

УДК 577.3

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ В ВОДНОЙ СРЕДЕ С УМЕНЬШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ

© 2020 г. Н.В. Лобышева*, С.В. Нестеров** ***, Ю.А. Скоробогатова*, В.И. Лобышев****

*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1/40

**Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, 115409, Москва, 6-я Радиальная ул., 24/14

***Московский физико-технический институт, 141701, Долгопрудный Московской обл., Институтский пер., 9

****Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: lobyshev@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.01.2020 г.

После доработки 10.01.2020 г.

Принята к публикации 24.01.2020 г.

Исследована эффективность фосфорилирования в образцах изолированных митохондрий печени крыс в инкубационных средах с переменным изотопным составом по дейтерию — 6, 60, 90, 120, 150 ppm, а также 0.1, 1 и 2%. В средах с пониженным содержанием дейтерия (до 60 ppm) наблюдается монотонное снижение коэффициента АДФ/О, а его величина при 6 ppm такая же, как при 60 ppm. Исследована также генерация супероксид аниона комплексами I, II и III дыхательной цепи митохондрий. При всех исследованных режимах функционирования митохондрий с использованием ингибиторов дыхательной цепи генерация супероксид аниона не зависела от концентрации дейтерия в среде инкубации.

Ключевые слова: митохондрии, электрон-транспортный перенос, ингибиторы, супероксид-анион, перекись водорода, фосфорилирование, дейтерий воды, изотопные эффекты.

DOI: 10.31857/S0006302920020131

Давно установлено, что дыхание интактных митохондрий, субмитохондриальных частиц и изолированных комплексов электронного транспорта ингибируется в D₂O [1, 2]. Наиболее сильные изотопные эффекты в концентрированной тяжелой воде, составляющие около 50%, наблюдаются в процессах, связанных с фосфорилированием, т. е. в цитохромном участке. Известно, что природная вода содержит в среднем около 0.015% (или 150 ppm) атомов дейтерия. В природе эта величина варьирует в различных источниках в результате фракционирования изотопов дейтерия при фазовых переходах воды, а также при ее адсорбции. При равновесии в тройной точке воды меньше всего дейтерия будет в паровой фазе и больше всего — в твердой, но эти эффекты относительно малы. Наиболее обедненная дейтерием вода отмечается в осадках Южного полюса, где отношение D/H = 0.0089 ат. % (89 ppm), а наиболее обогащенная — в закрытых бассейнах аридной

зоны, где D/H = 0.0178 ат. % (178 ppm) [3]. Считая, что величина изотопного эффекта в дыхании митохондрий будет линейно зависеть от концентрации дейтерия в водной среде, трудно ожидать значимых эффектов при природных вариациях дейтерия и даже если дейтерий в воде будет полностью отсутствовать. Тем не менее еще в 30-х годах XX века были обнаружены значительные изотопные эффекты в живых организмах в воде, содержащей повышенное содержание дейтерия до 0.06% [4]. Активирующее влияние талой воды из снега на живые организмы, обусловленное пониженной концентрацией дейтерия, было впервые показано в работах [5, 6], где было доказано также, что наблюдаемые эффекты связаны именно с пониженной концентрацией дейтерия. Обзор ранних работ и работ автора на эту тему можно прочитать в [7], более поздних работ в [8]. До сегодняшнего времени адекватное объяснение эффектов, сопровождающих вариации изо-

топного состава воды в области малых концентраций дейтерия, отсутствует. При этом стоит отметить гипотезу «изотопного резонанса», включающую в рассмотрение основные изотопы биомакромолекул — углерод, дейтерий, кислород и азот [9]. По-видимому, невозможно выделить лишь одну органеллу либо какой-либо один процесс, ответственный за наблюдаемые неожиданно большие эффекты в живых организмах при относительно небольшом изменении содержания дейтерия в водной среде, однако митохондрии, являющиеся основным поставщиком энергии в виде АТФ и генератором активных форм кислорода, являются явными претендентами на объяснение наблюдаемых эффектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали самок крыс линии Wistar массой около 200 г. Использовали митохондрии, выделенные из печени самок крыс по стандартной методике [10]. В течение эксперимента митохондрии хранили в густой суспензии (концентрация белка примерно 150 мг/мл) на льду в пробирках типа «Эппендорф» с небольшим количеством среды промывки (210 мМ маннитола, 40 мМ сахарозы, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА, pH 7.4). Среда измерения (320 мОсм, pH 7.4) содержала 285 мМ маннитола, 13 мМ KCl, 3 мМ HEPES, 0.25 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂. Стабилизацию температуры 30°C осуществляли с помощью термостата F25 (JULABO GmbH, Германия) с точностью 0.1°C. Скорость дыхания митохондрий измеряли полярографическим методом в ячейке объемом 600 мл с использованием кислородного электрода Кларка (Strathkelvin Mitocell MT200, Oxygen Meter 782; Cole-Parmer, США). В ячейку добавляли 3 мкл суспензии митохондрий. Фосфорилирование измеряли в условиях работы сукцинатдегидрогеназы (комплекса II), в присутствии 0.5 мкМ ротенона и 3 мМ янтарной кислоты в ячейке полярографа. Для запуска фосфорилирования добавляли 160 мкМ АДФ и 250 мкМ фосфата.

