

УДК 577.24

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АНТИОКСИДАНТА SkQ1 С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ НА УРОВЕНЬ ЦИТОХРОМОВ P450 В ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2015 К.Н. Мясоедова^{1,2*}, Д.Н. Силачев^{2,3}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва;
факс: +7(499)726-5547, электронная почта: skulach@belozersky.msu.ru

² НИИ Митохондриологии, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва; факс: +7(495)939-5945

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; факс: +7(495)939-0338

Поступила в редакцию 01.10.15

Исследовано действие SkQ1 (антиоксиданта, адресованного в митохондрии) на содержание цитохромов P450 в печени взрослых крыс, получавших длительное время (до 24 месяцев) SkQ1 в количестве 250 нмоль/кг веса в сутки, что соответствует терапевтической дозе этого антиоксиданта в доклинических испытаниях. Длительное введение SkQ1 в таких дозах не влияло на уровень цитохромов P450 в печени экспериментальных животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром P450, SkQ1, митохондриально-адресованный антиоксидант.

Аутооксидабельные гемопротейны цитохромы P450, получившие название по специфической полосе поглощения света при 450 нм в спектре восстановленных комплексов этих белков с оксидом углерода, в печени человека и животных представлены группой форм, обладающих уникальной способностью катализировать окислительные превращения чужеродных для организма органических соединений различной химической природы (ксенобиотиков). В других тканях цитохромы P450 (в геноме человека в общей сложности обнаружено более 50 генов этих гемопротейнов) преимущественно осуществляют реакции эндогенных субстратов, в том числе реакции биосинтеза и метаболизма ряда физиологически активных веществ [1–6].

Ксенобиотики (лекарства, наркотики, токсины, разнообразные факторы загрязнения окружающей среды и т.п.), биотрансформация которых происходит с участием цитохромов P450, способны индуцировать обратимое увеличение фонда этих гемопротейнов в печени в значительных пределах вследствие стимуляции биосинтеза одной или одновременно нескольких их форм [5].

Принятые сокращения: SkQ1, пластохинонилдецилтрифенилфосфоний.

* Адресат для корреспонденции.

Формы цитохрома P450 обладают необычными кинетическими свойствами и чрезвычайно широкой субстратной специфичностью, феномен которой не имеет до сих пор однозначного объяснения. Так, например, одна из наиболее изученных форм P450 печени человека (форма 3A4) способна метаболизировать до 50% всех лекарств, имеющих себя на фармакологическом рынке [3, 4, 6].

До недавнего времени цитохромы P450 рассматривали как компоненты главной детоксицирующей системы организма, окисляющей и, тем самым, гидрофилизующей чужеродные соединения, облегчая их выведение из организма. Однако показано, что продукты окисления зачастую более опасны (токсичны, канцерогенны и т.п.), чем исходные соединения. Так, например, происходит активация потенциальных канцерогенов – полициклических ароматических углеводородов, в частности, бенз(а)пирена [2, 6]. Это обстоятельство обуславливает необходимость изучения возможной индукции цитохромов P450 новыми медицинскими препаратами, рекомендованными к применению в качестве лечебных средств при тех или иных патологиях.

Один из таких препаратов – синтетическое производное пластохинона, конъюгированное с проникающим катионом децилтрифенилфосфония (SkQ1). Это вещество, синтезированное в

нашей лаборатории [7], прошло доклинические и клинические испытания [7–12], было рекомендовано к применению для терапии ряда заболеваний человека и с 2012 г. поступило в аптеки.

В предшествующей работе мы показали, что терапевтические дозы SkQ1 не оказывают влияния на уровень цитохромов *P450* в печени крыс в краткосрочных экспериментах (5 сут). Способность крыс к индуктивному ответу контролировали, используя классический индуктор фенобарбитал, вызывавший значительное повышение содержания цитохромов *P450* в печени таких же крыс [13].

В настоящей работе мы измерили общее количество цитохромов *P450* в печени взрослых крыс, в течение многих месяцев (до 24 мес.) ежедневно получавших с питьевой водой SkQ1 в терапевтической дозе, в сравнении с соответствующими контрольными животными.

