

## ВЛИЯНИЕ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ НА РАЗОБЩАЮЩИЙ ЭФФЕКТ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ

М.Н. Тутукина, О.Ю. Фоменко, В.Н. Попов

*Воронежский государственный университет*

Изучались механизмы разобщающего эффекта жирных кислот (ЖК) в митохондриях и возможное участие разобщающих белков в антиоксидантной защите клетки. Было показано, что пуриновые нуклеотиды, добавленные после ингибитора АТР/АДР-антипортера – карбосиатрактилата, не вызывают дальнейшего ресопряжения. Этот факт позволяет сделать вывод о том, что нуклеотид-чувствительная  $H^+$ -проводимость в митохондриях клубней картофеля обеспечивается преимущественно работой АТР/АДР-антипортера. На митохондриях животных и растений было показано, что добавление малых концентраций  $H_2O_2$  приводило к значительному снижению активности аконитазы. АТР обладал ярко выраженным протекторным эффектом. Добавление же GDP усиливало степень ингибирования аконитазы, что подтверждает ключевую роль разобщающих белков в защите клетки от АФК.

### ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в регуляции жизнедеятельности клетки играют процессы так называемого «свободного окисления». Под этим термином понимают как первично не сопряженное с запасанием энергии, так и разобщенное дыхание. Ключевое значение в разобщении окислительного фосфорилирования принадлежит белкам семейства анионных митохондриальных переносчиков, главными членами которого являются специальные разобщающие белки (UCP), локализованные во внутренней мембране, и АТР/АДР-антипортер. Известно, что в митохондриях сердца разобщающий эффект ЖК почти полностью опосредован антипортером. Согласно гипотезе Скулачева [1], его механизм сводится не только к трансмембранному переносу анионов ЖК, но и к их протонированию в активном центре переносчика. Помимо работы АТР/АДР-антипортера, повышение протонной проводимости может достигаться активацией разобщающих белков. UCP переносят протоны через липидный бислой, и этот процесс активируется их взаимодействием с анионами жирных кислот. Причём такая протонная проводимость ингибируется пуриновыми нуклеотидами. Разобщающие белки были обнаружены практически во всех тканях млекопитающих, кроме печени. Разобщающий белок был найден и в растениях (PUMP, StUCP) [2]. Наряду с терморегуляцией, одной из возможных функций свободного окисления считается его роль в регуляции метаболизма АФК.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования использовались митохондрии, выделенные из печени и почек лабораторных крыс (содержащихся на обычном рационе вивария) и клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.). Растительные митохондрии были изолированы с использованием градиента перколла по модифицированной методике Wagner et al [3]. Для выделения митохондрии из животных тканей использовали описанную ранее методику [4].

Активность аконитатгидратазы определяли спектрофотометрически на СФ-46. Методика изучения ингибирования фермента экзогенными АФК и условия спектрофотометрирования близки к описанным в [5]. Для изучения влияния пуриновых нуклеотидов к среде инкубации с митохондриями добавляли GDP и АТР в количествах 50  $\mu$ M, 1мM и 2мM соответственно. Для исключения влияния на активность изучаемых ферментов мембранного потенциала во все среды добавляли олигомицин. Мембранный потенциал митохондрий измерялся с использованием сафранинового метода (пара длин волн 555-523 нм) [6]. Для ингибирования АТР/АДР-антипортера использовали 1мM карбоксилат и 10мM атрактилат.  $H^+$ -АТФаза ингибировалась 1мM олигомицином, для выключения I комплекса ЭТЦ добавляли 2мM ротенон. Определение активности разобщающего белка осуществляли с помощью 250мM GDP. В качестве разобщителей использовали 20мM раствор лауриновой кислоты в этаноле и 10мM динитрофенол (ДНФ). Для связывания эн-

догенных жирных кислот использовался бычий сывороточный альбумин (БСА).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами изучались механизмы разобщающего эффекта жирных кислот (ЖК) в растительных митохондриях и возможное участие разобщающих белков в антиоксидантной защите клетки.

На митохондриях картофеля было показано, что индуцированное лауриновой кислотой понижение мембранного потенциала нечувствительно к GDP в концентрации 250  $\mu\text{M}$ .

