса, так и снижения способности митохондрий синтезировать АТР. CoQ вовлечён в оба эти процесса как переносчик электронов цепи транспорта электронов митохондрий и мощный антиоксидант [5, 6]. Исследованиями показано, что с возрастом содержание CoQ в тканях человека снижается [7]. В отдельных исследованиях показано отсутствие изменений в содержании CoQ в мозге и лёгких, увеличение его уровня в печени и уменьшение в сердце, почках и скелетных мышцах [8].

Убихинон (кофермент Q, CoQ) играет ключевую роль в биоэнергетических процессах в клетке, в первую очередь, как переносчик электронов в цепи транспорта электронов митохондрий. CoQ также является важным эндогенно синтезируемым жирорастворимым антиоксидантом, который принимает участие как в обезвреживании АФК, так и в регенерации других антиоксидантов, в первую очередь, витамина Е. Тем не менее, при определённых условиях CoQ может выступать в качестве прооксиданта, что указывает на функционирование его как модулятора редокс-состояния клетки при физиологических и патологических состояниях, а также при старении. Кроме того, показана роль CoQ в регуляции функционального состояния МРТР, которая вовлечена в механизмы развития апоптоза [9-12].

Проблема обеспечения организма человека и животных CoQ за счёт его эндогенного синтеза является актуальной в связи с тем, что это многостадийный процесс, зависящий от разнообразных механизмов его регуляции, которые часто нарушаются как в здоровом организме (при недостаточном, нерациональном питании, дефиците витаминов, влиянии негативных факторов окружающей среды), так и при различных патологических состояниях, сопровождающихся нарушениями энергетического обмена в целом и угнетением биосинтеза CoQ в частности. Кроме того, снижение интенсивности эндогенного синтеза CoQ происходит также с возрастом [9, 11, 13].

Кроме эндогенного CoQ живые организмы могут усваивать CoQ с пищей, однако его недостаточно даже при рациональном сбалансированном питании. Количество поступающего с пищей CoQ не может полностью обеспечить физиологические потребности организма млекопитающих в этом важном соединении, не говоря уже о проявлении лечебного эффекта. Таким образом, для обеспечения потребности организма в CoQ необходимо дополнительное поступление его извне в виде лекарственных препаратов (что экономически невыгодно для пациентов и может приводить к угнетению эндогенного синтеза CoQ, о чем свидетельствует снижение содержания CoQ после окончания курса лечения до контрольных величин, а иногда и ниже [14]), обогащённых CoQ продуктов или принятия мер, направленных на интенсификацию процессов его биосинтеза в организме.

В наших предыдущих работах показано, что при скормливаниях различным видам животных витамина Е наблюдается значительное усиление биосинтеза, накопления и функционирования CoQ [9]. Кроме того, было продемонстрировано, что один из промежуточных продуктов биосинтеза CoQ – ПОБК (4-гидроксibenзойная кислота) наряду с витамином Е предупреждает развитие мышечной дистрофии и вызывает аналогичные по направленности изменения активности CoQ-зависимых ферментных систем митохондрий [15]. Также показано, что метионин является важным донором метильных групп в синтезе полиизопреноидной боковой цепи CoQ [9].

Таким образом, целью данной работы было исследование действия предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ, а именно витамина Е, ПОБК (предшественника синтеза бензохинонового ядра) и метионина, на биоэнергетические процессы, интенсивность процессов свободнорадикального окисления и чувствительность МРТР к действию индукторов её открытия в тканях сердца взрослых и старых животных.

МЕТОДИКА. В экспериментах использовали взрослых самцов крыс массой 200–250 г, возрастом 6–7 месяцев, и старых самцов крыс массой 350–450 г, возрастом 24 мес. Крыс содержали на стандартном рационе вивария. Животные были разделены на 3 группы: 1. контрольные (интактные) взрослые животные; 2. контрольные (интактные) старые животные; 3. старые животные, получавшие α -токоферолацетат, ПОБК и метионин.

Биологически активные соединения вводили животным на протяжении 10 дней перорально. Количества введённых БАС указаны в патенте Украины [16].

На 11-й день эксперимента животных декапитировали с учётом требований Международной конвенции по правилам гуманного обращения с животными.

Сердца промывали охлаждённым 0,9% раствором KCl. Митохондрии выделяли с помощью метода дифференциального центрифугирования [17]. О чистоте этих субклеточных структур судили по активности сукцинатдегидрогеназы и данных электронномикроскопических исследований [18]. Содержание белка в суспензии митохондрий определяли по методу Лоури [19]. CoQ и витамин Е разделяли с помощью тонкослойной хроматографии [20]. Содержание CoQ в митохондриях определяли спектрофотометрически [20]. Для этого измеряли спектр окисленной формы CoQ при длинах волн 270, 275 и 290 нм, затем добавляли 2,5% раствор K₂S₂O₈, и через 10 минут при тех же длинах волн измеряли экстинкцию восстановленной формы CoQ. Содержание CoQ рассчитывали по разнице величин экстинкций его окисленной и восстановленной форм при 275 нм. Содержание витамина Е определяли фотоколориметрически по реакции Эммери-Энгеля с дипиридилом и хлористым железом [20]. NQR (NADH-CoQ-оксидоредуктазную) активность определяли спектрофотометрически по степени окисления NADH при длине волны 340 нм [21]. SQR (сукцинат-CoQ-оксидоредуктазную) активность определяли спектрофотометрически по степени восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола восстановленным CoQ при длине волны 600 нм [22]. Цитохромоксидазную активность определяли по степени окисления цитохрома с спектрофотометрически при длине волны 550 нм [23].

