

УДК 577.23+576.311

## НАДН-ОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ В ГИПОТОНИИ ПРИ БЛОКИРОВКЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

© 2019 г. А.М. Львов, Н.Л. Векшин

*Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

*E-mail: nvekshin@rambler.ru*

Поступила в редакцию 07.02.2019 г.

После доработки 23.05.2019 г.

Принята к публикации 19.09.2019 г.

Рассмотрен вопрос о вкладе НАДН-оксидазы в дыхание митохондрий в суспензии в экстремальных условиях: в гипотонической среде и при блокировке дыхательными ядами – ротеноном, антимицином А и азидом натрия. На изолированных митохондриях печени крысы показано, что заметное потребление кислорода при окислении добавленного НАДН идет не только на цитохромоксидазе, но и на НАДН-дегидрогеназе дыхательной цепи. Именно поэтому дыхание митохондрий на НАДН подавляется ядами не полностью. Нечувствительная к ядам дыхательная активность является результатом шунтирования электронов с НАДН на кислород непосредственно на НАДН-дегидрогеназе. Такое остаточное дыхание на НАДН-оксидазе, не подавляемое ингибиторами дыхательной цепи, может в экстремальных условиях достигать половины всего потребления кислорода.

*Ключевые слова: митохондрии, гипотония, потребление кислорода, супероксид, НАДН-дегидрогеназа, ротенон, антимицин А, азид натрия, дыхательная цепь.*

DOI: 10.1134/S0006302919060140

При окислении НАДН в дыхательной цепи митохондрий в нормальных физиологических условиях потребление кислорода осуществляется практически только на цитохромоксидазе [1]. Однако, в зависимости от конкретных условий, от 0,1 до 1% кислорода все же может потребляться не на цитохромоксидазе, а на НАДН-оксидазе [2,3]. При этом кислород на НАДН-оксидазе, принимая электрон, восстанавливается до опасного супероксида [2–4]. При обратном переносе электронов с других комплексов цепи на НАДН-дегидрогеназу на ней может потребляться до 5% кислорода [5]. При блокировке дыхательной цепи антимицином в присутствии НАДН наблюдается повышенная продукция супероксида [6].

Интересно понять, каков может быть вклад НАДН-оксидазы в дыхание митохондрий в экстремальных условиях. Это особенно важно с биомедицинской точки зрения, так как: а) в клетках печени осуществляется детоксикация ядовитых веществ, вследствие чего печеночные митохондрии повреждаются ядами, б) митохондрии клеток органов при воспалении, отеках, ушибах, дефиците соли и других подобных случаях попадают в экстремальные гипотонические условия.

Целью наших модельных опытов является установление вклада НАДН-оксидазы в потреб-

ление кислорода изолированными печеночными митохондриями в гипотонических условиях при блокировке дыхательной цепи ядами – ротеноном, антимицином А и азидом натрия.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фракцию митохондрий из печени крысы выделяли по методике, описанной в работе [7], с небольшими модификациями. Выделение митохондрий проводили при температуре 4°C, все растворы охлаждали на льду. Сначала печень крысы помещали в 20 мл ледяной среды выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 0,5 мМ EDTA и 10 мМ HEPES (pH 7,5), после чего печень продавливали через пресс, добавляли 80 мл той же среды и затем производили гомогенизацию в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения неразрушенных клеток и эритроцитов. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали 15 мин при 3000 g (тяжелая фракция митохондрий). Полученный осадок митохондрий осторожно гомогенизировали в 5–8 мл среды выделения и затем использовали для опытов (хранили на льду и использовали в течение нескольких часов).

Концентрацию митохондрий по белку определяли при 286 нм УФ-экспресс-методом [8] на спектрофотометре 5400УФ («ПромЭкоЛаб», Санкт-Петербург).