Параметр АДФ/О, характеризующий эффективность работы дыхательной цепи, рассчитывали как отношение молярного количества добавленного АДФ к количеству атомарного кислорода, поглощенного суспензией митохондрий за время полного фосфорилирования добавленного АДФ. Максимальное теоретическое значение этого параметра в условиях работы комплекса II равно двум. Более низкое значение АДФ/О в наших экспериментах может быть связано с наличием жирных кислот (природных разобщителей)

в препарате митохондрий, а также использованием невысокой (ниже насыщения ферментов) концентрации фосфата и АДФ, что ограничивало скорость фосфорилирования.

Длительность одной записи полярограммы составляла 8 мин. За это время митохондрии не успевали получить заметных окислительных повреждений, о чем свидетельствовало постоянство скорости дыхания при фосфорилировании в контрольных экспериментах. Сразу после выделения митохондрий начинали снимать первую серию от 6 ppm дейтерия до больших концентраций. После завершения первой серии эксперимента, измерения проводили повторно в том же порядке. Время между записями соответствующих полярограмм первой и второй серий составляло около двух часов. Измерения на митохондриях одной крысы повторялись дважды. Всего было поставлено два эксперимента, т. е. проведено четыре измерения для каждой концентрации дейтерия.

Образование H₂O₂ измеряли с использованием красителя Amplex Red, как описано ранее [11]. К инкубационной среде митохондрий, содержащей 120 мМ KCl, 10 мМ HEPES-трис, 2 мМ K₂HPO₄ при pH 7.4, добавляли 10 мкМ Amplex Red и 5 ед./мл пероксидазы хрена. Интенсивность флуоресценции регистрировали прибором FluoroMax (Horiba Jobin Yvon GmbH, Германия) на длине волны 600 нм при длине волны возбуждения 530 нм. Для калибровки использовали стандартные растворы перекиси водорода. В эксперименте проводили последовательное ингибирование комплексов дыхательной цепи митохондрий: вначале добавляли 1 мкМ ротенона (ингибитор комплекса I), затем добавляли 1 мкМ антимицина (ингибитор N-центра комплекса III дыхательной цепи), затем добавляли 1 мкМ миксотиазола (ингибитор P-центра комплекса III дыхательной цепи).

Для приготовления растворов инкубационной среды использовали воду ОАО «Алмаз» (Москва) с удельной электропроводностью 3.61 мкСм/см, содержащую изотопы дейтерия (D = 4 ppm) и тяжелого кислорода (¹⁸O = 849 ppm и ¹⁷O = 170 ppm). С учетом разбавления суспензии митохондрий исследовали при пониженных концентрациях дейтерия (6, 60, 90 и 120 ppm). Содержание дейтерия в обычной воде принимали за 150 ppm. Повышенное содержание дейтерия обеспечивали добавлением необходимого количества тяжелой воды (D₂O с концентрацией 99.6%) до величин 1000 ppm, 10000 ppm (1%), 20000 ppm (2%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерения фосфорилирования АДФ суспензией митохондрий представлены на рис. 1. Видно, что как уменьшение, так и увеличе-