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления оценивали по содержанию диеновых конъюгатов, продуктов, реагирующих с ТБК, и продуктов окисления белков. Содержание диеновых конъюгатов определяли по появлению нового максимума в спектре поглощения спектрофотометрически при длине волны 233 нм [24]. Содержание ТБК-позитивных продуктов определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием триметинового комплекса спектрофотометрически с максимумом поглощения при длине волны 532 нм [25]. Содержание продуктов свободнорадикального окисления белков определяли спектрофотометрически в реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона [26].

ВЛИЯНИЕ КОФЕРМЕНТА Q НА МИТОХОНДРИИ СЕРДЦА СТАРЫХ КРЫС

Исследование открытия МРТР проводили с помощью спектрофотометрической регистрации набухания митохондрий, изолированных из сердца крыс [27]. Для этого изолированные митохондрии помещали в инкубационную среду изотонического состава (ммоль/л): KCl – 120, трис-окиметил-аминометан-HCl – 25, KH_2PO_4 – 3, pH 7,4 (конечный объём – 3 мл) и регистрировали снижение их оптической плотности при длине волны 520 нм за 3 минуты до и через 15 минут после их набухания в присутствии индуктора (Ca^{2+} либо ФАО) в инкубационной среде. Концентрация белка в инкубационной среде составляла 0,3 мг/мл. В качестве контроля использовали суспензию интактных митохондрий в инкубационной среде в отсутствие индуктора с последующей регистрацией оптической плотности на протяжении 15 минут.

Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием программ Excel (MS Office XP) и Origin 6.0 (OriginLab Corporation). Данные представлены в виде средней величины \pm стандартное отклонение. Достоверность разницы двух средних величин оценивали по t- критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Введение животным комплекса БАС направлено в первую очередь на активацию биосинтеза CoQ в организме. В результате проведённых нами исследований показано, что содержание CoQ в митохондриях сердца увеличивается в 1,5 раза по сравнению со старыми животными, не получавшими данного комплекса (табл. 1).

Таблица 1. Содержание CoQ и витамина E в митохондриях сердца взрослых, старых крыс и старых крыс при введении им комплекса биологически активных соединений, n=6.

Группы	Контроль – взрослые животные	Контроль – старые животные	Старые животные + комплекс биологически активных соединений
CoQ мкг/г белка	1446,65\pm164,92	1643,90\pm206,40	2768,74\pm509,59*#
Витамин E, мг/г белка	7,19\pm0,86	6,26\pm1,41	11,37\pm3,63*#

Примечание: * - разница достоверна по сравнению с контролем - взрослыми животными ($p < 0,05$);
- разница достоверна по сравнению с контролем - старыми животными ($p < 0,05$).

Исследование содержания витамина E в митохондриях сердца старых животных показало, что при введении им комплекса БАС его содержание возрастает в 1,8 раза и является достоверно более высоким по сравнению с взрослыми животными (табл. 1).

Согласно данным литературы, при старении наблюдается угнетение активности ферментных комплексов цепи транспорта электронов митохондрий [3]. Возможно, повреждения митохондриальной DNA, которые имеют место с возрастом в условиях оксидативного стресса, могут стать причиной угнетения активности указанных ферментных комплексов [28].

Исследования активности CoQ-зависимых ферментных систем показали, что активность NQR достоверно возрастает в митохондриях сердца старых контрольных животных по сравнению со взрослыми (табл. 2).

Таблица 2. Активность NQR, SQR и цитохромоксидазы в митохондриях сердца взрослых, старых крыс и старых крыс при введении им комплекса биологически активных соединений, n=6.

Группы	Контроль – взрослые животные	Контроль – старые животные	Старые животные + комплекс биологически активных соединений
NQR-активность, ммоль окисленного NADH в 1 мин. на 1 мг белка	64,54±19,3	133,41±9,68*	72,33±14,71#
SQR-активность, ммоль окисленного сукцината в 1 мин. на 1 мг белка	79,23±9,43	133,82±18,42*	141,43±23,35*
Цитохромоксидазная активность, ммоль окисленного цитохрома c в 1 час на 1 мг белка	1,51±0,17	0,89±0,18*	3,12±0,89*#

Примечание: * - разница достоверна по сравнению с контролем - взрослыми животными (p<0,05); # - разница достоверна по сравнению с контролем - старыми животными (p <0,05).

Вместе с тем наблюдается уменьшение активности NQR в 1,6 раза в митохондриях сердца старых подопытных животных по сравнению с контрольными старыми животными, у которых эта величина возвращается до значений контрольных взрослых животных (табл. 2).

Активность SQR в митохондриях сердца старых крыс контрольной группы возрастает по сравнению со взрослыми животными и практически не изменяется при введении старым животным комплекса БАС по сравнению с контрольными старыми животными (табл. 2).

Цитохромоксидазная активность в митохондриях сердца достоверно понижается у старых контрольных животных по сравнению со взрослыми животными (табл. 2), а в митохондриях сердца старых животных, получавших комплекс БАС, цитохромоксидазная активность возрастает в 3,5 раза по сравнению с таковой у контрольных старых животных, и даже превышает этот показатель у взрослых крыс, что в результате может способствовать улучшению процессов дыхания.