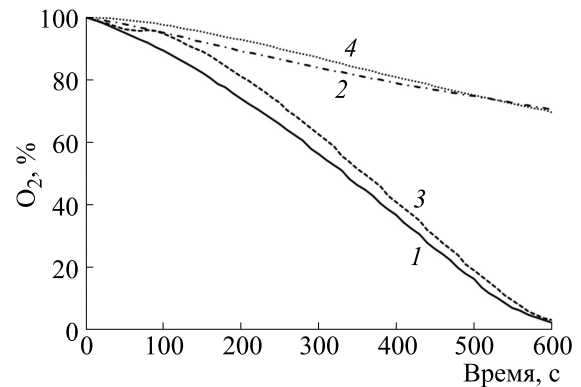
Изотоническая среда инкубации митохондрий содержала 150 мМ сахарозы, 10 мМ трис, 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ EGTA (pH 7,5); гипотоническая среда инкубации – 10 мМ Tris, 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ EGTA (pH 7,5). В опытах с полной гипотонией использовали чистую дистиллированную воду без добавок. Гипертоническая среда содержала 300 мМ сахарозы, 10 мМ трис, 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ EGTA (pH 7,5).

Измерение потребления кислорода суспензией митохондрий (в гипотонической, гипертонической или изотонической среде при добавлении сукцината или НАДН) проводили полярографическим методом в 1,5-миллилитровой герметичной ячейке при перемешивании. Дыхание митохондрий регистрировали, используя кларковский электрод с термооксиметром «Эксперт-001» (ООО «Эконикс», Москва). Приводятся средние данные по 20–30 измерениям митохондрий, выделенных из десяти животных. Погрешность в определении скорости дыхания не превышала 0,001 мг/(л · мин). Остаточное дыхание рассчитывалось по десятиминутным кинетикам после усреднения 20–30 экспериментов, в расчете скорости в одну минуту. Погрешность в определении остаточного дыхания не превышала 1%.

Концентрации антимицина А (до 5 мкМ) и азида натрия (до 5 мМ) подбирали в изотонической среде, добиваясь максимального подавления дыхания митохондрий на 3 мМ сукцинате. Эти концентрации дыхательных ядов использовали далее для ингибирования поглощения кислорода, возникающего при окислении НАДН (800 мкМ) суспензией митохондрий в гипотонической среде или воде (в изотонической среде нативные митохондрии практически не окисляют экзогенный НАДН). Концентрацию ротенона (до 5 мкМ) подбирали для максимального блокирования окисления НАДН непосредственно в присутствии НАДН (без сукцината).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

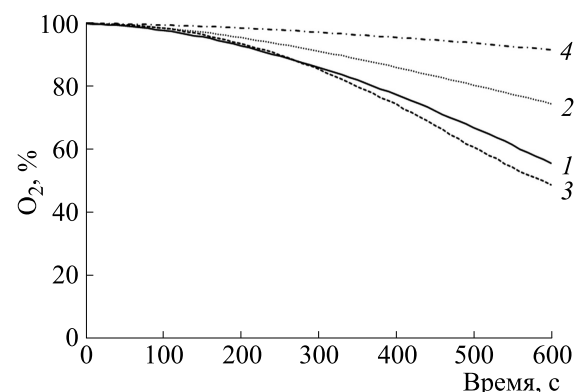
С использованием полярографического метода были детектированы кинетики потребления кислорода в суспензии печеночных митохондрий в течение 10 мин (рис. 1–5). В качестве оценочного критерия эффективности дыхательных ядов использовали отношение скорости потребления кислорода в суспензии митохондрий при совместном добавлении субстрата (сукцинат или НАДН) и яда (азид натрия, ротенон, антимицин А) к скорости потребления кислорода в суспензии митохондрий при добавлении только суб-



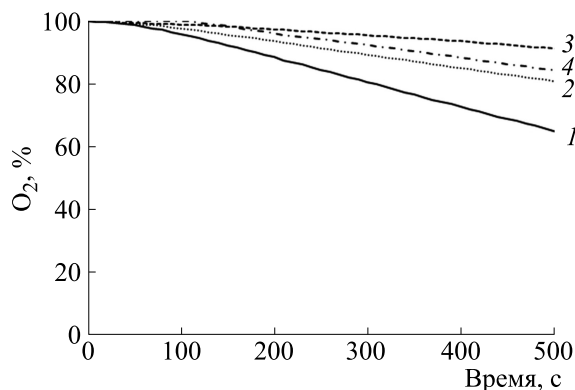
**Рис. 1.** Потребление кислорода в суспензии митохондрий (2 мг /мл) при добавке 5 мМ сукцината в изотонической среде без ядов (1), с 5 мМ азида натрия (2), с 5 мкМ ротенона (3) и с 5 мкМ антимицина А (4). По оси ординат – содержание кислорода в процентах, 100% соответствуют 250 мкМ кислорода в воде при нормальном атмосферном давлении.

