

УДК 577.161.6+577.152.1

Петухов Д. М., Данченко Г. В., Кузьменко І. В., Кучменко О. Б.

КОМПЛЕКСНА ДІЯ ПОПЕРЕДНИКІВ ТА МЕДІАТОРІВ БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ НА ЙОГО ВМІСТ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ В УБІХІНОН-ЗАЛЕЖНИХ ФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМАХ ТКАНИН ЩУРІВ

Статтю присвячено дослідженню можливості підвищення концентрації убіхінону в органах та покращення ефективності функціонування убіхінон-залежних ферментних систем ланцюга транспорту електронів мітохондрій у інтактних тварин. Показано, що введення тваринам ПОВКУ комплексу з такими ефекторами біосинтезу та функціонування убіхінону, як вітамін Е, магній та диметилсульфоксид, є ефективним щодо забезпечення тварин убіхіноном та підсилення його функціонування як коферменту у ферментних комплексах сукцинат- та NADH-убіхінон-редуктази.

Убіхінон (кофермент Q, CoQ) - тетразаміщений бензохінон, широко розповсюджений у природі. Різні його гомологи зустрічаються серед усіх аеробних організмів. Для вищих рослин та вищих тварин (зокрема, ссавців) характерним є CoQ з десятьма ізопреноїдними залишками в бічному ланцюзі. Внутрішньоклітинне CoQ локалізується переважно у внутрішній мембрані мітохондрій, де він виконує свою, ймовірно, найважливішу функцію — транспортує електрони та протони від NADH-сукцинат-дегідрогеназних комплексів до комплексів цитохромів b-Sj у ланцюзі транспорту електронів (ЛТЕ) мітохондрій [7,8,12,15,21]. Оскільки реакції CoQ з ферментними системами є основною лімітуючою за часом реакцією в ЛТЕ, критичним для нормального функціонування мітохондрій та клітини в цілому є наявність у внутрішній мітохондріальній мембрані достатнього функціонально активного пулу CoQ.

Поповнення внутрішньоклітинного пулу CoQ відбувається як за рахунок ендогенного синтезу,

так і надходження ззовні. Відомо, що біосинтез хінонового кільця відбувається через утворення пара-оксibenзойної кислоти (ПОВК) [1, 18, 19]. З'ясовано, що вітамін Е значно активізує біосинтез CoQ у тканинах дослідних тварин. У тканинах вітамін Е-недостатніх тварин процеси біосинтезу CoQ значно знижені порівняно з контрольними тваринами [2, 6]. Активність CoQ-залежних ферментних систем мітохондрій при цьому знижена порівняно з контролем [3].

У зв'язку з тим, що біосинтез CoQ в організмі людини та тварин порушується (стресові ситуації, похилий вік, різноманітні хвороби тощо), існує потреба пошуку шляхів підвищення забезпеченості CoQ в організмі людини [9, 10, 11, 13, 16, 17, 20, 22]. У відділі біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України протягом багатьох років вивчаються можливості стимуляції ендогенного синтезу CoQ [1], що на сьогодні є актуальним і має не тільки теоретичне значення, а й становить великий практичний інтерес [4, 5].

У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідження впливу на біосинтез CoQ та функціонування CoQ-залежних ферментних систем ЛТЕ мітохондрій одного з попередників біосинтезу CoQ - ПОбК та вітаміну Е і деяких можливих медіаторів біосинтезу CoQ.

Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження слугували білі лабораторні шури-самці лінії Вістар масою 155-190 г, яких витримували у карантині протягом двох тижнів; під час досліду вони отримували повноцінний стандартний раціон віварію.

З метою визначення можливості підвищення концентрації CoQ в органах та покращення ефективності функціонування CoQ-залежних ферментних систем ЛТЕ мітохондрій у інтактних тварин вивчалися такі біологічно активні сполуки (БАС), що можуть бути потенційними активаторами ендogenous синтезу CoQ та впливати на його функціонування в ЛТЕ мітохондрій, а саме: ПОбК - як попередник біосинтезу CoQ, метіонін - як речовина, що слугує донором металних груп у біосинтезі бензохінонової частини молекули CoQ, магній - як важливий компонент енергетичного балансу клітини та диметилсульфоксид (ДМСО) - як активний транспортер БАС і потенційний модифікатор мембран, у яких функціонує CoQ. Дію всіх цих сполук (БАС) та їх комплексів перевіряли на фоні введення вітаміну Е - відомого регулятора біосинтезу CoQ, а також враховуючи отримані на попередньому етапі дослідження дані щодо можливої синергічної дії вітаміну Е та попередника біосинтезу CoQ - ПОбК [1].

