

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СУКЦИНАТА НА ИНДУЦИРОВАННОЕ ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2015 г. Е.В. Гришина, Я.В. Хаустова, А.А. Васильева, Е.И. Маевский

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

*E-mail: grishina\_lena@rambler.ru*

Поступила в редакцию 09.06.15 г.

Исследовано влияние сукцината и 3-гидроксипутирата на кинетику перекисного окисления липидов, индуцированного АТФ- $Fe^{2+}$ -комплексом в изолированных митохондриях печени старых (1,0–1,5 года) и молодых (3 месяца) самцов крыс. С этой целью полярографически регистрировали скорость индуцированного в митохондриях печени крыс перекисного окисления липидов  $V_{ПОЛ}$  и определяли полувремя максимального потребления кислорода  $\Delta t_{50}$ , включающее лаг-период и фазу инициации. В отсутствие экзогенного субстрата  $V_{ПОЛ}$  в митохондриях старых животных была несколько выше, а запуск каскада перекисного окисления липидов происходил значительно раньше, чем у молодых животных. Инкубация интактных митохондрий с 5 мМ сукцината в течение 1 мин снижала  $V_{ПОЛ}$  на 15 и 35% у молодых и старых животных соответственно, однако только в митохондриях старых животных происходило увеличение  $\Delta t_{50}$  на 19%. При окислении 3-гидроксипутирата скорость перекисного окисления липидов в митохондриях молодых животных заметно не менялась, тогда как в митохондриях старых животных она понизилась на 19% вместе с незначительным увеличением  $\Delta t_{50}$ . Для моделирования возрастной дисфункции изолированные митохондрии повреждали серией циклов замораживания-оттаивания, что приводило к значительному увеличению  $V_{ПОЛ}$  у обеих возрастных групп. Окисление сукцината во всех случаях снижало  $V_{ПОЛ}$  в поврежденных митохондриях на 56% по сравнению с  $V_{ПОЛ}$  в отсутствие субстратов и двукратно увеличивало  $\Delta t_{50}$  у молодых животных. Окисление 3-гидроксипутирата не влияло на  $V_{ПОЛ}$  поврежденных митохондрий обеих возрастных групп, но увеличивало  $\Delta t_{50}$  на 48% в митохондриях молодых животных. Таким образом, антиоксидантный эффект окисления сукцината может предотвращать повреждение митохондрий при перекисном окислении липидов и оказывать геропротекторное действие на стареющие митохондрии. Добавление любого из субстратов к фосфолипидной эмульсии не влияло на параметры перекисного окисления липидов. Следовательно, антиоксидантный эффект обусловлен процессом окисления самих субстратов в дыхательной цепи, а не прямым взаимодействием их с липидами мембран.

*Ключевые слова:  $Fe^{2+}$ -индуцированное перекисное окисление липидов, митохондрии печени крыс, эффект сукцината и 3-гидроксипутирата.*

Наиболее широко принята теория, что старение является результатом разрушения структуры и функции живых систем под действием свободных радикалов. Эта теория была впервые предложена в 1956 г. [1] и объясняет механизм многих симптомов старения и различных сердечно-сосудистых заболеваний, иммуносупрессии, дисфункции мозга и нейроэндокринной системы, катаракты, рака и т.д. В здоровых организмах физиологический уровень свобод-

ных радикалов регулируется балансом про- и антиоксидантных систем. В работе [2] была предложена идея, с помощью которой становится возможным замедлить процесс старения путем предотвращения генерации активных форм кислорода (АФК) в митохондриях при старении.

Сукцинат представляет особый интерес как геропротектор [3]. Было показано, что экзогенный сукцинат предотвращает инактивацию сукцинанатдегидрогеназы (СДГ), вызываемую перекисным окислением липидов (ПОЛ), индуцированным  $Fe^{2+}$  [4,5]. Ингибирование СДГ вызывает генерирование супероксидных радикалов в митохондриях и апоптоз [6]. Перокси-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, СДГ – сукцинанатдегидрогеназа, ПОЛ – перекисное окисление липидов, МПК – митохондрии печени крыс, 3-ГБ – 3-гидроксипутират.

дальняя активность увеличивается, когда цикл Кребса ингибируется малонатом на уровне СДГ [7]. Кроме того, антиоксидантный эффект нелатирующих субстратов, таких как сукцинат, полностью аннулируется при кипячении или обработке гомогената цианидом [7]. Активные органические прооксиданты ингибируют потребление кислорода выделенными митохондриями печени крыс (МПК), в частности, окисление 2-оксоглутарата, пирувата и глутамата, тогда как окисление сукцината более устойчиво к этому ингибирующему эффекту и может способствовать защите липидов мембран митохондрий от ПОЛ [8].