В эксперименте были использованы самки беспородных крыс — альбиносов, которые, начиная с возраста 3,5 месяца ежедневно получали раствор SkQ1 из расчета 250 нмоль SkQ1/кг веса в сутки.

Животных забивали в возрасте от 23 до 28 месяцев. За сутки до забоя крыс лишали пищи. После декапитации крыс печень тщательно перфузировали холодным физраствором, измельчали в блендере на холоду в небольшом объеме 0,15 М KCl с 5 мМ ЭДТА и затем гомогенизировали в том же растворе в соотношении 1 : 3 с помощью гомогенизатора Даунса с тефлоновым пестиком. Фракцию микросом получали обычным методом дифференциального центрифугирования. Конечный осадок после центрифугирования в течение 1 ч при 105 000 g осторожно, не взмучивая, обмывали буфером, содержащим 100 мМ K_2HPO_4 , 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол и 20%-ный глицерин, pH 7,4. Осадок суспендировали в небольшом количестве того же буфера. Общее количество цитохромов *P450* в микросомах определяли спектрофотометрически по дифференциальной схеме Омура и Сато [14], используя поглощение света восстановленным комплексом *P450* с оксидом углерода при длине волны 450 нм и коэффициент молярной экстинкции $91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Белок определяли по методу Лоури [15].

Результаты приведены в таблице, где указано содержание цитохромов *P450* в микросомах печени для каждой из крыс контрольной и опытной групп животных. Данные свидетельствуют об отсутствии индуцирующего эффекта терапевтических доз SkQ1 на содержание цитохромов *P450* в печени крыс после многомесячного введения антиоксиданта.

Количество цитохромов *P450* в микросомах печени контрольных крыс и крыс, длительное время получавших SkQ1 в дозе 250 нмоль/кг веса (нмоль цитохром *P450* на мг белка микросом)

Контроль	SkQ1
1,02	0,89
0,45	0,48
0,64	0,40
0,91	0,62
0,69	0,57
0,53	0,34
0,44	0,47
0,67	0,40
0,73	0,69
0,74	0,77
0,67	
	Среднее
0,68 ± 0,18	0,56 ± 0,18

Данные, полученные на крысах 1,5–2-мес. возраста, обычно используемых при изучении феномена индукции цитохромов *P450* и представленные нами ранее [13], также демонстрировали отсутствие индуктивного ответа на SkQ1 и классические величины содержания цитохромов *P450* в печени нормальных крыс (около 0,8 нмоль на мг белка) на фоне значительной индукции фенобарбиталом. Известно, что способность к индуктивному ответу на фенобарбитал у крыс сохраняется в любом возрасте, хотя наблюдается тенденция к снижению с возрастом ряда параметров, характеризующих активность монооксигеназ типа *P450* [5].

На основании полученных данных следует, что катион SkQ1 либо не обладает способностью индуцировать цитохромы *P450*, либо терапевтические дозы (250 нмоль/кг веса в сутки) слишком малы, чтобы вызвать подобный нежелательный эффект, который мог бы оказаться опасным в токсикологическом или канцерогенном аспектах.