Тварин було розділено на шість груп:

- контроль (інтактні тварини, які отримували перорально воду та оливкову олію);
- тварини, які отримували олійний розчин вітаміну Е (група Е);
- тварини, які отримували олійний розчин вітаміну Е разом із водним розчином метіоніну (група ЕМ);
- тварини, які отримували олійний розчин вітаміну Е разом із водними розчинами метіоніну і ПОбК (група ЕМП);
- тварини, які отримували олійний розчин вітаміну Е разом із водними розчинами метіоніну, ПОбК і магнію (група ЕМПМ);
- тварини, які отримували олійний розчин вітаміну Е разом із водними розчинами ПОбК і ДМСО (група ЕПД).

Зазначені препарати вводили кожної доби перорально одноразово за допомогою зонду протягом

трьох днів. Дози препаратів вибирали згідно з даними наукової літератури щодо впливу кожного окремого препарату на вміст убіхінону в тканинах шурів [1]. Дози були такі: вітамін Е - 10 мг/кг живої маси, ПОбК - 50 мг/кг, метіонін - 15 мг/кг, магній - 5 мг/кг, ДМСО - 75 мг/кг живої маси.

Через 18 годин після останнього введення шурів піддавали декапітації із дотриманням вимог міжнародних конвенцій щодо гуманного поводження з тваринами в умовах лабораторних досліджень. Забирали тканину печінки (одну й ту саму частку) і серце. Отримані тканини промивали в охолодженому розчині буфера та переносили в пробірки на льоду. Буфером слугував 0,25 М розчин сахарози на 0,05 М трис(гідроксиметил)амінометані (рН 7,36) з додаванням 0,001 М етилендіамінтетраацетату (ЕДТА).

Мітохондрії виділяли методом диференційного ультрацентрифугування [24].

У гомогенаті печінки та в серці визначали вміст токоферолу, CoQ та загального білка. В мітохондріях визначали активність ферментів ЛТЕ: суКпННар-CoQ-peflyKTasH (CQR) та NADH-CoQ-редуктази (HQR). Для визначення CoQ та токоферолу у гомогенаті використовували методику, розроблену у відділі біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна ПАН України [2]. Вміст білка в гомогенатах і препаратах мітохондрій визначали за методом Лоурі [14]. Активність CoQ-залежних ферментів CQR та HQR визначали за методом Зіглера [23] та Тарасової [25] відповідно. Активність обох ферментативних систем визначали як без додавання, так і після внесення в систему CoQ, перша позначена як А₁, - активність CQR або HQR у пробах, друга як А₂, - активність тієї ж ферментативної системи після додавання до реакційної суміші Q₁.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики. Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стюдента (*t*).

Результати дослідження та їх обговорення

Результати визначення вмісту CoQ в органах та органах дослідних тварин наведено в таблицях 1 і 2. Як бачимо, вміст CoQ в гомогенаті печінки тварин усіх дослідних груп помітно зростає порівняно з контролем. Кількісно зростання є приблизно однаковим у групах Е, ЕМ та ЕМП, більш помітним - у групі ЕПД та особливо значним - у групі ЕМПМ. Зміни концентрацій CoQ в тканині серця та в мітохондріях печінки тварин дослідних груп не є такими однозначними

Таблиця 1. Вміст CoQ в гомогенатах печінки та серця шурів, мкг/г тканини (M ± m, n = 7 - 8)

Група	Гомогенати печінки	Гомогенати серця
Контроль	15,74 ± 2,12	33,23 ± 9,02
Е	19,27 ± 1,13	36,55 ± 6,99
ЕМ	21,55* ± 2,87	24,21 ± 2,37
ЕМП	19,58 ± 2,08	42,72 ± 3,87
ЕМПМ	27,79* ± 1,29	37,34 ± 7,91
ЕПД	23,74* ± 1,73	55,86* ± 13,52

* Різниця достовірна порівняно з контролем (p < 0,05).