ADP эффективно респрогял митохондрии: даже 5  $\mu\text{M}$  ADP значительно увеличивал  $\Delta\Psi$  (рис. 1). Ингибитор АТР/ADP-антипортера – карбоксиатрак-

тиллат вызывал дальнейшее увеличение  $\Delta\Psi$  (при добавлении после ADP). Добавление карбоксиатрактилата перед лауриновой кислотой также вызвало респрогяющий эффект. GDP и ADP не давали никакого эффекта на фоне карбоксиатрактилата. Были сравнены эффекты карбоксиатрактилата и атрактилата на активность ADP / АТР-антипортера. Было исследовано влияние ADP на  $\Delta\Psi$  в среде, дефицитной по олигомицину. Атрактиллат не полностью ингибировал ADP- зависимое снижение  $\Delta\Psi$ ; оно ингибировалось последующим внесением в среду инкубации олигомицина

Было показано, что 200 $\mu\text{M}$  АТР имеет одинаковый с ADP респрогяющий эффект.

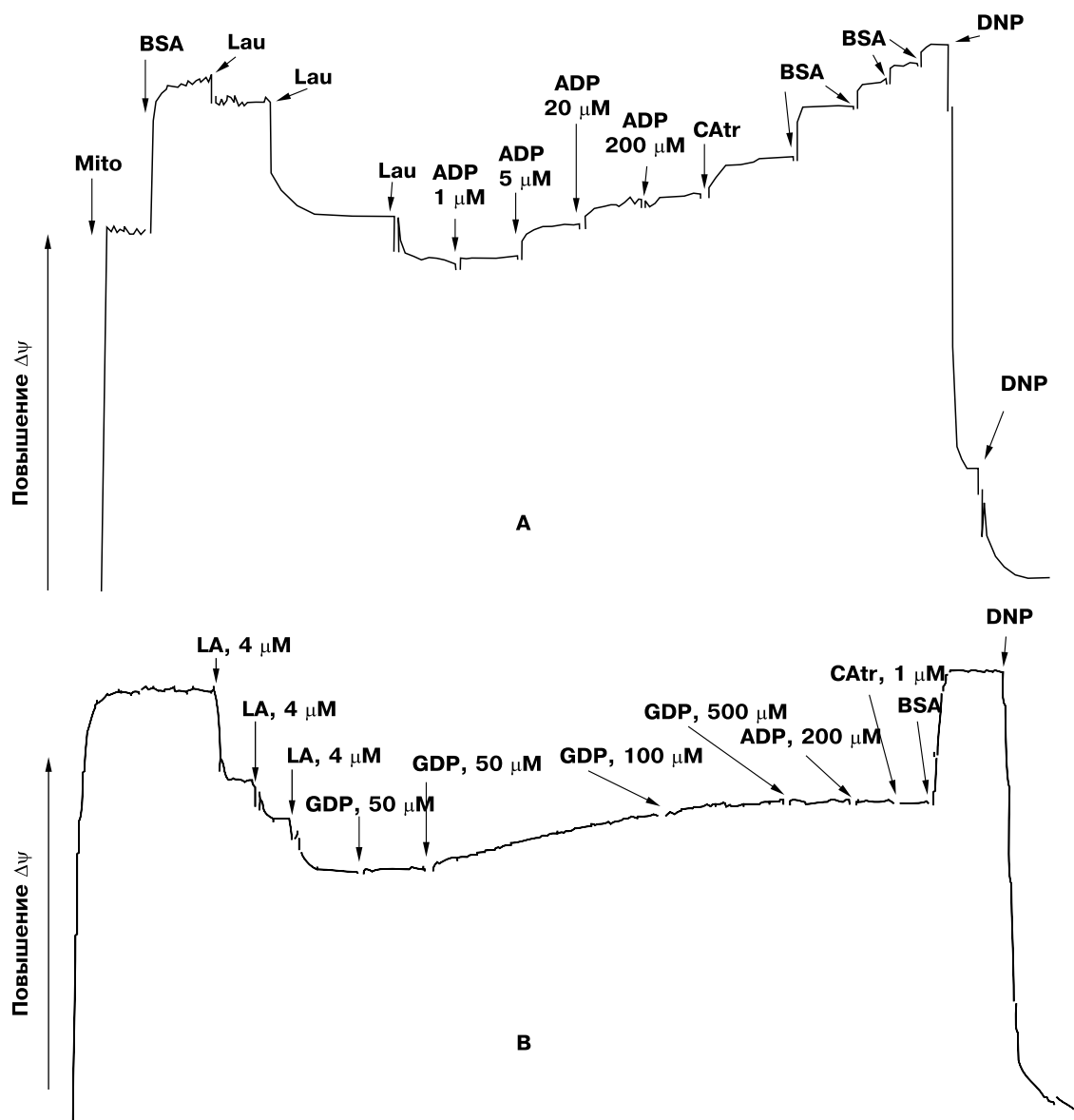


Рис. 1. Влияние пуриновых нуклеотидов на разобщение в митохондриях. Добавки: Lau – 10  $\mu\text{M}$  лаурат; CAttr – 1  $\mu\text{M}$  карбоксиатрактиллат; DNP – 100  $\mu\text{M}$  динитрофенол; BSA – 0, 5 мг/мл бычий сывороточный альбумин

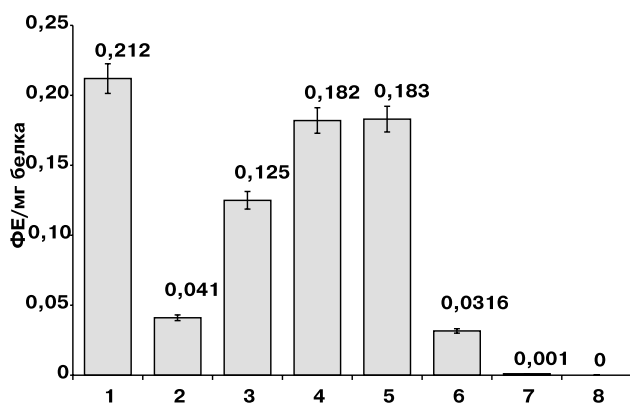


Рис. 2. Влияние пуриновых нуклеотидов на ингибирование аконитазы из клубней картофеля пероксидом водорода: Добавки: 1- контроль, 2 – 20 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 мкМ АТР, 4 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 мМ АТР, 5 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 мМ АТР, 6 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 мкМ GDP, 7 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 мМ GDP, 8 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 мМ GDP