При сравнении приведённых данных с результатами наших предыдущих исследований относительно содержания CoQ и витамина Е в митохондриях печени, можно отметить однонаправленность изменений, хотя в митохондриях печени увеличение содержания исследуемых соединений является более выраженным (неопубликованные данные). При этом обращает на себя внимание тот факт, что при введении исследуемого комплекса БАС NQR и SQR активность возрастает только в митохондриях печени, тогда как в митохондриях сердца не наблюдается достоверных изменений SQR активности, а NQR активность снижается по сравнению с контрольными животными.

Согласно свободнорадикальной теории старения, нарушение баланса между функционированием про- и антиоксидантных систем приводит к значительному возрастанию содержания свободных радикалов на фоне угнетения функциональной активности антиоксидантных систем, что может стать причиной повреждения нуклеиновых кислот, липидов и белков [2, 12].

ВЛИЯНИЕ КОФЕРМЕНТА Q НА МИТОХОНДРИИ СЕРДЦА СТАРЫХ КРЫС

Согласно данным литературы, при старении в тканях наблюдается накопление продуктов свободнорадикального окисления липидов. Подобная тенденция наблюдается и в наших исследованиях (табл. 3). Полученные нами результаты указывают на то, что введение комплекса предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ приводит к снижению содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов в 1,9 раза по сравнению с контролем. Вместе с тем происходит достоверное уменьшение в митохондриях сердца подопытных животных содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов – ТБК-позитивных продуктов в 2,9 раза по сравнению с таковыми у старых контрольных животных, которые не получали комплекс (табл. 3).

Таблица 3. Содержание диеновых конъюгатов, ТБК-позитивных продуктов и продуктов свободнорадикального окисления белков в митохондриях сердца взрослых, старых крыс и старых крыс при введении им комплекса биологически активных соединений, n=6.

Группы	Контроль – взрослые животные	Контроль – старые животные	Старые животные + комплекс биологически активных соединений
Диеновые конъюгаты, усл. ед. / мг белка	38,78±3,56	48,90±4,74*	25,70±2,67*#
ТБК-позитивные продукты, усл. ед. / мг белка	0,41±0,11	0,73±0,21*	0,25±0,01*#
Продукты свободнорадикального окисления белков, усл. ед. / мг белка	0,116±0,007	0,136±0,003*	0,093±0,004*#

Примечание: * - разница достоверна по сравнению с контролем - взрослыми животными (p<0,05); # - разница достоверна по сравнению с контролем - старыми животными (p <0,05); результаты у взрослых крыс получены в другой серии исследований (неопубликованные данные).

В результате проведенных исследований показано, что введение комплекса предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ приводит к достоверному уменьшению содержания продуктов свободнорадикального окисления белков в митохондриях сердца в 1,5 раза по сравнению с контролем (табл. 3).

В изолированных по Лангендорфу сердцах морских свинок показано, что предшествующее ишемии-реперфузии миокарда однократное введение CoQ в дозе 10 мг/кг приводит к уменьшению степени реперфузионных нарушений функции сердца и кислородного обмена в миокарде. В исследованиях *in vitro* препарат Q₁₀ также проявлял протекторное действие в отношении Ca²⁺- и ФАО-индуцированного набухания митохондрий сердца взрослых крыс [29].

В наших исследованиях показано, что митохондрии, изолированные из сердца старых крыс, которым вводили предшественники и модуляторы биосинтеза CoQ, имеют на 44% меньшую величину набухания по сравнению с митохондриями сердца старых животных (рис. 1). Это свидетельствует о том, что в условиях повышенного эндогенного синтеза CoQ происходят изменения в сторону улучшения барьерных свойств мембраны митохондрий, а именно уменьшается её проницаемость, связанная со стабилизацией органелл. Кроме того, в условиях действия природного индуктора МРТР – Ca²⁺ в концентрации 10⁻⁴ М наблюдается

уменьшение на 82% величины набухания митохондрий сердца старых крыс, которым вводили комплекс БАС по сравнению со старыми контрольными крысами. Тот факт, что при введении предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ степень набухания митохондрий сердца старых животных значительно меньше по сравнению с этим показателем митохондрий сердца интактных старых животных, может свидетельствовать об увеличении стойкости мембраны митохондрий вследствие уменьшения её проницаемости не только в отсутствие индуктора Ca^{2+} (кривые 1, 2), но и в его присутствии (кривые 3, 4). Циклоспорин А в концентрации 10^{-5} М частично ингибировал индуцированное Ca^{2+} набухание митохондрий сердца старых крыс и полностью ингибировал его в митохондриях сердца старых крыс, которым вводили предшественники и модуляторы биосинтеза CoQ.