Таблиця 2. Вміст CoQ в мітохондріях печінки шурів, мкг у мітохондріях з 1 г тканини (M ± m, n = 7 - 8)

Група	Одиниці виміру	
	мкг/г мітохондрій	мкг/г білка
Контроль	4,48 ± 0,47	110,2 ± 14,7
Е	6,17* ± 0,94	179,9* ± 37,6
ЕМ	6,45* ± 0,89	181,4* ± 19,9
ЕМП	8,24* ± 0,59	250,3* ± 17,1
ЕМПМ	6,17* ± 0,33	145,6* ± 12,9
ЕПД	7,95* ± 0,46	184,3* ± 41,1

* Різниця достовірна порівняно з контролем (p < 0,05).

(нагадаємо, що неоднозначність цих показників спостерігалася і при зміні концентрацій вітаміну Е). Вміст CoQ в тканині серця дещо збільшується в групах, які отримували Е та ЕМПМ, помітніше - в групі, що отримувала препарат ЕМП, і найбільш інтенсивно - в групі, яка отримувала препарат ЕПД. Водночас спостерігаємо зниження цього показника в групі тварин, які отримували препарат ЕМ. Подібним же чином вміст CoQ в мітохондріях печінки шурів дещо зростає порівняно з контролем у групах Е та ЕМПМ і достовірно зростає - в групі ЕМП. Проте за цим показником група ЕПД не виділяється настільки ж помітно, як за вмістом CoQ в серці, й демонструє достовірне зростання приблизно до такого ж рівня, як і група, що отримувала ЕМП. Вміст CoQ в мітохондріях печінки тварин, які отримували препарат ЕМ, є порівняним із вмістом CoQ в мітохондріях тварин груп Е та ЕМПМ.

Можливо, отримана різниця показників вмісту CoQ в гомогенаті та в мітохондріях печінки в групі, що отримувала ЕМПМ, пояснюються накопиченням CoQ переважно в позамітохондріальній фракції. Водночас бачимо, що у тварин, які отримували ЕМП, перерозподіл відбувається якраз на користь мітохондріальної фракції - загальне зростання таке саме, як і в інших групах, а от зростання в мітохондріях є значно помітнішим. Очевидно, іони магнію певним чином сприяють перерозподілу внутрішньоклітинного CoQ на користь позамітохондріальної фракції. Ефективність ЕПД за всіма показниками є досить суттєвим фактом.

Показники активності функціонування CoQ-залежних ферментів ланцюга транспорту електронів мітохондрій печінки шурів наведено в табл. 3. Порівняно з контролем CQR-активність зростає в групі, що отримувала препарат ЕМ, більш помітно - в групі, яка отримувала ЕМПМ, і достовірно зростає в групі тварин, які отримували препарати Е та ЕПД. Водночас активність цього ферменту в групі ЕМП достовірно зменшується порівняно з контролем. При додаванні в середовище інкубації екзогенного Q, спостерігаємо подібні тенденції. Проте зменшення активності в групі ЕМП є менш вираженим, а зростання активності в групах ЕМПМ та ЕПД - майже однакове й значно інтенсивніше порівняно з іншими групами.

НQR-активність змінюється більш одномаїтно. Зростання A[^]активності цього ферменту в усіх дослідних групах порівняно з контрольною є

Таблиця 3. Активність ферментів ланцюга транспорту електронів CQR та HQR в мітохондріях печінки шурів (мкм/мг білка за 1 хв, M ± m, n = 7 - 8)

Група	HQR-активність		CQR-активність	
	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂
Контроль	52,85 ± 5,54	127,45 ± 9,56	206,58 ± 10,63	629,69 ± 35,46
Е	84,93* ± 5,85	133,48 ± 4,08	315,60* ± 4,68	788,07* ± 87,39
ЕМ	68,00* ± 5,51	139,94 ± 11,37	239,84* ± 14,84	738,73* ± 45,84
ЕМП	84,15* ± 5,86	156,34* ± 15,06	140,44* ± 14,57	574,51 ± 54,22
ЕМПМ	76,12* ± 3,84	156,44* ± 10,50	329,87* ± 40,79	1341,57* ± 99,20
ЕПД	95,17* ± 6,01	209,97* ± 7,64	379,83* ± 30,95	1380,50* ± 70,53

* Різниця достовірна порівняно з контролем (p < 0,05).

