

ЭФФЕКТ ТЕРПЕНОИДОВ НА РЕСПИРАТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Чёрная М.Н., Заводник И.Б.

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
кафедра биохимии, г. Гродно*

Ключевые слова: респираторная активность, митохондрии, ферутинин.

Резюме: продемонстрирован эффект биологически активного соединения, ферутинина, на респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс.

Resume: the effect of a biologically active compound, ferutinin, on the respiratory activity of isolated rat liver mitochondria has been demonstrated.

Актуальность. Митохондрии, динамичные и пластичные органеллы, представляют удобную модель клеточной подсистемы, позволяющей оценить механизмы и закономерности ключевых метаболических процессов и способы регуляции важнейших функций клетки в норме и при патологии. Митохондрии вовлечены во множество метаболических и регуляторных процессов: окислительное фосфорилирование, кальциевый гомеостаз, клеточную сигнализацию. Нарушения структуры и функции митохондрий приводят к различным патологиям. Митохондрии являются основным сенсором, регулятором и депо накопления ионов кальция в клетке. Для тонкой регуляции кальциевого сигнала в клетке существует широкий спектр молекул-мишеней, индуцирующих и декодирующих изменения концентрации Ca^{2+} в клетке (помпы, каналы, Ca^{2+} -связывающие белки, Ca^{2+} -зависимые ферменты, локализованные как в цитоплазме, так и в органеллах). Определяющую роль играют ионы Ca^{2+} в развитии апоптоза, инициируя формирование пор высокой проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) в митохондриальной мембране и истечение апоптотических факторов [1]. В цитоплазме клетки концентрация ионов Ca^{2+} очень низка и составляет величину порядка 50-100 нМ (продолжительное, в течение десятков минут, повышение содержания ионов Ca^{2+} в цитоплазме клетки (до 10^{-5} М) приводит к гибели клетки). Цитотоксичность, обусловленная такими патологиями, как ишемия-реперфузия, эксайтотоксичность, как известно, включает в себя патофизиологическое возрастание внутриклеточной концентрации кальция и другие митохондрио-опосредованные процессы. Посредством кальциевого унипортера происходит аккумуляция в митохондриях избыточного цитозольного кальция, высвобождение кальция происходит посредством натрий/кальциевого и кальций/протонного антипортеров. Регулируя кальциевый гомеостаз в клетке, митохондрии контролируют важнейшие клеточные функции. Митохондрии сопряжены с клеточной редокс - биохимией, под которой понимают сложную сеть окислительно-восстановительных реакций, определяющих многие ключевые процессы в клетке. Ранее мы показали возможность специфического регулирования (модулирования) природными редокс-активными соединениями (полифенолы, соответствующие хиноны, терпеноиды, танины, мелатонин, окислительные агенты) потенциально проапоптотического процесса формирования пор высокой проницаемости (МРТР)

на уровне одиночных митохондриальных каналов [2]. В качестве возможного регулятора редокс-баланса и функционального состояния митохондрий мы выбрали биологически активные соединения природного происхождения – сесквитерпены. Сесквитерпены (от сескви-, «полтора», также полутерпены) – самая обширная группа среди всех терпеноидов как по количеству соединений, обнаруженных в природных источниках (их несколько тысяч), так и по множеству структурных вариантов и разнообразию строения углеродного скелета [6]. В состав сесквитерпенов входят углеводороды $C_{15}H_{24}$ (три изопреновых блока), а также их кислородные производные (спирты, альдегиды, кетоны). Терпеноиды являются классом соединений с высокой химиотерапевтической активностью. Одним из таких соединений является ферутинин, сесквитерпен, изолированный из растения рода *Ferula* (family Umbelliferae). Ферутинин (4-окси-6-(4-оксибензоилокси) децен-8,9), эфир сесквитерпенового спирта с пара-гидроксibenзойной кислотой. Предполагается, что ферутинин, обладающий цитотоксической и проапоптотической активностью в различных линиях онкоклеток, может рассматриваться как эффективный противораковый агент. Для некоторых сесквитерпенов показана генерация радикалов в клетках линий НСТ116 и К562 [2].

Цель: оценить эффекты реакционноспособного соединения, ферутинина, на респираторную активность митохондрий в отсутствие и в присутствии ионов кальция, а также возможность коррекции ферутинином нарушений функциональной активности митохондрий.