До сих пор антиоксидантные свойства субстратов цикла Кребса изучали в жестких прооксидантных системах, главным образом, в мембранах митохондрий молодых животных. Более того, в ранних исследованиях интенсивность ПОЛ в митохондриях измеряли путем накопления тиобарбитурат-зависимых продуктов после длительной инкубации в прооксидантных условиях [4,7,9]. Это позволяет оценить только интегральный выход процесса ПОЛ без регистрации его кинетики. Известно, что тиобарбитурат взаимодействует с большим числом субстратов, которые связаны не только с ПОЛ, что также искажает общие результаты [10]. Мы оценивали антиоксидантный эффект субстрата по кинетике ПОЛ в выделенных МПК. Процесс ПОЛ был индуцирован АТФ- $\text{Fe}^{2+}$ -комплексом в течение нескольких минут [11]. Мы выбрали негемовое железо как более физиологический прооксидантный агент, так как существуют свидетельства возраст-зависимого накопления негемового железа в тканях животных, которое, в свою очередь, нарушает клеточный гомеостаз и вызывает ряд дисфункций митохондрий, включая активацию ПОЛ [12,13]. Мы использовали тот же индуктор для определения возможного антиоксидантного эффекта субстрата на ПОЛ в модельной системе фосфолипидной эмульсии. Было показано, что антиоксидантные эффекты субстратов, особенно сукцинат, более выражены в обеих возрастных группах и наиболее значимы в разрушенных митохондриях. Добавление сукцината продуцирует антиоксидантный эффект путем ингибирования  $V_{\text{ПОЛ}}$  в интактных и поврежденных МПК обеих групп животных в разной степени. Антиоксидантный эффект сукцината более выражен в поврежденных митохондриях молодых животных, в то время как 3-гидроксибутират (3-ГБ) фактически не проявлял антиоксидантного эффекта для МПК обеих групп.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

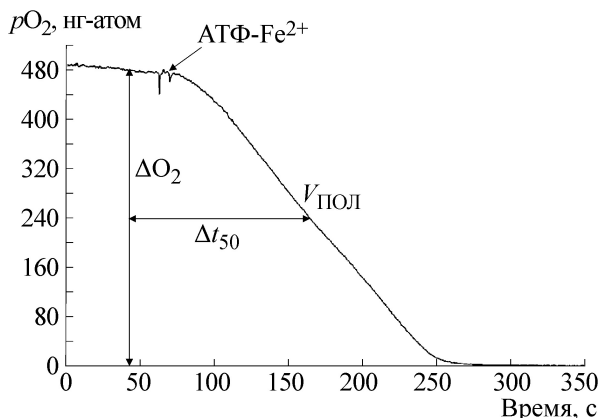
**Реагенты.** В опытах были использованы следующие реагенты: сахароза (PRS, Испания), KCl (USB, США),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  (ultra-pure reagents, Россия), EGTA, HEPES, трис (Serva, Германия), сукцинат (Sigma, США), глутамат (Sigma, США), 3-ГБ (Sigma, США), фосфатидилхолин (S-100, Германия).

**Выделение митохондрий.** МПК были выделены из печени крыс самцов линии Sprague Dawley методом дифференциального центрифугирования по стандартной методике [14]. Возраст молодых животных (200–250 г) составлял три месяца, старых животных (400–500 г) – 24–30 месяцев. Среда выделения содержала 0,3 М сахарозы, 10 мМ HEPES (pH 7,4), 1 мМ EGTA. МПК отмывали в среде выделения без EGTA. Полученные МПК имели показатель дыхательного контроля более 4,0 при окислении сукцината. Концентрацию белка митохондрий измеряли биуретовым методом.

**Приготовление эмульсии фосфолипидов.** Эмульсию 10% фосфатидилхолина в воде готовили с помощью гомогенизатора высокого давления APV-1000 (SPX, Великобритания). Размер частиц эмульсии был определен с использованием N5 Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter, США).

**Определение активности фосфорилирующего дыхания в митохондриях печени крыс.** Дыхание МПК регистрировали полярографически с помощью закрытого кислородного электрода (электрод Кларка) в термостатируемой ячейке объемом 1 мл, при 27°C и постоянном перемешивании. Кинетику потребления кислорода фиксировали с помощью компьютеризированной многоканальной системы «Record 4» (ИБК РАН, Россия). Среда инкубации содержала 125 мМ KCl, 3 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 10 мМ HEPES (pH 7,4). Конечная концентрация митохондрий в ячейке составляла 1,5 мг белка/мл. В качестве субстрата окисления использовали 5 мМ сукцинат калия с 1 мМ глутаматом или 8 мМ 3-гидроксибутират (pH 7,3). Было зарегистрировано потребление  $\text{O}_2$  для различных метаболических состояний митохондрий: скорость  $V_2$ , которая зависит от утечки протонов и скорости окисления экзогенного субстрата без АДФ;  $V_3$  – скорость фосфорилирующего дыхания в присутствии 150 мкМ АДФ;  $V_4$  – скорость дыхания после фосфорилирования АДФ в АТФ. Показатель дыхательного контроля оценивали, согласно работе [15], как отношение  $V_3/V_4$ .