відносно стабільним; дещо більше ця активність зростає в групах Е, ЕМП і ЕПД. Менше відрізняється від показників контрольної групи й A_2 -активність цього ферментного комплексу. За цим показником група ЕМПМ вже не відрізняється так виразно від груп, що отримували інші препарати, та від контрольної, хоча в групі ЕПД все-таки прослідковується істотне зростання HQR-активності.

Таким чином, за показниками CQR ферментативної активності найефективнішими виявились препарати ЕМПМ та ЕПД. Очевидно, ці препарати впливають як на біосинтез CoQ, так і на функціональний стан мітохондріальних мембран, у складі яких функціонують ці ферментні комплекси і сам CoQ. Це підтверджується і результатами визначення HQR-активності, хоча остання виявилась менш чутливою до впливів досліджуваних комплексів.

Отже, введення комплексних препаратів Е, ЕМ, ЕМП, ЕМПМ та ЕПД призводить до зростання порівняно з контролем рівня CoQ в тканинах дослідних тварин та покращення ефективності функціонування CoQ-залежних ферментних систем мітохондрій при дії досліджуваних комплексних попередників та медіаторів біосинтезу CoQ.

Малу ефективність дії метіоніну разом із вітаміном Е порівняно з дією одного лише вітамі-

ну Е, очевидно, можна пояснити тим, що у тварин, що утримуються на повному раціоні, метильні групи не є лімітуючими при біосинтезі CoQ. Проте додавання до комплексу вітамін Е-метіонін ще й попередника синтезу бензохінонового ядра молекули CoQ (ПОБК) підвищує його вміст у мітохондріях гепатоцитів дослідних тварин на 33,55 % порівняно з групою, яка отримувала тільки вітамін Е, а введення до цього комплексу речовин ще й магнію збільшує ефективність функціонування NADH-, і особливо сукцинат-CoQ-редуктазного, ферментних комплексів.

Цікавими є також результати дії комплексу вітаміну Е, ПОБК і ДМСО: CoQ в тканинах серця та печінки, в мітохондріях печінки вище, ніж у контрольній групі, а також у групі, яка отримувала тільки вітамін Е. Функціонування CoQ-залежних ферментних комплексів також є більш ефективним у цій групі тварин, ніж у контрольній.

Таким чином, можна підсумувати, що забезпечення тварин ПОБК у комплексі з такими ефекторами біосинтезу та функціонування CoQ, як вітамін Е, магній та диметилсульфоксид, є ефективним щодо забезпечення тварин CoQ та підсилення його функціонування як коферменту у ферментних комплексах CQR та HQR.