Задачи: 1. Выяснить механизмы регуляции терпеноидами респираторной активности митохондрий в присутствии и отсутствии ионов кальция; 2. Оценить возможность регуляции ферутинином функциональной активности митохондрий.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись митохондрии печени крыс. Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования [3]. Печень быстро извлекали на холоду (4°C), осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе (тефлон-стекло) (600 об/мин, 1 мин) в охлажденной среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,02 М Трис-НСl, рН 7,2. Ядерную фракцию удаляли центрифугированием при 600 g в течение 10 мин при 4 °С. Для осаждения митохондрий полученный супернатант центрифугировали при 8500 g в течение 10 мин при 4 °С, далее митохондриальный осадок дважды промывали в среде выделения при 4 °С и ресуспендировали в среде выделения таким образом, чтобы концентрация белка составила 40-50 мг/мл. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [5]. Потребление кислорода митохондриями измеряли полярографически, используя термостатируемую ячейку объемом 3 мл и электрод Кларка (Oxytherm plus, Hansatech Instruments, Great Britain) при 25°C в буфере дыхания, содержащем 175 mM сахарозы, 50 mM KCl, 10 mM фосфатный буфер, 20 mM Трис (рН 7,4), 2 mM MgSO₄ [4]. Терпеноид ферутинин был предоставлен профессором А. Саидходжаевым (Институт химии растительных веществ, Узбекистан). Рассчитывали скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях: скорость эндогенного (базального) дыхания, скорость субстрат-зависимого дыхания (глутамат/малат), скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием (после внесения 250 нм ADP), скорость дыхания после расхо-

дования добавленного ADP. Также рассчитывали показатели, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: коэффициент акцепторного контроля, ACR, коэффициент дыхательного контроля, RCR, и коэффициент фосфорилирования, ADP/O. Скорости дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях выражали в нанограммах-атомах кислорода в 1 мин в расчете на 1 мг белка митохондрий.

Результаты и их обсуждение. Мы изучили эффект ферутина на дыхательную активность митохондрий печени крыс. Нами продемонстрировано, что ферутинин в концентрации 5-27 мкМ повышал субстрат-зависимое (глутамат/малат) дыхание и уменьшал АТР-зависимое дыхание изолированных из печени крыс митохондрий, что приводило к уменьшению коэффициента акцепторного контроля, ACR, и коэффициента фосфорилирования, ADP/O. Таким образом, терпеноид ферутинин взаимодействуя с электрон-транспортной цепью митохондрий индуцировал разобщение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях и уменьшал эффективность процесса дыхания. В присутствии 20 мкМ Ca^{2+} в среде, эффекты ферутина на дыхательную активность митохондрий возрастали.

Выводы: 1. Мы можем заключить, что ферутинин влиял на дыхательную активность митохондрий как Ca^{2+} -ионофор, приводя к ингибированию ADP-стимулированного потребления кислорода; 2. В то же время, на основании полученных данных можно предположить протонофорный эффект ферутина.

Литература

1. D. N. Bowser, T. Minamikawa, P.p Nagley, and D. A. Williams. Role of Mitochondria in Calcium Regulation of Spontaneously Contracting Cardiac Muscle Cells. *Biophysical Journal*, Vol. 75. – 1998, 2004-2014.
2. Ferutinin induces membrane depolarization, permeability transition pore formation and respiration uncoupling in isolated rat liver mitochondria by stimulation of Ca^{2+} -permeability / T. Ilyich [et al.] // *J Membr Biol.* – 2018. – Vol. 251. – P. 563-572.
3. Johnson, D. Isolation of liver or kidney mitochondria / D. Johnson, H. A. Lardy // *Methods in Enzymology.* – 1967. – Vol. 10. – P. 94–101.
4. Oxygen-related processes in red blood cells exposed to tert-butyl hydroperoxide / I. K. Dremza [et al.] // *Redox Report.* – 2006. – Vol. 11, № 4. – P. 185–192.
5. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
6. Племенков, В.В. Химия изопреноидов. Глава 6. Сесквитерпены / В.В. Племенков // *Химия растительного сырья.* – 2006. – №4. – С. 59-86.