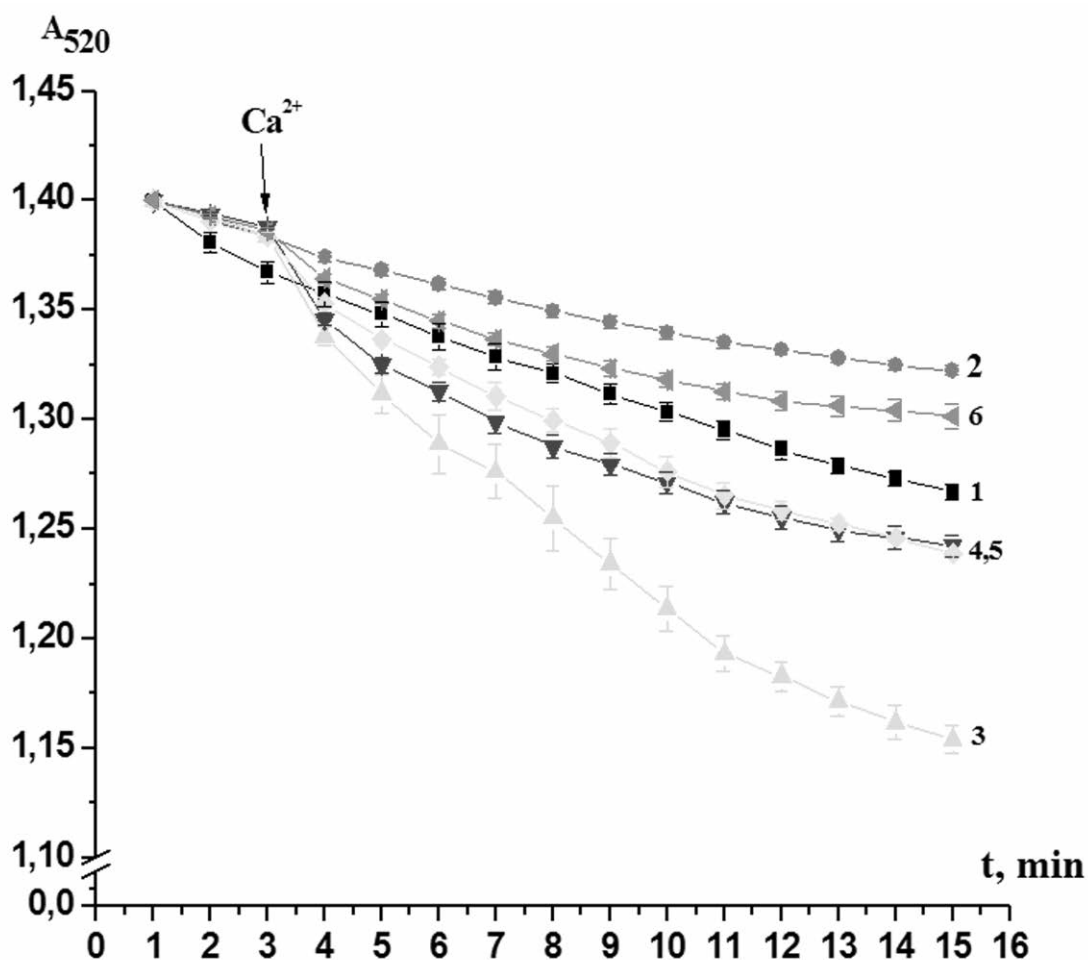


Рисунок 1.

Типичные кривые Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий сердца старых контрольных крыс и старых крыс после введения предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ: 1 - митохондрии сердца контрольных старых крыс; 2 - митохондрии сердца старых крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ; 3 - митохондрии сердца контрольных старых крыс, действие Ca^{2+} (10^{-4} М); 4 - митохондрии сердца старых крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ, действие Ca^{2+} (10^{-4} М); 5 - преинкубация митохондрий сердца контрольных старых крыс с циклоспорином А (10^{-5} М), действие Ca^{2+} (10^{-4} М); 6 - преинкубация митохондрий сердца старых крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ с циклоспорином А (10^{-5} моль/л), действие Ca^{2+} (10^{-4} М)

ВЛИЯНИЕ КОФЕРМЕНТА Q НА МИТОХОНДРИИ СЕРДЦА СТАРЫХ КРЫС

Установлено, что Ca^{2+} в диапазоне исследованных концентраций 10^{-7} - 10^{-4} М вызывает дозозависимое набухание митохондрий в сердце взрослых и старых крыс, а также старых крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ. Ca^{2+} в наименьшей концентрации 10^{-7} М вызывает минимальное набухание митохондрий сердца старых контрольных крыс и старых крыс, получавших комплекс БАС. Величина набухания митохондрий старых животных при действии Ca^{2+} в диапазоне концентраций от 0 до 10^{-4} М после введения биологически активных соединений, необходимых для синтеза CoQ, была значительно меньше величины набухания митохондрий старых животных и приближается к таковой у контрольных взрослых животных (рис. 2). Этот факт свидетельствует, что в условиях эндогенной активации биосинтеза CoQ степень набухания митохондрий достоверно ниже по сравнению с таковой у старых крыс, которые не получали исследуемый комплекс.