1. Данченко Г. В. Биохимия убихинона (Q).- К.: Наук, думка, 1980.- 240 с.
2. Данченко Г. В., Коваленко В. Н., Забарная Е. Н., Маковецкий В. П., Басалкевич Е. Д., Яременко В. В., Свищук А. А., Халмураоова А. Г. Действие производных а-токоферола на содержание природных хинонов в тканях витамин Е-недостаточных крыс // Биохимия.- 1979.- Т. 44.- № 5.- С. 923-930.
3. Данченко Г. В., Кузьменко И. В., Коваленко В. Н., Гололобов А. Д., Тарасова Н. В. Действие витамина Е и убихинона-9 на активность убихинон-зависимых ферментных систем печени крыс // Укр. біохім. журн.- 1980.- Т. 52.- № 3.- С. 353-358.
4. Кузьменко І. В., Орловська Т. В., Петухов Д. М. Дослідження вмісту убихінону та функціонування убихінон-залежних ферментних систем за впливу вітаміну Е та пара-оксисбензойної кислоти//Там само-2002-Т. 74.-№4а(дод. 1).- С. 51-52.
5. Петухов Д. М., Данченко Г. В., Кузьменко И. В. Содержание убихинона и активность убихинон-зависимых ферментных систем при модуляции его биосинтеза // Тезисы докладов VII Путинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века».- М., 2003.- С. 398-399.
6. Чернухіна Л. О., Данченко Г. В., Золоташко О. М., Теплицька Л. Ю. Вміст CoQ та убіхромонолу в печінці шурів за різної забезпеченості організму вітаміном Е // Укр. біохім. журнал.- 1975.-Т. 47-№ 4.- С. 518-521.
7. Crane F. L. Biochemical functions of coenzyme Q10 // J. Amer. College of Nutrition.- 2001.- Vol. 20.- № 6.- P. 591-598.
8. Di Giovanni S., Mirabella M., Spinazzola A. et al. Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency // Neurology- 2001- Vol. 57.- №3.-P. 515-518.
9. Do T. Q., Hsu A. Y., Jonassen T. et al. A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abcl mutants // J. Biol. Chemistry.- 2001.-V. 276-№21.-P. 18 161-18 168.
10. Eaton S., Skinner R., Hale J. P. et al. Plasma coenzyme Q(10) in children and adolescents undergoing doxorubicin therapy // Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.- 2000.- V. 302-№ 1-2.-P. 1-9.
11. Hodgson J. M., Watts G. E., Playford D.A. et al. Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes // Eur. J. Clin. Nutr.- 2002.- V. 56.-№ 11.-P. 1137-1142.
12. Jayarman J., Ramasarma T. Determination of small quantities of coenzyme Q and related compounds in biological membrane // Journal of Scientific and Industrial Research Community.- 1961.- V. 20.- № 3.- P. 69-104.
13. Litami G. P., Jones D., Scholler J. et al. Deficiency of coenzyme Q₁₀ in a succinate-CoQ₁₀-enzyme in the dystrophic rabbit on an antioxidant deficient diet // International Journal on Vitamin and Nutrition Research.- 1972.- V. 42.- № 1.- P. 128-137.
14. Lowry O. N., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // Journal of Biological Chemistry.- 1951.- V. 193.- № 1.- P. 265-275.
15. Morton R. A. Ubiquinones, plastoquinones and vitamin K // Biological Reviews of Cambridge Philosophical Society.- 1971.- Vol. 46.- № 1.- P. 47-96.
16. Musumeci O., Nairn A., Slonim A. E. et al. Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency // Neurology.- 2001.- V. 56.- № 7.- P. 849-855.
17. Nakamura R., Litaru G. P., Folkers K. A new enzymic assay for human deficiencies of coenzyme Q₁₀ // International Journal of Vitamin and Nutritional Research- 1973.- V. 43.- № 4.- P. 526-536.
18. Olson R. E. Anabolism of the coenzyme Q family and their biological activities // Federal Proceedings.- 1965.- V. 240.- № 1.-P. 514-524.

19. Rudney H., Raman T. S. Biosynthesis of ubiquinones and vitamin K in microorganisms // Vitamins and Hormons.— 1966—Vol. 24—P. 531-549.
20. Sorter B. Coenzyme Q10 and cardiovascular disease: a review // The Journal of cardiovascular nursing.— 2002.— Vol. 16.— № 4.— P. 9-20.
21. Smeitink J., Sengers R., Trijbels F. et al. Human NADH: ubiquinone oxidoreductase // Journal of bioenergetics and biomembranes.— 2001.— Vol. 33—№. 3.— P. 259-266.
22. Thomas S. R., Leichtweis S. B., Pettersson K. et al. Dietary co-supplementation with vitamin E and coenzyme Q(10) inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.— 2001.— V. 21.— №4.— P. 585-593.
23. Ziegler D., Doeg K. A. Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase (complex II): Methods in Enzymology.— N. Y., 1967.— V. 10— P. 231-235.
24. Schneider V. C. Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fraction // J. Biol. Chem.— 1948.— Vol. 176— № 2.— P. 259-262.
25. Тарасова Н. В., Иванова Г. П., Гололобов А. Д. // Микробиология— 1976.— Т. 45— № 3— С. 400-405.

D. Petukhov, G. Donchenko, I. Kuzmenko, O. Kuchmenko

COMPLEX INFLUENCE OF PRECURSORS AND MEDIATORS OF UBIQUINONE BIOSYNTHESIS ON ITS CONTENT AND FUNCTION OF UBIQUINONE-DEPENDING ENZYME SYSTEMS

This article is devoted to study the possibilities of increase of ubiquinone content and improve the effectiveness of function of ubiquinone-depending enzyme systems at intact animals. Our results show that providing animals with para-oxybenzoic acids in complex with others precursors and mediators of ubiquinone biosynthesis - vitamin E, magnesium sulfate and dimethylsulfoxide is effective for increase of ubiquinone content and for activation of ubiquinone-depending enzyme systems - NADH-ubiquinone-reductase and succinate-ubiquinone-reductase.