страта (данные по скорости – в таблице). Данный критерий назвали остаточным дыханием.

Добавление сукцината к митохондриям приводит, как известно [9], к его окислению сукцинатдегидрогеназой с последующим переносом электронов по дыхательной цепи на цитохромоксидазу, на которой происходит восстановление кислорода до воды. Наблюдаемое в изотонической среде потребление кислорода на сукцинате немного ускоряется в гипотонической среде, но сильно подавляется в гипертонической (таблица). Это можно объяснить тем, что при гипотонии проницаемость мембран митохондрий возрастает, а при гипертонии – снижается. Это означает, что скорость дыхания лимитируется пассивной проницаемостью мембран для сукцината, входящего в наших условиях внутрь просто по градиенту (по-видимому, без участия какого-



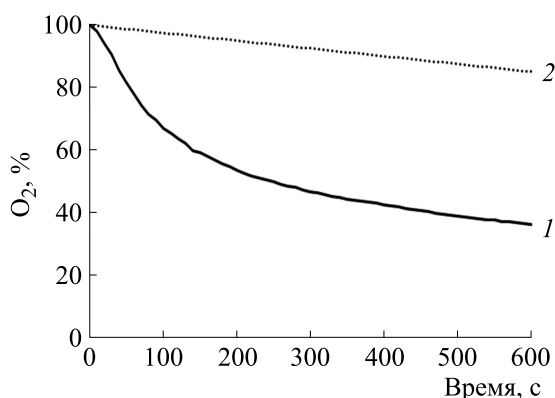
**Рис. 2.** Потребление кислорода в суспензии митохондрий (1 мг /мл) при добавке 5 мМ сукцината в гипотонической среде без ядов (1), с 5 мМ азида натрия (2), с 5 мкМ ротенона (3) и с 5 мкМ антимицина А (4).



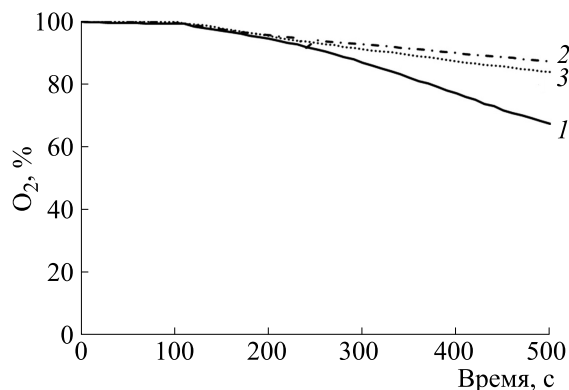
**Рис. 3.** Потребление кислорода в суспензии митохондрий (1 мг /мл) при добавке 800 мкМ НАДН в гипотонической среде без ядов (1), с 5 мМ азидом натрия (2), с 5 мМ ротенона (3) и с 5 мкМ антимицина А (4).

либо специального транслоказного переносчика).

Сукцинат-зависимое потребление кислорода подавляется, как известно [1], дыхательными ядами, например антимицином А и азидом натрия, первый из которых блокирует перенос электронов на уровне цитохромов *b* и *c*, а второй — на уровне цитохромоксидазы. Антимицин А оказывал в наших опытах чуть большее ингибирующее действие на сукцинат-зависимое дыхание митохондрий (остаточное дыхание 20%), чем азид натрия (остаточное дыхание 30%) (рис. 1 и 2). При этом в условиях гипотонии антимицин ингибировал дыхание практически полностью (рис. 2). Ротенон на сукцинат-зависимое дыхание практически не влиял, как и ожидалось. Считается, что ротенон взаимодействует с сайтом связывания убихинона [1]. Хорошо известное (и повторенное нами) отсутствие ингибирования ротеноном ды-



**Рис. 4.** Потребление кислорода в суспензии митохондрий (1 мг /мл) при добавке 800 мкМ НАДН в гипотонической среде без ядов (1) и с совместной добавкой 5 мМ азидом натрия, 5 мкМ ротенона и 5 мкМ антимицина А (2).