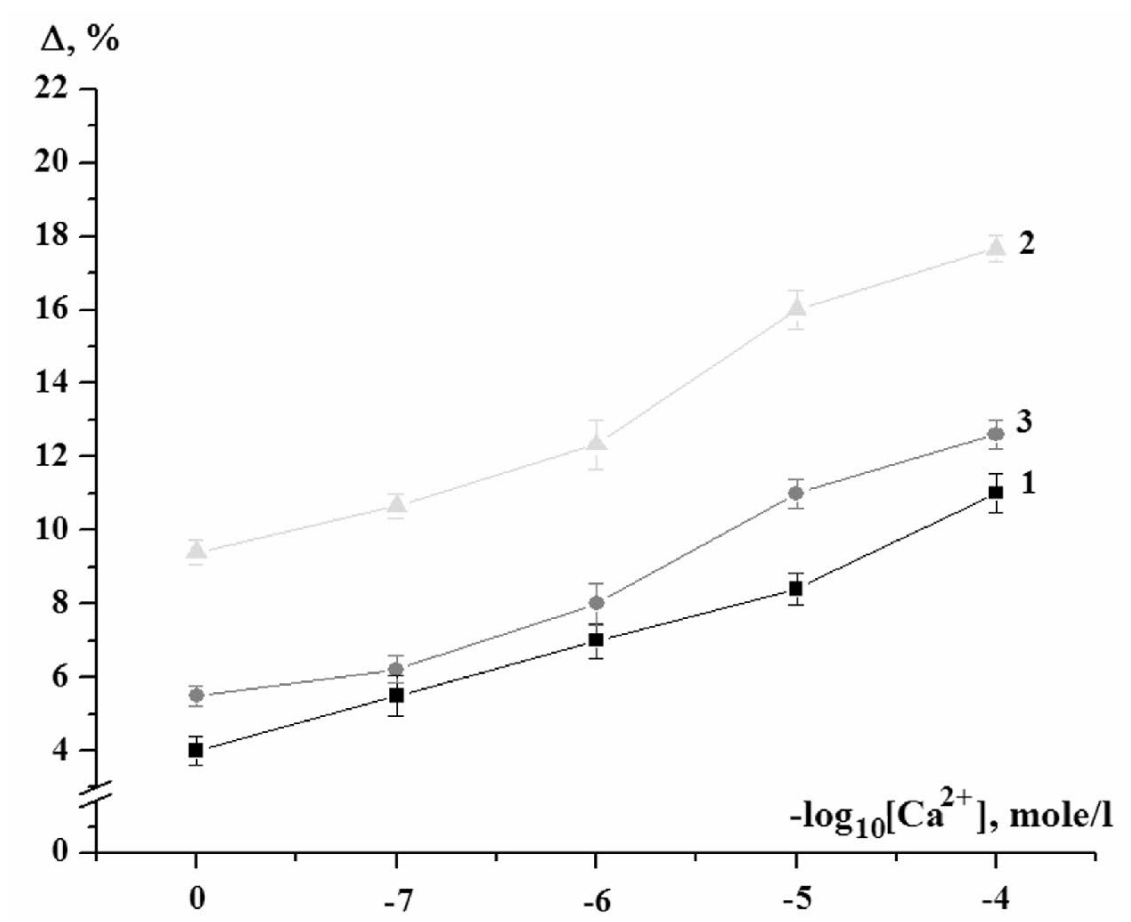


Рисунок 2.

Концентрационная зависимость действия Ca^{2+} на степень набухания $\Delta\%$ митохондрий тканей сердца взрослых (1) ($n=5$), старых (2) ($n=5$), и старых крыс (3) ($n=5$) после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ.

По оси ординат - разница ($\Delta\%$) между изменением показателя оптической плотности суспензии митохондрий на 15-й минуте их набухания в условиях действия индуктора Ca^{2+} и показателем исходного значения оптической плотности данной суспензии на 1-й минуте; по оси абсцисс - логарифм концентрации Ca^{2+} .

При действии другого индуктора МРТР – модификатора сульфгидрильных групп ФАО в диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-4} М (рис. 3) также наблюдали дозозависимое набухание митохондрий и приближение величины набухания митохондрий сердца старых крыс после введения предшественников и модуляторов биосинтеза СоQ к таковой у взрослых животных. Величина набухания митохондрий в присутствии ФАО (10^{-4} М) в условиях активации биосинтеза СоQ уменьшалась в 1,5 раза по сравнению с величиной набухания митохондрий сердца старых животных (рис. 3), что также свидетельствует об уменьшении чувствительности митохондрий к действию окислителя ФАО в вышеуказанных условиях. В данном случае также имеет место тот факт, что изначально степень набухания митохондрий старых крыс, получавших исследуемый комплекс, была достоверно ниже по сравнению со старыми животными, не получавшими его. Ранее было установлено, что изолированные из сердца старых крыс митохондрии характеризуются повышенной чувствительностью МРТР к индукторам её открытия – Ca^{2+} и ФАО [27].