**Регистрация кинетики перекисного окисления липидов.** ПОЛ индуцировали комплексом



**Рис. 1.** Поларографическая регистрация потребления кислорода во время ПОЛ, индуцированного комплексом АТФ/Fe<sup>2+</sup> в суспензии интактных МПК молодых животных (1 мг белка) в среде без субстрата.

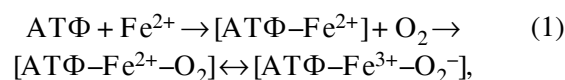
АТФ-Fe<sup>2+</sup> в интактных МПК или поврежденных органеллах после цикла замораживания-оттаивания. Часть изолированных МПК была заморожена при -20°C. Оттаивали МПК непосредственно перед измерением ПОЛ. Мы рассчитывали стадию инициации ПОЛ (сразу после добавления комплекса АТФ-Fe<sup>2+</sup>) и скорость фактического ПОЛ [11,16]. Этот метод регистрации отличается от традиционного метода хемилюминесценции и определения концентрации малонового диальдегида, в которых измеряется только интегральный выход ПОЛ. Это классический подход, который широко используется для изучения перекисного окисления липидов. Многие авторы показали, что накопление тиобарбитурат-зависимых продуктов во время ПОЛ соответствует количеству потребляемого кислорода в результате Fe<sup>2+</sup>-индуцированного ПОЛ [17–20]. Добавление комплекса АТФ-Fe<sup>2+</sup> к инкубированным при pH 7,4 митохондриям печени крыс изначально сопровождалось медленным потреблением кислорода, но после инициации каскада ПОЛ расход кислорода повышался (рис. 1). Инициация ПОЛ происходит, когда соотношение Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> становится равным 1:1 в течение лаг-периода [16,21].

Среда инкубации при регистрации ПОЛ содержала 175 мМ КСl и 10 мМ трис-НСl-буфера (pH 7,4). Суспензию МПК (1 мг/мл) инкубировали в течение 1 мин в среде инкубации без субстрата, в присутствии 5 мМ сукцината калия (флавинадениндинуклеотид-зависимого субстрата) вместе с 1 мМ глутамата калия (добавка глутамата предотвращала оксалоацетатное торможение СДГ) или с 8 мМ 3-гидроксибутирата (NAD-зависимого субстрата, не вступающего в цикл Кребса). Для инициации ПОЛ последо-

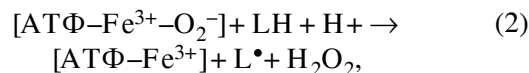
вательно добавляли АТФ (конечная концентрация 1,5 мМ) и свежеприготовленный раствор FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (100 мкМ). По каждой индивидуальной кривой вычисляли скорость ПОЛ (V<sub>ПОЛ</sub>) и рассчитывали полувремя максимального потребления кислорода (Δt<sub>50</sub>), которое включает в себя лаг-период, фазу инициации ПОЛ, и скорость начальной части ПОЛ-каскада. Суммированный параметр в большей степени зависит от продолжительности лаг-периода.

**Уравнения Fe<sup>2+</sup>-индуцированного ПОЛ и статистический анализ.** Fe<sup>2+</sup>-индуцированный процесс ПОЛ был описан в работе [22]. Он происходит в три стадии:

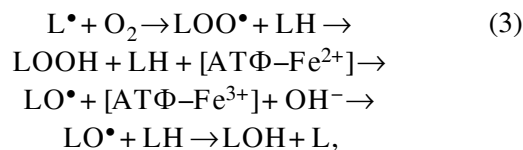
лаг-период:



инициация ПОЛ:



каскад ПОЛ:



где LH – ненасыщенная жирная кислота, LOOH – гидроперекись ненасыщенной жирной кислоты, L<sup>•</sup> – липидный радикал, LO<sup>•</sup> – липидный радикал спиртовой группы, LOO<sup>•</sup> – пероксирадикал. Наиболее медленной стадией является инициация ПОЛ, когда [Fe<sup>2+</sup>] становится равным [Fe<sup>3+</sup>] и ускоряется каскад ПОЛ. Мы регистрировали быстрое потребление кислорода во время ПОЛ-каскада (3). Полученные результаты обрабатывали методами параметрической статистики с использованием поправки Бонферрони. Различия считали значимыми при величине p < 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Оценка параметров дыхания митохондрий печени крыс молодых и старых животных.** При окислении сукцината V<sub>2</sub> в МПК старых животных такая же, как в МПК молодых животных (табл. 1). Однако при окислении 3-ГБ величина V<sub>2</sub> становится на 38% выше в МПК старых животных. В процессе фосфорилирующего дыхания в МПК старых животных скорости дыхания V<sub>3</sub> и V<sub>4</sub> понижались приблизительно на 25–30% независимо от субстрата. При этом