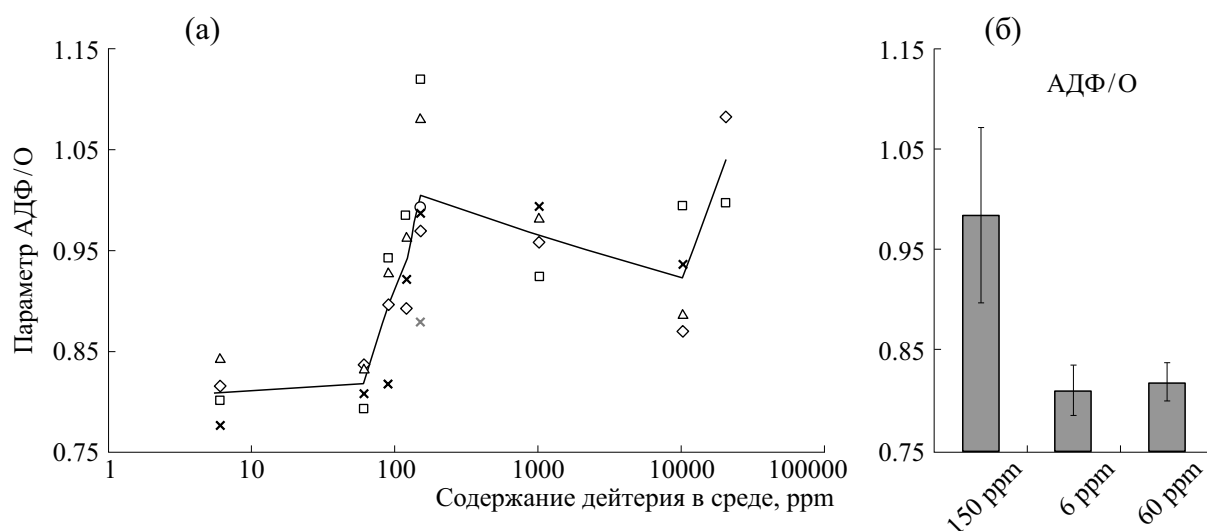


Рис. 1. (а) – Параметр АДФ/О, характеризующий эффективность фосфорилирования. Разными символами обозначены разные серии экспериментов. Линия иллюстрирует зависимость средних значений. (б) – Гистограмма, иллюстрирующая количественное сопоставление экспериментальных данных. Границы погрешностей характеризуют стандартное отклонение ($N = 4$ при 6 и 60 ppm и $N = 6$ при 150ppm). При 6 и 60 ppm отличие от контроля удовлетворяет уровню значимости 0,05, при 10000 ppm – уровню значимости 0,1.

ние содержания в воде относительно его естественного содержания приводит к значимому уменьшению эффективности фосфорилирования. В ряду понижающихся концентраций дейтерия 150–120–90–60 ppm наблюдается монотонное усиление ингибирования. Эффективность фосфорилирования при 6 ppm минимальна и не отличается от таковой при 60 ppm. С увеличением концентрации дейтерия от его природного содержания до 1% эффективность фосфорилирования также уменьшается, но в меньшей степени. При дальнейшем увеличении концентрации дейтерия до 2% наблюдается активация фосфорилирования, достигающая значения в обычной воде. Измерение скорости поглощения кислорода дало среднее значение 22.5 мкмоль O_2 /мин, но большой разброс (связанный со временем, прошедшим после выделения митохондрий) при каждой концентрации дейтерия в образцах не позволил обнаружить наличие изотопных эффектов в среде в интервале использованных концентраций. Различия в параметре АДФ/О на фоне отсутствия достоверных отличий в скорости фосфорилирования и значении дыхательного контроля (соотношение скоростей дыхания при фосфорилировании и в его отсутствие) вызвано тем, что различия в потреблении кислорода в образцах с разной концентрацией дейтерия были существенны в основном при низких концентрациях АДФ, достижимых к концу процесса фосфорилирования.

Необходимо отметить, что измерения эффективности фосфорилирования проводились в условиях невысокой концентрации фосфата и относительно низкой концентрации буфера

HEPES. Ранее было показано, что именно в таких условиях наблюдается формирование фракции неравновесных мембрано-связанных ионов водорода, которая используется для синтеза АТФ [12]. Эта фракция ионов водорода существенно зависит от структурной организации воды у поверхности мембраны, а значит, может быть наиболее чувствительна к изотопному эффекту.

Характерные примеры результатов измерений продукции перекиси водорода в присутствии ингибиторов представлены на рис. 2. В дыхательной цепи митохондрий известны три источника, генерирующие супероксид-анион: комплекс I, продуцирующий супероксид-анион в процессе обратного электронного переноса с комплекса II; Р-центр комплекса III, активно продуцирующий супероксид-анион в случае блокады N-центра Q-цикла; комплекс II, продуцирующий супероксид-анион на флавиновом центре при прямой (с флавина на коэнзим Q) и обратной (с коэнзима Q на флавин) реакциях переноса электрона [13–15]. Экспериментально фиксировали скорость образования перекиси водорода, в которую супероксид анион быстро превращался в митохондриях благодаря работе супероксиддисмутазы. На рис. 2 видно, что скорость генерации не имеет существенных отличий в образцах с различными концентрациями дейтерия в среде: как при генерации супероксид-аниона комплексом I, так и комплексом III (индуцировалось добавление антимицина А – ингибитора N-центра комплекса III). Ингибитор Р-центра комплекса III миксотиазол практически полностью устранял вызванную антимицином А генерацию супероксид-ани-