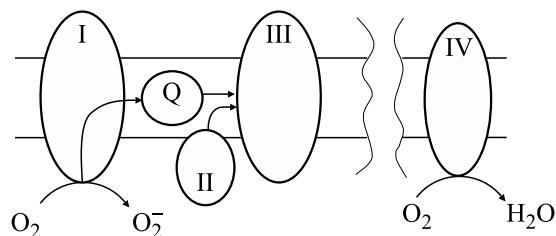
**Рис. 5.** Потребление кислорода в суспензии митохондрий (1 мг /мл) при добавке 800 мкМ НАДН в гипотонической среде без ядов (1), с 5 мкМ ротенона (2) и с совместной добавкой 5 мМ азидом натрия и 5 мкМ антимицина А (3).

хания на сукцинате означает, что либо перенос электронов с сукцинатдегидрогеназы на цитохромы происходит без участия убихинона, либо ротенон не является конкурентом убихинона, что маловероятно.

Добавление НАДН к интактным печеночным митохондриям в изотонической среде не приводило, как и следовало ожидать, к его окислению (таблица). Причиной этого является очень низкая проницаемость внутренней мембраны для НАДН [1]. В изотонии окисление НАДН в суспензии митохондрий имело место только при их повреждении (особенно сильно при замораживании-размораживании; данные не приводятся).

В гипотонической среде в суспензии митохондрий наблюдалось быстрое окисление НАДН (таблица), не полностью подавляемое ингибиторами дыхательной цепи.

Интересно, что в гипертонической среде (остаточное дыхание 24%) тоже возникало окисление НАДН (таблица). По-видимому, в гипертонической среде внутренняя мембрана повреждается и поэтому становится проницаемой для



**Рис. 6.** Схема работы ферментных комплексов I–IV дыхательной цепи в гипотонических условиях и/или при блокировке ядами. Повреждение цепи в гипотонии обозначено как разрыв мембраны.

Скорость потребления кислорода суспензией митохондрий

	Скорость потребления O <sub>2</sub> , мг/(л·мин)							
	НАДН				Сукцинат			
	Без добавок	NaN <sub>3</sub>	Ротенон	Антимицин А	Без добавок	NaN <sub>3</sub>	Ротенон	Антимицин А
Вода	0,07	0,055	0,03	0,03	0,34	0,05	0,25	0,05
Гипотония	0,085	0,045	0,025	0,035	0,11	0,05	0,11	0,02
Изотония	0,01				0,09	0,03	0,11	0,025
Гипертония	0,02				0,05			

Примечание. Приводятся средние данные по 20–30 измерениям на митохондриях из десяти животных. Погрешность в скорости не превышала 0,001 мг/л/мин.

НАДН (но остается не слишком проницаемой для сукцината).

При использовании НАДН в качестве субстрата в гипотонической среде ротенон существенно блокирует перенос электронов с НАДН-дегидрогеназы на убихинон [10], но в наших опытах оставалось заметное остаточное дыхание, составляющее 29%.

В гипотонической среде окисление НАДН сопровождалось почти таким же сильным потреблением кислорода, как при окислении сукцината (таблица). Скорость процесса лимитируется пассивной проницаемостью мембран для НАДН, входящего внутрь по градиенту (в наших условиях – без участия какого-либо транслокационного переносчика). Нужно подчеркнуть, что митохондрии в гипотонии представляют собой не нативные органеллы, а тени, т.е. структуры с поврежденными мембранами и почти без внутреннего содержимого. Их наружная мембрана частично разрушена, а значительная часть матрикса выходит наружу, что приводит к падению светорассеяния [11].

НАДН-зависимое дыхание подавляется, как известно [10], ротеноном, блокирующим перенос электронов с железо-серных кластеров НАДН-дегидрогеназы на убихинон. Ротенон в наших условиях сильно подавлял потребление кислорода (рис. 3). Это означает, что нет никакой «внешней» (в наружной мембране) ротенон-нечувствительной НАДН-дегидрогеназы, что согласуется с нашими специальными исследованиями [12,13].

Из рис. 3 видно, что в гипотонической среде антимицин А или азид натрия подавляют НАДН-зависимое дыхание митохондрий не полностью. Антимицин А подавляет сильнее (остаточное дыхание 41%), чем азид натрия (остаточное дыхание 53%). Обращает внимание на себя тот факт, что в условиях гипотонии даже одновременное сочетание всех трех ядов не ингибирует дыхания полностью (рис. 4). Как видно из таблицы, ингибирование ядами в условиях умеренной гипотонии (в бу-

фере с низкой ионной силой) происходит активнее, чем при полной гипотонии (в воде).