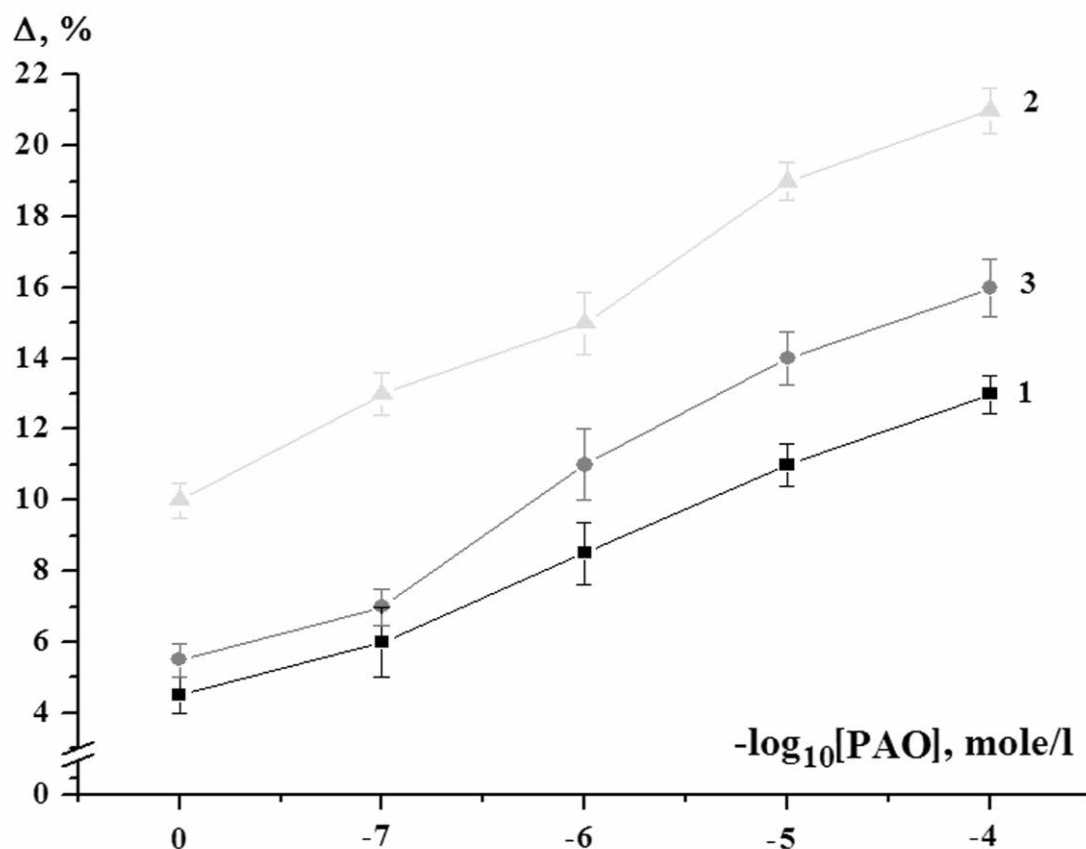


Рисунок 3.

Концентрационная зависимость действия ФАО на степень набухания $\Delta\%$ митохондрий тканей сердца взрослых (1) ($n=5$), старых (2) ($n=5$), и старых (3) ($n=5$) крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза СоQ.

По оси ординат - разница ($\Delta\%$) между изменением показателя оптической плотности суспензии митохондрий на 15-й минуте их набухания в условиях действия индуктора ФАО и показателем исходного значения оптической плотности данной суспензии на 1-й минуте; по оси абсцисс - логарифм концентрации Ca^{2+} .

ВЛИЯНИЕ КОФЕРМЕНТА Q НА МИТОХОНДРИИ СЕРДЦА СТАРЫХ КРЫС

Показано, что у старых крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ величина набухания митохондрий сердца при действии ФАО в концентрации 10^{-4} М достоверно уменьшается на 54% по сравнению со старыми крысами (рис. 4). Преинкубация митохондрий сердца старых крыс с циклоспорином А (10^{-5} М) в присутствии ФАО (10^{-4} М) приводила к уменьшению величины набухания митохондрий в обоих случаях, однако более выраженный эффект угнетения открытия МРТР наблюдали на митохондриях сердца старых животных после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ. При действии Ca^{2+} - индуктора открытия МРТР, в сердце старых крыс после введения им комплекса БАС наблюдали более существенное снижение величины набухания митохондрий по сравнению со старыми животными, чем в случае действия ФАО. Это можно объяснить тем, что последний, будучи окислителем, по своим физико-химическим свойствам может осуществлять необратимое повреждение мембран, в частности белково-липидного окружения МРТР.