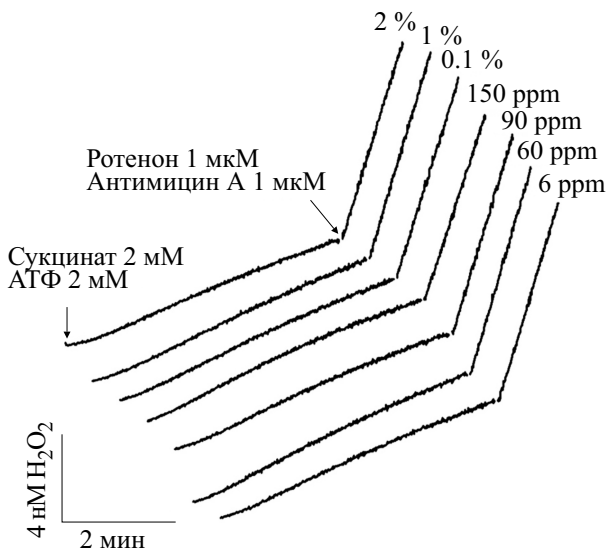


Рис. 2. Продукция H_2O_2 (образующейся из супероксид-аниона) образцами выделенных митохондрий при различных концентрациях дейтерия. Первая часть графиков (около 5 мин) соответствует генерации супероксид-аниона в процессе обратного электронного транспорта на комплексе I. Вторая часть графиков (в присутствии ротенона и антимисина А) соответствует генерации супероксид-аниона комплексом III.

она, однако в этом режиме различий в генерации супероксид-аниона между средами с разными концентрациями дейтерия также не наблюдалось (данные не приведены). Помимо этого ингибиторный анализ был проведен при работе комплекса II при низких концентрациях сукцината (100 мкМ) в присутствии ротенона (ингибитора, эффективно блокирующего реакцию как прямого, так и обратного переноса электронов в комплексе I). В условиях неполного насыщения комплекса II скорость синтеза супероксид-аниона была выше, чем при 2 мМ сукцината, однако отличий между образцами с различной концентрацией дейтерия также не наблюдалось (данные не приведены). Полученные результаты по измерению скорости синтеза супероксид-аниона в образцах изолированных митохондрий полностью согласуются с литературой, однако в средах измерения с изотопным составом среды 6, 60, 90, 120, 150 ppm, а также 0.1 и 1%, генерация перекиси водорода оказалась одинаковой с высокой точностью (расхождение не более наблюдаемого между контрольными экспериментами). Таким образом, можно заключить, что в условиях эксперимента изменение концентрации дейтерия не оказывало влияния на продукцию супероксид-аниона комплексами I, II и III дыхательной цепи.

Полученные результаты по генерации перекиси водорода отличаются от опубликованных ранее [16], где была показана примерно двукратная

активация максимальной скорости генерации H_2O_2 изолированными митохондриями печени крыс при использовании воды с содержанием дейтерия 52 ppm без использования ингибиторов дыхательной цепи. Следует отметить, что наши эксперименты (рис. 2) проводились в условиях окисления сукцината и наличия АТФ, что гарантировало высокий мембранный потенциал, служащий важным фактором генерации АФК, в особенности при реакции обратного переноса электронов с комплекса II на комплекс I. Однако в опытах, в которых ротенон присутствовал с самого начала эксперимента, нам также не удалось увидеть изотопных эффектов. Сравнение полученных в настоящей работе и литературных результатов дает возможность предположить, что изотопный эффект дейтерия в генерации перекиси водорода может проявляться в условиях прямого электронного переноса на комплексе I (с NADH на убихинон), однако это предположение требует дополнительной проверки. Стоит отметить, что кроме комплексов дыхательной цепи источником супероксид-аниона в митохондриях могут выступать некоторые ферменты цикла Кребса. Нельзя исключать влияния дейтерия на их функционирование.