Приносим глубокую благодарность О.А. Авериной за предоставленную возможность использовать печень животных, получавших SkQ1 и подготовленных для другой работы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Furge, L.L., and Guengerich, F.P. (2006) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: an introduction, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **34**, 66–74.
2. Coon, M.J. (2002) Enzyme ingenuity in biological oxidations: a trail leading to cytochrome P450, *J. Biol. Chem.*, **277**, 28351–28363.
3. Ekroos, M., and Sjogren, T. (2006) Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13682–13687.
4. Guengerich, F.P. (2006) A malleable catalyst dominates the metabolism of drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13565–13566.
5. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. (1981) Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков, Наука, Новосибирск.
6. Мясоедова К.Н. (2008) Новое в изучении цитохромов P450, *Биохимия*, **73**, 1199–1205.
7. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Черняк Б.В., Чертков В.А., Домнина Л.В., Иванова О.Ю., Изюмов Д.С., Хайлова Л.С., Клишин С.С., Коршунова Г.А., Лямзаев К.Г., Мунтян М.С., Непряхина О.К., Пашковская А.А., Плетюшкина О.Ю., Пустовидко А.В., Рогинский В.А., Рокицкая Т.И., Рууге Э.К., Сапрунова В.Б., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев И.В., Скулачев М.В., Сумбатян Н.В., Свириева И.В., Ташлицкий В.Н., Васильев Ю.М., Высоких М.Ю., Ягужинский Л.С., Замятнин А.А., мл., Скулачев В.П. (2008) Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. I. Катионные производные пластохинона: синтез и исследование *in vitro*, *Биохимия*, **73**, 1589–1606.
8. Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Elichev, V.P., Filenko, O.F., Kalinina, N.I., Kapelko, V.I., Kolosova, N.G., Kopnin, B.P., Korshunova, G.A., Lichinitser, M.R., Obukhova, L.A., Pasyukova, E.G., Pisarenko, O.I., Roginsky, V.A., Ruuge, E.K., Senin, I.I., Severina, I.I., Skulachev, M.V., Spivak, I.M., Tashlitsky, V.N., Tkachuk, V.A., Vyssokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437–461.
9. Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, E.N., Vyssokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Markova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
10. Skulachev, M.V., Antonenko, Y.N., Anisimov, V.N., Chernyak, B.V., Cherepanov, D.A., Chistyakov, V.A., Egorov, M.V., Kolosova, N.G., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Plotnikov, E.Y., Roginsky, V.A., Savchenko, A.Y., Severina, I.I., Severin, F.F., Shkurat, T.P., Tashlitsky, V.N., Shidlovsky, K.M., Vyssokikh, M.Y., Zamyatnin, A.A., Jr., Zorov, D.B., and Skulachev, V.P. (2011) Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies, *Curr. Drug Targets*, **12**, 800–826.
11. Нероев В.В., Архипова М.М., Бакеева Л.Е., Фурсова А.Ж., Григорян Е.Н., Гришанова А.Ю., Иомдина Е.Н., Иващенко Ж.Н., Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П., Килина О.В., Колосова Н.Г., Копенкин Е.П., Коршунов С.С., Ковалева Н.А., Новикова Ю.П., Филиппов П.П., Пилипенко Д.И., Робустова О.В., Сапрунова В.Б., Сенин И.И., Скулачев М.В., Сотникова Л.Ф., Стефанова Н.А., Тихомирова Н.К., Цапенко И.В., Щипанова А.И., Зиновкин Р.А., Скулачев В.П. (2008) Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 4. Связанные с возрастом заболевания глаз. SkQ возвращает зрение слепым животным, *Биохимия*, **73**, 1641–1654.
12. Яни Е.В., Катаргина Л.А., Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Савченко А.Ю., Выгодин Е.Ю., Гудкова Е.Ю., Замятнин А.А., мл., Скулачев М.В. (2012) Первый опыт использования препарата Визомитин в терапии «сухого глаза», *Практ. мед.*, **1**, 134–137.
13. Мясоедова К.Н., Силачев Д.Н. (2014) Терапевтические дозы SkQ1 не индуцируют цитохромы P450 в печени крыс, *Биохимия*, **79**, 1389–1392.
14. Omura, T., and Sato, R. (1964) Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370–2378.
15. Досон Р., Эллиот Д., Джонс К. (1991) Справочник биохимика, Мир, Москва.

A STUDY OF THE EFFECT OF LONG-TERM TREATMENT OF RATS WITH ANTIOXIDANT SkQ1 ADDED TO THE DRINKING WATER UPON THE P450 LEVEL IN RAT LIVER

K. N. Myasoedova^{1,2*}, D. N. Silachev^{2,3}

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow 119991, Russia; E-mail: skulach@genebee.msu.ru

² Institute of Mitoengineering, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-5945

³ N. A. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-0338

Received October 1, 2015

It is shown that mitochondria-targeted cationic antioxidant plastoquinonyl decyltriphenyl phosphonium (SkQ1) added to the drinking water in therapeutic doses (250 nmol/kg per day) for a long time (up to 24 months) does not induce cytochromes P450 in rat liver.

Key words: cytochrome P450, SkQ1, mitochondria-targeted antioxidant