**Таблица 1.** Параметры дыхания МПК молодых и старых животных

Группы животных	Параметры дыхания			
	$V_2$	$V_3$	$V_4$	Показатель дыхательного контроля
Окисленные субстраты: сукцинат плюс глутамат				
Молодые ( $n = 9$ )	$25,6 \pm 1,6$	$151,3 \pm 5,3$	$31,1 \pm 2,0$	$4,9 \pm 0,3$
Старые ( $n = 10$ )	$26,1 \pm 0,9$	$105,0 \pm 4,4$	$23,8 \pm 1,1$	$4,4 \pm 0,2$
		$P_{M-C} < 0,001$	$P_{M-C} < 0,01$	
Окисленный субстрат: 3-гидроксибутират				
Молодые ( $n = 8$ )	$8,7 \pm 0,9$	$58,7 \pm 3,2$	$13,0 \pm 1,1$	$4,5 \pm 0,2$
Старые ( $n = 6$ )	$12,0 \pm 1,6$	$42,9 \pm 2,5$	$9,8 \pm 1,2$	$4,4 \pm 0,5$
	$P_{M-C} < 0,05$	$P_{M-C} < 0,01$		

Примечание:  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$  выражены в нг-атомах  $O_2$ /мин/мг белка,  $P_{M-C}$  – значение  $p$  при сравнении параметров МПК молодых животных со старыми.

**Таблица 2.** Потребление кислорода в процессе индуцированного ПОЛ в интактных МПК молодых и старых животных

Группы животных	$V_{ПОЛ}$	$\Delta t_{50}$
Без добавления субстрата		
Молодые ( $n = 8$ )	$148,1 \pm 8,2$	$166,9 \pm 1,1$
Старые ( $n = 10$ )	$156,4 \pm 5,8$	$103,3 \pm 5,5$
		$P_{M-C} < 0,001$
Окисленные субстраты: сукцинат плюс глутамат		
Молодые ( $n = 9$ )	$126,3 \pm 6,6$	$157,3 \pm 5,7$
Старые ( $n = 10$ )	$101,1 \pm 3,2$	$122,9 \pm 6,8$
	$P_{A-B} < 0,001$ ; $P_{M-C} < 0,001$	$P_{A-B} < 0,05$ ; $P_{M-C} < 0,01$
Окисленный субстрат: 3-гидроксибутират		
Молодые ( $n = 8$ )	$135,7 \pm 9,3$	$170,9 \pm 7,5$
Старые ( $n = 5$ )	$126,6 \pm 5,1$	$111,5 \pm 5,9$
		$P_{M-C} < 0,001$

Примечание:  $V_{ПОЛ}$  выражена в нг-атомах  $O_2$ /мин/мг белка,  $\Delta t_{50}$  – в секундах,  $P_{M-C}$  – значение  $p$  при сравнении параметров МПК молодых животных со старыми и  $P_{A-B}$  – при сравнении параметров МПК в варианте «без субстратов» с вариантом «сукцинат плюс глутамат».

величина дыхательного контроля оставалась практически неизменной из-за однонаправленного изменения  $V_3$  и  $V_4$ .

**Оценка антиоксидантных свойств сукцината и 3-гидроксибутирата в митохондриях печени крыс.**  $V_{ПОЛ}$  в МПК старых животных, инкубированных без добавления субстратов, была слегка выше, чем у молодых животных (табл. 2).  $\Delta t_{50}$  в МПК старых животных снизилась на 38%. После добавления сукцината  $\Delta t_{50}$  увеличилась на 19% только в МПК старых животных. Добавление экзогенного сукцината привело к уменьшению  $V_{ПОЛ}$  на 15% в МПК молодых животных, тогда как ПОЛ в МПК старых жи-

вотных снизилось на 35% по сравнению с ПОЛ без экзогенного субстрата. Добавление 3-ГБ в МПК молодых животных фактически не влияло на  $V_{ПОЛ}$ , но в МПК старых животных понизило  $V_{ПОЛ}$  на 19% относительно потребления кислорода при осуществлении ПОЛ без добавления субстрата. Таким образом, сукцинат вызывал более выраженный антиоксидантный эффект в прооксидантных условиях на выделенных интактных МПК старых животных.