Известна еще одна работа [16], в которой опытной группе крыс предоставляли для питья воду с содержанием дейтерия 46 ppm в течение 28 суток и затем анализировали продукцию перекиси водорода изолированными митохондриями в среде с нормальным содержанием дейтерия и пониженным до 46 ppm. Было показано, что митохондрии печени крыс, адаптированных к облегченной по дейтерию воде, в этой же воде продуцируют на 35% большее количество H_2O_2 , чем митохондрии крыс, выросших в нормальных условиях и тестируемых в обычной воде. Качественно этот эффект наблюдается как с добавлением сукцината, так и без добавления субстрата за счет внутренних метаболитов. Важным результатом, на который авторы не обратили должного внимания, является то, что митохондрии печени крыс, адаптированные к облегченной воде, но тестируемые в обычной воде, показали такие же результаты, как и в контроле. Это означает, что изотопные эффекты облегченной воды обусловлены действием воды как растворителя и не затрагивают существенно системы живой клетки в процессе долговременной адаптации животных к воде с облегченным изотопным составом. Этот результат косвенно подтверждается недавней работой [18], в которой новейшими методами «окс-ред протеомики» (Ox-Red Proteomics) при анализе 2935 белков выявлена роль митохондриальных белков в изменении окислительно-восстановительного статуса клеточных культур при помеще-

нии их в среду с облегченным изотопным составом по дейтерию.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Часть работы (измерение дыхания митохондрий) выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00835\19.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Л.С. Ягужинского за полезные обсуждения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все проведенные процедуры по содержанию и использованию животных соответствовали стандартам Международной ассоциации по оценке и аккредитации работ с лабораторными животными (AAALAC).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. A. Margolis, H. Baum, and G. Lenaz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25** (1), 133 (1966).
2. В. И. Лобышев и Л. П. Калиниченко, *Изотопные эффекты D₂O в биологических системах* (Наука, М., 1978).
3. В. И. Ферронский и В. А. Поляков, *Изотопия гидросферы Земли* (Изд-во «Научный мир», М., 2009).
4. T. C. Barnes, *Science* **79** (2050), 370 (1934).
5. Б. Н. Родимов, *Сельское хоз-во Сибири*, № 76, 66 (1961).
6. И. В. Торопцев, Б. Н. Родимов, А. М. Маршунина и др., в сб. *Вопросы радиобиологии и гематологии* (Изд-во Томского ун-та, Томск, 1966), сс. 118–126.
7. В. И. Лобышев, *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **3** (3), 511 (2018).
8. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, and S. Dzhimak, *Nutrients* **11**, 1903 (2019).
9. X. Xie and R. A. Zubarev, *Sci. Rep.* **5**, 9215 (2015).
10. D. Johnson and H. Lardy, in *Methods in Enzymology*, ed. by R. W. Estbrook and M. E. Pullman (N.-Y., Acad. Press, 1967), v. 10, pp. 94–96.
11. A. A. Selin, N. V. Lobysheva, O. N. Vorontsova, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **153** (1), 44 (2012).
12. С. А. Еремеев и Л. С. Ягужинский, *Биохимия* **80** (5), 682 (2015).
13. M. D. Brand, *Exp. Gerontol.* **45**, 466 (2010).
14. F. L. Muller, Y. Liu, H. Van Remmen, *J. Biol. Chem.* **279**, 49064 (2004).
15. C. L. Quinlan, A. L. Orr, I. V. Perevoshchikova, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 27255 (2012).
16. И. А. Помыткин и О. Е. Колесова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **142** (11), 514 (2006).
17. С. С. Джимаков, А. А. Басов, Н. Н. Волченко и др., *Докл. РАН* **476** (5), 584 (2017).
18. X. Zhang, M. Gaetani, A. Chernobrovkin, and R. A. Zubarev, *Mol. Cell. Proteomics* **18** (12), 2373 (2019).

Functional Activity of Mitochondria in Deuterium Depleted Water

N.V. Lobysheva*, S.V. Nesterov**, ***, Yu.A. Skorobogatova*, and V.I. Lobyshev****

*Belozersky Research Institute for Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119992 Russia

**Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, 6-ya Radialnaya ul. 24/14, Moscow, 115409 Russia

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

****Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

The efficiency of phosphorylation in samples of isolated rat liver mitochondria in isotopically different incubation media at deuterium content of 6, 60, 90, 120, 150 ppm, and 0.1, 1, and 2% was studied. In environments with the lowest deuterium content down to 60 ppm, there was a monotonic decline in the ADP/O ratio, and its value at 6 ppm was equivalent to that seen at 60 ppm. The generation of superoxide anion by complexes I, II and III of the mitochondrial respiratory transport chain was also investigated. In all studied modes of mitochondrial operation using electron chain inhibitors the generation of superoxide anion did not depend on the deuterium concentration in the incubation medium.

Keywords: mitochondria, electron transport, inhibitors, superoxide anion, hydrogen peroxide, phosphorylation, water deuterium, isotopic effects