GDP в концентрации до 250 мкМ не увеличивал ΔΨ в присутствии лаурата (рис. 1). 5 мкМ UDP не увеличивал ΔΨ, но 250 мкМ UDP вызывал ресопрягающий эффект подобно ADP, когда добавлялся после лауриновой кислоты. 250 мкМ UDP не увеличивал ΔΨ в присутствии карбоксиатрактилата. Однако UDP не влиял на ΔΨ в среде инкубации без олигомицина. Это показывает, что ресопрягающий эффект UDP не может быть объяснен наличием примесей ADP в препарате. Таким образом, пуриновые нуклеотиды, добавленные после САтг, не вызывают дальнейшего ресопряжения. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что нуклеотид-чувствительная H<sup>+</sup>-проводимость в митохондриях клубней картофеля обеспечивается преимущественно работой АТР/ADP-антипортера.

Снижение Δψ при разобщении может быть одним из механизмов регуляции образования АФК в митохондриях. Другим механизмом, согласно гипотезе В. П. Скулачева [7], является «мягкое» разобщение дыхания и фосфорилирования путем повышения протонной проводимости митохондриальной мембраны в состоянии 4. Повышение протонной проводимости может достигаться активацией разобщающих белков митохондриальной мембраны (UCP, StUCP). Нами исследовалось влияние пуриновых нуклеотидов на ингибирование аконитатгидратазы экзогенным пероксидом водорода в митохондриях картофеля (где мало UCP), митохондриях почек (которые характеризуются высоким содержанием UCP в мембране) и печени (где UCP нет).