**Оценка антиоксидантных свойств сукцината и 3-гидроксибутирата в поврежденных митохондриях печени крыс.** Наши данные (табл. 3) свидетельствуют о том, что оба исследуемых

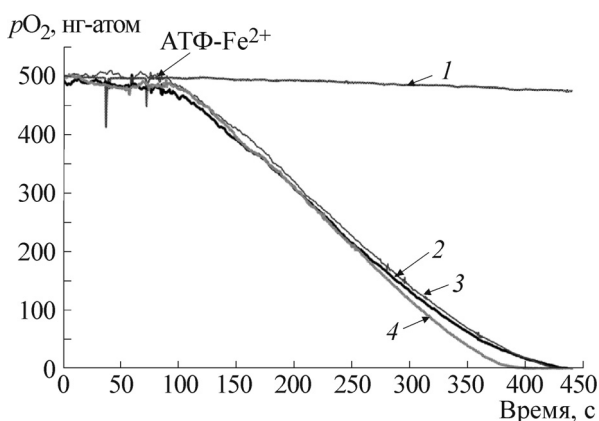
**Таблица 3.** Потребление кислорода в процессе индуцированного ПОЛ в поврежденных МПК молодых и старых животных

Группы животных	$V_{\text{ПОЛ}}$	$\Delta t_{50}$
	Без добавления субстрата (А)	
Молодые ( $n = 10$ )	$230,1 \pm 8,2$	$128,3 \pm 6,1$
Старые ( $n = 10$ )	$238,8 \pm 4,6$	$99,3 \pm 6,4$
		$P_{\text{М-С}} < 0,01$
Окисленные субстраты: сукцинат плюс глутамат (Б)		
Молодые ( $n = 9$ )	$100,0 \pm 5,8$	$319,7 \pm 34,9$
	$P_{\text{А-Б}} < 0,001$	$P_{\text{А-Б}} < 0,001$
Старые ( $n = 10$ )	$105,8 \pm 8,2$	$172,3 \pm 9,4$
	$P_{\text{А-Б}} < 0,001$	$P_{\text{А-Б}} < 0,001$ ; $P_{\text{М-С}} < 0,001$
Окисленный субстрат: 3-гидроксипутират (В)		
Молодые ( $n = 7$ )	$233,7 \pm 11,7$	$189,2 \pm 15,4$
		$P_{\text{А-В}} < 0,01$
Старые ( $n = 8$ )	$203,3 \pm 13,9$	$100,6 \pm 7,4$
		$P_{\text{М-С}} < 0,001$

Примечание:  $V_{\text{ПОЛ}}$  выражена в нг-атомах  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  белка,  $\Delta t_{50}$  – в секундах;  $P_{\text{М-С}}$  – значение  $p$  при сравнении параметров МПК молодых животных со старыми,  $P_{\text{А-Б}}$  – при сравнении параметров МПК в варианте «без субстратов» с вариантом «сукцинат плюс глутамат» и  $P_{\text{А-В}}$  – при сравнении параметров МПК в варианте «без субстратов» с вариантом «3-гидроксипутират».

субстрата проявляли антиоксидантную активность после повреждения МПК. Добавление сукцината значительно снижало  $V_{\text{ПОЛ}}$  поврежденных МПК обеих возрастных групп (на 56%) и повышало  $\Delta t_{50}$  на 149% в МПК молодых и на 74% в МПК старых животных по отношению к значениям  $\Delta t_{50}$  в отсутствие субстрата. Добавление 3-ГБ не вызывало значительного сни-

жения  $V_{\text{ПОЛ}}$  в МПК молодых животных и увеличивало  $\Delta t_{50}$  на 48%. В противоположность этому 3-ГБ не вызвал каких-либо изменений в кинетики ПОЛ в поврежденных МПК старых животных. По сравнению с интактными МПК  $\Delta t_{50}$  в поврежденных МПК старых животных было слегка (на 23%) меньше без субстрата и на 47% меньше в присутствии сукцината или 3-ГБ.

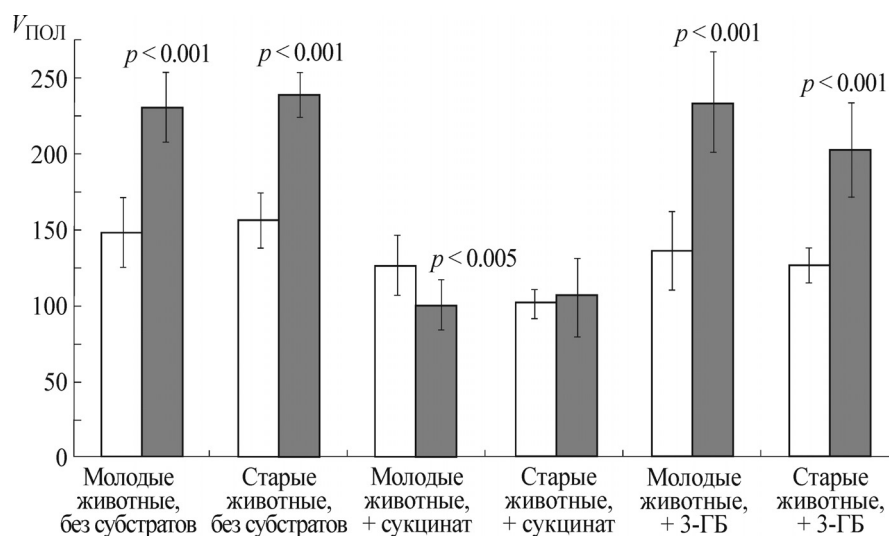


**Рис. 2.** Полярографическая запись потребления кислорода во время АТФ- $Fe^{2+}$ -индуцированного ПОЛ в среде без фосфолипидов (1); в среде без субстратов, содержащей 0,1% эмульсии фосфолипидов (2); при инкубации эмульсии с 5 мМ сукцината калия плюс 1 мМ глутамата (3); при инкубации эмульсии с 8 мМ 3-гидроксипутирата натрия (4).