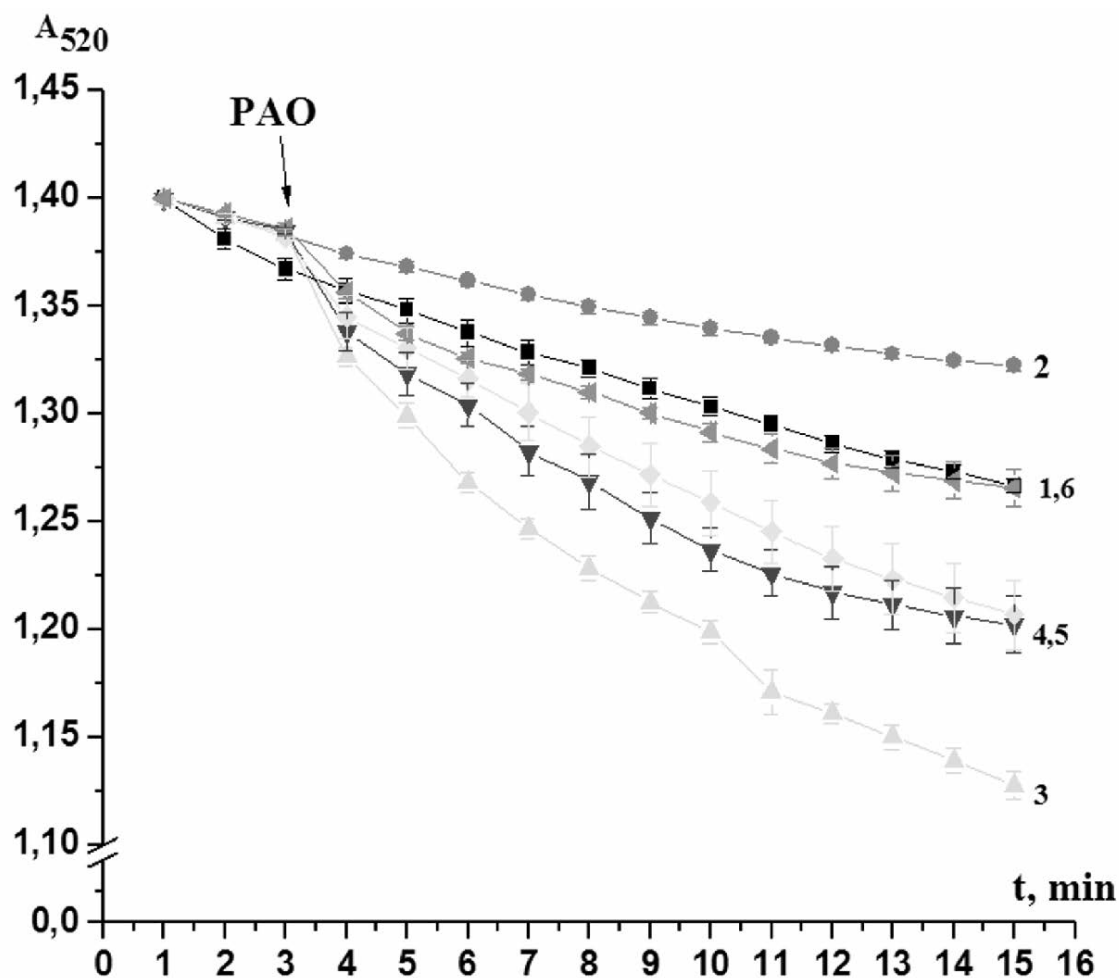


Рисунок 4.

Типичные кривые ФАО-индуцированного набухания митохондрий сердца старых контрольных крыс и старых крыс после введения предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ: 1 - митохондрии сердца контрольных старых крыс; 2 - митохондрии сердца старых крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ; 3 - митохондрии сердца контрольных старых крыс, действие ФАО (10^{-4} моль/л); 4 - митохондрии сердца старых крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ, действие ФАО (10^{-4} моль/л); 5 - преинкубация митохондрий сердца контрольных старых крыс с циклоспорином А (10^{-5} М), действие ФАО (10^{-4} моль/л); 6 - преинкубация митохондрий сердца старых крыс после введения им предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ с циклоспорином А (10^{-5} моль/л), действие ФАО (10^{-4} моль/л).

Ранее нами было установлено, что в условиях преинкубации митохондрий с раствором CoQ (10^{-5} М) происходило уменьшение величины Ca^{2+} - и ФАО-индуцированного набухания митохондрий в сердце взрослых крыс в среднем на 50% и 46% соответственно и в случае Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий старых крыс – на 50% [29]. В исследованиях по изучению влияния комплекса предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ на открытие МРТР было показано, что защитный эффект против набухания митохондрий в условиях действия индуктора Ca^{2+} был значительно больше, то есть разница (Δ) величин набухания митохондрий по сравнению со старыми крысами составляла 82% и 54% соответственно.

Таким образом, является очевидным, что комплекс, состоящий из α -токоферол ацетата, ПОБК и метионина, способен проявлять мощное антиоксидантное действие при старении, не только ингибируя чрезмерную активацию свободнорадикальных процессов окисления липидов и белков, но и активируя эндогенный биосинтез CoQ. При этом важным экспериментальным фактом является увеличение содержания витамина Е, являющегося модулятором биосинтеза CoQ и вместе с тем мощным жирорастворимым антиоксидантом.

Из приведенных данных также видно, что применение комплекса предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ способствует функционированию CoQ-зависимых ферментных комплексов цепи транспорта электронов в митохондриях.

Введение исследуемого комплекса биологически активных соединений, являющихся предшественниками и модуляторами биосинтеза CoQ, приводит к значительному уменьшению степени набухания митохондрий в диапазонах концентраций Ca^{2+} и ФАО – индукторов открытия МРТР – от 0 до 10^{-4} М, вероятно за счёт увеличения в митохондриях содержания CoQ, витамина Е и нормализации функционирования цепи транспорта электронов митохондрий.

Таким образом, применение разработанного нами комплекса биологически активных соединений – предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ способствует коррекции возрастных изменений содержания CoQ, нормализации функционирования ферментных систем цепи транспорта электронов в митохондриях, снижению интенсивности свободнорадикального окисления липидов и белков, а также является эффективным при ингибировании открытия МРТР в митохондриях сердца старых крыс. Исследуемый комплекс может быть рекомендован для коррекции и предупреждения нарушения биоэнергетических процессов, чрезмерной интенсификации процессов окисления липидов и белков и развития митохондриальной дисфункции при различных патологических состояниях сердечно-сосудистой системы, а также в условиях старения организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lopes G.S., Mora O.A., Cerri P.* (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1658**, 187-194.
2. *Kwong L.K., Shoal R.S.* (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 16-22.
3. *Kumaran S., Subathra M., Balu M., Panneerselvam C.* (2004) *Chemico-Biological interactions*, **148**, 11-18.
4. *Lenaz G.* (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 53-67.
5. *Ланкин В.З., Коркина О.В.* (2002) *Кардиология*, №12, 51-55.
6. *Лакомкин В.Л., Коновалова Г.Г., Каленикова Е.И.* (2004) *Биохимия*, **69**, 639-646.
7. *Kalen A., Appelkvist E.L., Dallner G.* (1989) *Lipids*, **24**, 579.
8. *Beyer R.E., Burnett B., Cartwright K.J.* (1985) *Mech. Aging Dev.*, **32**, 267-281.
9. *Донченко Г.В.* (1988) *Биохимия убихинона*, Наукова думка, Киев.
10. *Turunen M., Olsson J., Dallner G.* (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1660**, 177-199.
11. *Meng Q., Wong Y.T., Chen J., Ruan R.* (2007) *Mech. Aging Dev.*, **128**, 286-292.
12. *Ланкин В.З., Тухазе А.К., Беленков Ю.Н.* (2004) *Кардиология*, №2, 72-81.