В ходе эксперимента было выяснено, что добавление 1 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к суспензии митохондрий из клуб-

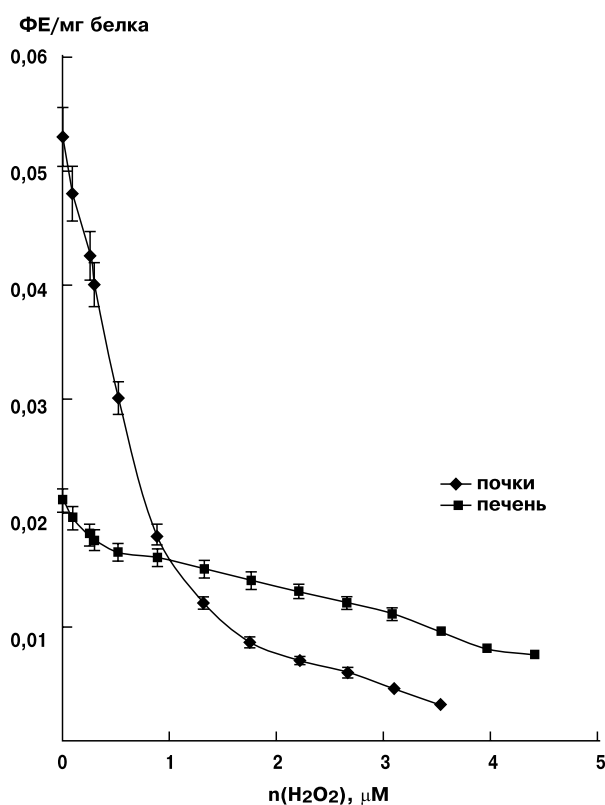


Рис. 3. Зависимость активности АГ из печени и почек крыс от концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ней картофеля с последующей инкубацией в течение 15 минут приводило к снижению активности АГ на 70% во фракции митохондрий и микротеллец и на 82% в чистой митохондриальной фракции. Добавление же к среде инкубации уже 50 мкМ АТР приводило к уменьшению степени ингибирования в 3 раза, в то время, как активация самого фермента не превышала 3% (рис. 2). Добавление к среде с митохондриями и пероксидом GDP усиливало степень ингибирования фермента, и при концентрации GDP 2 мМ активность аконитазы полностью терялась. Эти данные подтверждают гипотезу о возможном участии UCP (StUCP в данном случае) и антипортера в транспорте АФК через мембрану.

В опытах на митохондриях из печени крыс было выяснено, что локализованная в них аконитаза более устойчива к ингибированию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, чем фермент из почек (рис. 3). Подобная стабильность АГ по отношению к пероксиду может объясняться отсутствием в мембране митохондрий печени разобщающих белков, способствующих переносу АФК. Добавление АТР приводит к ослаблению ингибирования фермента на 35-40% (причем как в печени, так и в почках) (рис. 4). При добавлении GDP с пероксидом к митохондриям печени никаких изменений в активности по сравнению с конт-