**Отсутствие эффекта сукцината и 3-гидроксипутирата в экспериментах на фосфолипидной суспензии.** Для оценки возможных антиоксидантных свойств субстратов без участия митохондрий ферментных систем использовали 0,1% соевую фосфолипидную эмульсию без каких либо метаболических превращений субстратов. Добавление в инкубационную среду АТФ/ $Fe^{2+}$ -комплекса вызывало индукцию ПОЛ, резко ускоряя потребление кислорода в равной мере как в присутствии субстратов, так и без них (рис. 2). Следовательно, сукцинат или 3-ГБ в отсутствие дегидрогеназных превращений не влияют на кинетику индуцированного ПОЛ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении окислительного фосфорилирования МПК старых животных. Это соответствует



**Рис. 3.** Значения индуцированного  $V_{\text{ПОЛ}}$  в интактных (светлые столбики) и поврежденных (темные столбики) МПК различных возрастных групп и коррекция  $V_{\text{ПОЛ}}$  добавлением окислительных субстратов. Парные сравнения значений  $V_{\text{ПОЛ}}$  без субстратов, с добавлением 5 мМ сукцината плюс 1 мМ глутамата и с добавлением 8 мМ 3-гидроксибутирата. Значения  $p$  приведены для сравнения интактных и поврежденных МПК.

литературным данным о возраст-зависимой динамике фосфорилирующего дыхания: способность митохондрий продуцировать АТФ уменьшается, скорость переноса электронов ингибируется и комплексы дыхательной цепи инактивируются [23,24]. Как правило, возраст-зависимая дисфункция митохондрий вызывается изменениями в активности дыхательных комплексов [25]. Наблюдаемое подавление индуцированного ПОЛ в изолированных МПК старых животных при окислении сукцината и 3-ГБ может быть обусловлено несколькими процессами. Наши экспериментальные результаты позволяют отвергнуть гипотезу, что используемые субстраты могут влиять на индуцированное ПОЛ без участия в метаболических трансформациях. Этот вывод согласуется с результатами работы [26], в которой показана потеря антиоксидантных эффектов нехелатирующих субстратов цикла Кребса в изолированных митохондриях после тепловой инактивации ферментных систем.

Увеличение потока спаренных электронов вдоль дыхательной цепи ускоряет генерацию электрохимического трансмембранного потенциала и поддерживает структуру комплекса мембранных липопротеинов, что предотвращает утечку неспаренных электронов, ассоциированную с генерацией АФК и образованием липидных пероксидаз и гидроперекиси. Авторы работы [27] описали в интактных митохондриях сердца крыс «величину порогового мембранного потенциала митохондрий, выше которого происходит очень сильное увеличение образо-

вания  $\text{H}_2\text{O}_2$ » при окислении сукцината. Они показали, что «высокая протондвижущая сила в состоянии 4 потенциально опасна для клетки из-за увеличения вероятности образования супероксида». Однако в МПК активность СДГ и возможность дыхательной цепи генерировать мембранный потенциал гораздо ниже, чем в митохондриях сердца. Поэтому в МПК окисление сукцината обеспечивает генерацию меньшего трансмембранного потенциала, чем величина порогового потенциала митохондрий сердца при действии слабых разобщителей. Тем самым окисление сукцината в МПК старых животных, особенно после искусственного разрушения, не может стимулировать генерацию АФК, но, наоборот, может предотвращать генерацию свободных радикалов. Мы наблюдали это явление в МПК старых животных, где антиоксидантные эффекты более выражены при окислении сукцината, а также в МПК молодых животных после повреждения при замораживании-оттаивании. Замораживание-оттаивание вызывало значительное увеличение  $V_{\text{ПОЛ}}$  в МПК как молодых, так и старых животных (рис. 3). Ускоренное ПОЛ является доказательством разрушения липидного бислоя мембран МПК. Это говорит о том, что разрушение сопровождается увеличением утечек восстановительных эквивалентов, генерирующих производство свободных радикалов [28,29].