Казалось бы, два яда – антимицин А и азид натрия – должны делать то же самое, что и ротенон – блокировать цепочку, полностью устранив дыхание. Однако они в условиях гипотонии подавляют НАДН-зависимое дыхание только частично, причем даже при применении обоих ядов одновременно (рис. 5). Это означает, что последовательность переноса электронов с НАДН на кислород здесь совершенно иная, чем с сукцината. Иными словами, остаточное дыхание, не ингибируемое антимицином А и азидом натрия, имеет место не на цитохромоксидазе, а непосредственно на самой НАДН-оксидазе. Его величина достигает 44%. Это автоматически означает образование большого количества супероксида на НАДН-оксидазе. На рис. 6 показана схема шунтирования электронов с НАДН (в комплексе I) на молекулярный кислород (с образованием супероксида) вместо нормального переноса на убихинон (коэнзим Q) и далее.

Такое шунтирование может в принципе возникать в клеточных митохондриях не только при отравлении дыхательными ядами, но и при утрате солей, при отеках и других случаях, когда клетки попадают в экстремальные гипотонические условия. В этих случаях потребление кислорода на цитохромоксидазе (комплекс IV) будет минимальным, а на НАДН-оксидазе (комплекс I) – максимальным. При этом в таких условиях потребление кислорода на цитохромоксидазе может активироваться только напрямую (без участия комплексов I, II и III), например аскорбатом.

Количество супероксида, образующегося на НАДН-дегидрогеназе в митохондриях, должно значительно увеличиваться в экстремальных условиях: в гипотонической среде и при блокировке дыхательными ядами, что действительно имеет место [13].

Кроме того, полученные данные по сильному ингибированию дыхания антимицином А или азидом натрия на сукцинате, но существенно более слабому на НАДН, позволяют предположить, что дыхательная цепь не линейна, а разветвлена, состоит как минимум из двух цепей, соединяющихся на уровне цитохромов, а не убихинона. Это делает ее менее уязвимой. Данный вопрос требует отдельного изучения.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ленинджер, *Биохимия* (Мир, М., 1974).

2. R. G. Hansford, B. A. Hogue, and V. Mildaziene, *J. Bioenerg. Biomembr.* **29** (1), 89 (1997).
3. M. P. Murphy, *Biochem. J.* **417** (1), 1 (2009).
4. J. F. Turrens and A. Boveris, *Biochem. J.* **191** (2), 421 (1980).
5. F. L. Muller, Y. Liu, M. A. Abdul-Ghani, and M. S. Lustgarten, *Biochem. J.* **409** (2), 491 (2008).
6. A. Boveris and E. Cadenas, *FEBS Lett.* **54** (3), 311 (1975).
7. M. S. Frolova and N. L. Vekshin, *J. Fluores.* **24**, 1061 (2014).
8. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin, 2002).
9. В. П. Скулачев, А. В. Богачев и Ф. О. Каспаринский, *Мембранная биоэнергетика* (МГУ, М., 2010).
10. B. Chance and G. Hollunger, *J. Biol. Chem.* **278** (1), 418 (1963).
11. Д. Н. Курдюков и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **61** (4), 736 (2016).
12. И. В. Шарова и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **49** (5), 814 (2004).
13. Н. Л. Векшин, *Биофизика митохондрий* (Фотон-Век, Пушкино, 2019).

## NADH-Oxidase Activity of Mitochondria in Hypotonia in the Presence of Respiratory Chain Inhibitors

A.M. Lvov and N.L. Vekshin

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

Contribution of NADH oxidase to mitochondrial respiration in the suspension under extreme conditions: in a hypotonic environment and in the presence of respiratory poisons such as rotenone, antimycin and azide has been studied. The experiment was carried out on rat liver mitochondria. It was shown that in oxidation of added NADH not only cytochrome oxidase, but also NADH dehydrogenase of the respiratory chain remarkably consume oxygen. This is the reason why NADH-linked mitochondrial respiration is not completely inhibited by respiratory poisons. Insensitivity of respiration to poisoning is the result of a shunt of electron transfer from NADH to oxygen with direct involvement of NADH-dehydrogenase. This residual respiration insensitive to respiratory chain inhibitors in NADH-oxidase under extreme conditions may account for one half of the total oxygen consumption.

*Keywords: mitochondria, hypotonia, oxygen consumption, superoxide, NADH-dehydrogenase, rotenone, antimycin, azide, respiratory chain*