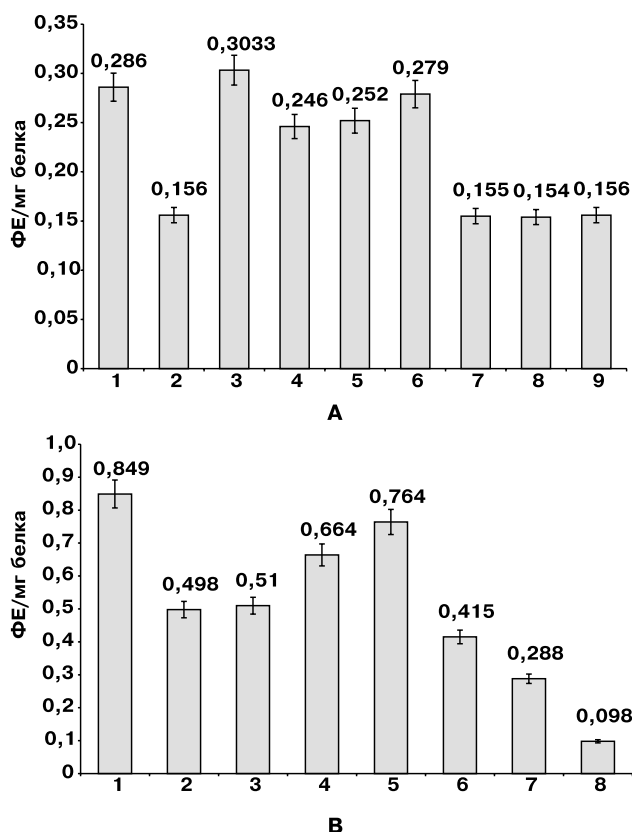


Рис. 4. Сравнение влияния АТР и GDP на ингибиторный эффект пероксида водорода по отношению к активности аконитазы из митохондрий печени (А) и почек (В) крыс.

Добавки: 1 – контроль, 2 – 20 М  $H_2O_2$ , 3А – 1мМ АТР, 4А (3В) –  $H_2O_2$  + 50 μМ АТР, 5А (4В) –  $H_2O_2$  + 1мМ АТР, 6А (5В) –  $H_2O_2$  + 2мМ АТР, 7А (6В) –  $H_2O_2$  + 50 μМ GDP, 8А (7В) –  $H_2O_2$  + 1мМ GDP, 9А (8В) –  $H_2O_2$  + 2мМ GDP.

ролем практически не наблюдалось, в то время как добавление GDP с пероксидом к митохондриям почек приводило к снижению активности АГ до 90%. Это также может объясняться отсутствием УСР в печени и наличием их в почках и свидетельствует о верности гипотезы об их участии в метаболизме АФК.

Чем может объясняться сенсibiliзирующий эффект GDP по отношению к аконитазе? Согласно гипотезе В. П. Скулачева [8]. УСР перекачивает через мембрану соединения, образующиеся в ходе взаимодействия ЖК с пероксидом водорода, то есть в основном пероксиды липидов, но, частично, и пероксид водорода. Таким образом, подобный эффект GDP может объясняться тем, что он блокирует работу УСР, что приводит к накоплению внутри митохондрий АФК, которые и являются поражающим агентом по отношению к аконитатгидратазе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные по механизмам разобщающего действия ЖК в растительных митохондриях и по влиянию пуриновых нуклеотидов на ингибирование аконитазы экзогенным пероксидом водорода подтверждают гипотезу об участии разобщающих белков и АТР/АДР антипортера в транспорте АФК через мембрану. Это говорит о том, что они играют важную роль в регуляции метаболизма АФК как в организме животных, так и растений и являются важным звеном защиты клетки от кислородной опасности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Andreyev A. Yu.* The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. / A. Yu. Andreyev, T.O. Bondareva, V.I. Deduchova, E.N. Mokhova, V.P. Skulachev, L.M. Tsofina, N.I. Volkov, and T.V. Vygodina // Eur.J.Biochem. – 1989. – V.182. – P.585-592.
2. *Vercesi A.E.* Pumping plants. / A.E. Vercesi, I.S. Martins, M.A.P. Silva// Nature. – 1995. – V.375. – P.24.
3. *Wagner A.M.* Plant Mitochondria: from Gene to Function. / A.M. Wagner, A.C. Purvis // Backhuys Publishers, Leiden. – 1998. – P. 537-541.
4. Практикум по биохимии / под ред. Н.П. Мешковой и ак. С.Е. Северина. Изд. МГУ. 1979. – 428с.
5. *Echtay K.S.* Superoxide Activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. / K.S. Echtay, M.P. Murphy, R.A.J. Smith, D.A. Talbot, and M.D. Brand // J. Biol. Chem. – 2002. – V.277. № 49. – P.47129-47135.
6. *Akerman K.E.O.* Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. / K.E.O. Akerman, M.F.K. Wikstrom // FEBS Lett. – 1976. – V.68(2). – P.191-197.
7. *Скулачев В.П.* Снижение внутриклеточной концентрации  $O_2$  как особая функция дыхательных систем клетки / В. П. Скулачев // Биохимия. – 1994. – Т.59, вып.12 – С.1910-1912
8. *Goglia F.* A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. / F. Goglia, V.P. Skulachev // FASEB J. – 2003. – V.17. – P. 1585-1591.