13. *Sohal R.S., Forster M.J.* (2007) Mitochondrion, **7S**, S103-S111.
14. *Mabuchi H., Nohara A., Kobayashi J.* (2007) Atherosclerosis, **195**, e182-e189.
15. Спосіб відновлення та активації ендогенних систем біосинтезу та функціонування убихінону в організмі / Донченко Г.В., Кузьменко І.В., Петухов Д.М., Кліменко К.П. Патент 73433 Україна 7 А61К31/192, 31/355, А61Р3/00 заявл. 14.01.2004, опубл. 15.07.2005 Бюл. №7.
16. Комплексний препарат для підвищення внутрішньоклітинного енергетичного обміну в організмі / Донченко Г.В., Кузьменко І.В., Кучменко О.Б., Петухов Д.М. Патент 82639, Україна, А61К31/355 – заяв. 26.09.2006, опубл. 25.04.2008. Бюл. №8.
17. *Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д.* (1985) Биохимия, **50**, 1350-1361.
18. *Донченко Г.В.* (1986) Регуляция витамином Е обмена и функций убихинона (Q), Дисс. докт. биол. наук, Институт биохимии им. А.В. Палладина АН УССР, Киев.
19. *Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
20. *Донченко Г.В., Коваленко В.Н., Забарная Е.Н.* (1979) Биохимия, **44**, 923–930.
21. *Hatefi Y., Rieske J.S.* (1967) Methods Enzymol., **10**, 235–239.
22. *Ziegler D., Doeg K.A.* (1967) Methods Enzymol., **10**, 231–235.
23. *Гулидова Г.П., Сорокина И.Н.* (1967) Бюлл. exper. биол. мед., **63**, 41-44.
24. *Стальная И.Д.* (1977) В кн.: Современные методы в биохимии (ред. В.Н. Орехович), Медицина, Москва, с. 63-64.
25. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* (1977) В кн.: Современные методы в биохимии (ред. В.Н. Орехович), Медицина, Москва, с. 44–46.
26. *Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А.* (1995) Вопросы мед. химии, **41**, 24-26.
27. *Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Струтинская Н.А., Рудык О.В.* (2004) Фізіологічний журнал, **50**, 49-63.
28. *Filburn C.R., Edris W., Tamatani M.* (1996) Mech. Aging Dev., **87**, 35-46.
29. *Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Рудык О.В., Добровольский Ф.В., Шиманская Т.В., Медведев О.С.* (2007) Фізіологічний журнал, **53**, 35-42.

Поступила: 13. 05. 2008.

EFFECT OF COMPLEXES OF PRECURSORS AND MODULATORS OF COENZYME Q BIOSYNTHESIS ON FUNCTIONAL STATE OF OLD RATS' HEART MITOCHONDRIA

*E.B. Kuchmenko¹, D.N. Petukhov¹, G.V. Donchenko¹, L.S. Mkhitarian², S.V. Tymoshchuk³,
N.A. Strutynskaya³, G.L. Vavilova³, V.F. Sagach³*

¹Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Leontovicha str, 9, Kyiv, 01601 Ukraine;
fax: (+38-044) 234-71-78; e-mail: kuchmeb@yahoo.com

²National Scientific Center "Strazhesko Institute of Cardiology" of AMS of Ukraine,
Nardnogo Opolchennya, 5, Kyiv, 03151 Ukraine; fax: (+38-044) 275-42-09;
e-mail: laura_mkhitarian@ukr.net

³Bogomoletz Insitute of Physiology of NAS of Ukraine, Bogomol'tzya str, 4, Kyiv, 01024 Ukraine;
fax: (+38-044) 256-20-00; e-mail: sni-tymoshchuk@biph.kiev.ua

Our research demonstrate that ageing leads to changes in activity of electron-transporting enzyme complexes in myocardial mitochondria of old rats and to increased sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to inductors of its opening - Ca^{2+} and phenylarsine oxide. We also observed activation of lipid and protein free-radical peroxidation processes.

Administration of a complex of biologically active substances that included precursors and modulators of coenzyme Q biosynthesis (α -tocopherol acetate, 4-hydroxybenzoic acid, and methionine) we observed the increase in coenzyme Q content, correction of functional activity of mitochondrial electron-transport chain enzyme complexes, the decrease in intensivity of lipid and protein free-radical peroxidation in the heart and the decrease in sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to inductors of its opening. This complex may be used to treat mitochondrial dysfunction under numerous pathologies of cardiovascular system, as well as in ageing.

Key words: coenzyme Q (ubiquinone), old animals, lipid and protein free-radical peroxidation, mitochondrial permeability transition pore.