Скорость окисления сукцината в интактных МПК старых животных в 1,5 раза меньше таковой в МПК молодых животных. Мы предполагаем, что это происходит из-за того, что

окисление сукцината не может поддерживать высокий трансмембранный потенциал или индуцировать образование АФК в МПК старых животных, но способно ингибировать инициацию и каскад ПОЛ. Наш анализ показывает обратную зависимость между скоростью окисления сукцината в состоянии 4 и  $V_{\text{ПОЛ}}$  в различных образцах МПК старых животных (коэффициент корреляции  $-0,827$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0,01$ ). Такая корреляция не наблюдалась в МПК молодых животных. Следует отметить, что скорость фосфорилирующего дыхания также уменьшается на 31% по сравнению с МПК старых животных. При этом значение  $V_4$  в МПК старых животных было значительно ниже (23,8 нг-атомов  $O_2$  в мин на мг белка), тогда как в МПК молодых животных достигала 31,1 нг-атомов  $O_2$  в мин на мг белка. Это возрастное различие статистически достоверно. Таким образом, низкое значение  $V_4$  недостаточно, чтобы генерировать и поддерживать высокий мембранный потенциал, который мог бы включать генерацию эндогенного супероксида и гидроперекисей согласно работе [27], потому что пороговое значение для инициации образования АФК не достигалось и было достаточным только для дестабилизации структуры мембраны и уменьшению доступности жирных кислот для ПОЛ. Наблюдаемая обратная корреляция между увеличением  $V_4$  и скоростью ПОЛ в МПК старых животных является прямым свидетельством влияния состояния МПК. Ясно, что наблюдаемое ингибирование индуцированного ПОЛ в МПК старых животных отражает уменьшение активности системы окисления сукцината и степени сопряжения окислительного фосфорилирования. Нарушение целостности мембраны после замораживания-оттаивания МПК, а также возраст-зависимое разрушение липидного бислоя и липид-белковых взаимодействий увеличивает доступность мембранных жирных кислот к действию прооксидантных агентов и инициаторов ПОЛ. Можно предположить, что окисление сукцината играет роль стабилизатора мембраны и антиоксидантного фактора как на уровне изолированных МПК, так и на уровне целого организма.

Антиоксидантный эффект демонстрируется увеличением времени лаг-периода иницированного ПОЛ и замедлением потребления кислорода после его начала. Сукцинат является гораздо более эффективным антиоксидантом, чем 3-ГБ, потому что скорость дыхания при окислении сукцината почти в два раза превышает скорость дыхания при окислении 3-ГБ. Это может происходить не только благодаря активности СДГ, но также благодаря ее ста-

бильности в этих условиях, что позволяет генерировать трансмембранный потенциал, который является существенным для поддержки структуры липидного бислоя. В настоящее время имеется много доказательств того, что большое число различных агентов может индуцировать ПОЛ за счет исчезновения трансмембранного потенциала и что этот процесс связан с открытием транзитных пор митохондрий и развитием клеточного апоптоза/некроза [30]. В противоположность этому любые способы, которые поддерживают трансмембранный потенциал, могут ингибировать ПОЛ; в нашем случае наблюдается именно этот механизм ингибирования ПОЛ. Процесс окисления таких субстратов, как сукцинат и 3-ГБ, не может включать в себя хелатирование железа, необходимое для инициации реакции ПОЛ, но этот процесс связан с увеличением генерации трансмембранного потенциала, особенно выраженного при окислении сукцината [31]. Возможно, что наибольшим эффектом сукцината, описанным ранее в работе [31] для митохондрий с разрушенными мембранами, является большая доступность его для СДГ, поэтому антиоксидантный эффект сукцината больше выражен в МПК старых животных и в поврежденных МПК молодых животных. Это указывает на то, что сукцинатсодержащие добавки могут быть использованы в качестве геропротекторов при старении, подобно другим антиоксидантам. Без ферментативного окисления сам по себе сукцинат не является антиоксидантом, что делает его более физиологичным.

Авторы благодарят Т. Вечеркову и А. Меркушину за помощь в проведении экспериментов, а также сотрудников вивария Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН за помощь в содержании животных.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Harman, J. Gerontology **11** (3), 298 (1956).
2. Ф. Ф. Северин и В. П. Скулачев, Успехи геронтологии **22** (1), 37 (2009).
3. В. Н. Анисимов, *Молекулярные и физиологические механизмы старения* (СПб., Наука, 2003).
4. L. Tretter, G. Szabados, A. Andó, and I. Horváth, J. Bioenergetics Biomembranes **19** (1), 31 (1987).
5. G. Szabados, A. Andó, L. Tretter, and I. Horváth, J. Bioenergetics Biomembranes **19** (1), 21 (1987).
6. A. Dedeoglu, R. J. Ferrante, O. A. Andreassen, et al., Exp. Neurol. **176**, 262 (2002).
7. R. L. Puntel, D. H. Roos, D. Grotto, et al., Life Sci. **81** (1), 51 (2007).
8. R. Endlicher, P. Kriváková, H. Rauchová, et al., Physiol. Res. **58** (5), 685 (2009).

9. L. Cavallini, M. Valente, and A. Bindoli, *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 466 (1984).
10. H. H. Draper, E. J. Squires, H. Mahmoodi, et al., *Free Radical Biology & Medicine* **15**, 353 (1993).
11. H. Sassa, Y. Takaisi, and H. Terada, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **172**, 890 (1990).
12. A. Y. Seo, J. Xu, S. Servais, et al., *Aging Cell* **7**, 706 (2008).
13. G. A. Salvador, R. M. Uranga, and N. M. Giusto, *Int. J. Alzheimer's Disease* **2011**, 1 (2011).
14. М. Э. Бодрова, В. И. Дедухова и Е. Н. Мохова, *Биохимия* **65**, 562 (2000).
15. B. Chance and G. R. Williams, *J. Biol. Chem.* **217**, 409 (1955).
16. Т. Б. Суслова и Ю. А. Владимиров, в кн. *Биологические мембраны* (М., 1973).
17. R. M. Abreu, D. J. Santos, and A. J. Moreno, *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* **295** (3), 1022 (2000).
18. K. Fukuzawa, Y. Saitoh, K. Akai, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1668** (1), 145 (2005).
19. K. Kogure, K. Fukuzawa, H. Kawano, and H. Terada, *Free Radical Biology & Medicine* **14** (5), 501 (1993).
20. D. J. Santos and A. J. Moreno, *Biochem. Pharmacol.* **61** (2), 155 (2001).
21. O. I. Aruoma, B. Halliwell, M. J. Laughton, et al., *Biochem. J.* **258** (2), 617 (1989).
22. Y. A. Vladimirov, in *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases* (New York, 1986).
23. T. C. Yen, Y. S. Chen, K. L. King, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **165**, 994 (1989).
24. J. Sastre, F. V. Pallardy, and J. Vica, *IUBMB Life* **49**, 427 (2000).
25. L. K. Kwong and R. S. Sohal, *Arch. Biochem. Biophys.* **373** (1) 16 (2000).
26. R. L. Puntel, C. W. Nogueira, and J. B. Rocha, *Neurochem. Res.* **30**, 225 (2005).
27. S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, and A. A. Starkov, *FEBS Lett.* **416**, 15 (1997).
28. G. Lenaz, M. D'Aurelio, P. M. Merlo, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 397 (2000).
29. H. R. Modi, S. S. Katyare, and M. A. Patel, *J. Membrane Biol.* **221**, 51 (2008).
30. Y. Nagano, H. Matsui, M. Muramatsu, et al., *Digestive Diseases and Sciences* **50**, 76 (2005).
31. T. Sen, N. Sen, G. Tripathi, et al., *Neurochem. Int.* **49**, 20 (2006).

## Age-related Peculiarities of Succinate Effect on Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Mitochondria

E.V. Grishina, Ya.V. Khaustova, A.A. Vasilieva, and E.I. Mayevsky

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The antioxidant effect of succinate and 3-hydroxybutyrate oxidation on the kinetics of lipid peroxidation induced by ATP-Fe<sup>2+</sup> complex in isolated rat liver mitochondria of old (1.0–1.5 years) and young (3 months) male rats was investigated. The rate of induced lipid peroxidation  $V_{LPO}$  in rat liver mitochondria and the half-time of oxygen consumption  $\Delta t_{50}$ , which included the lag period and the initiation phase, was recorded polarographically. Without exogenous oxidative substrates  $V_{LPO}$  was slightly higher in mitochondria of old animals, but the onset of lipid peroxidation cascade was significantly earlier than in young animals. Incubation of mitochondria with 5mM succinate for 1 min inhibited  $V_{LPO}$  by 15% in young animals and by 35% in old animals. However, only in mitochondria of old animals  $\Delta t_{50}$  increased by 19% as compared to lipid peroxidation without substrates.  $V_{LPO}$  in mitochondria of young animals did not significantly change during 3-hydroxybutyrate oxidation, while in mitochondria of old animals it was reduced by 19% with a slight increase in  $\Delta t_{50}$ . To simulate age-dependent dysfunction we damaged isolated mitochondria by a series of freeze-thaw cycles, which caused a significant increase of  $V_{LPO}$  of both age groups. Succinate oxidation inhibited  $V_{LPO}$  in damaged mitochondria in all cases by 56%, as compared to  $V_{LPO}$  without oxidative substrates and extended  $\Delta t_{50}$  twofold in mitochondria of young animals. Oxidation of 3-hydroxybutyrate had no effect on  $V_{LPO}$  in damaged mitochondria regardless of animal age and extended  $\Delta t_{50}$  by 48% in mitochondria of young animals. Thus, the antioxidant effect of succinate oxidation can prevent lipid peroxidation damage and may exhibit geroprotective action at the level of aging mitochondria. Therefore, the antioxidant effect is due to the process of substrate oxidation in the respiratory chain but not because of an interaction of their structures with membrane lipids per se.

*Key words:* Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation, rat liver mitochondria, effect of succinate and 3-hydroxybutyrate oxidation