

М. В. Белоусов<sup>1</sup>, Р. Р. Ахмеджанов<sup>2</sup>, М. В. Зыкова<sup>1</sup>, К. Ю. Васильев<sup>1</sup>,  
М. С. Юсубов<sup>1,2</sup>

## ВЛИЯНИЕ НАТИВНЫХ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НИЗИННОГО ТОРФА ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия.

<sup>2</sup> Томский политехнический университет, Томск, Россия.

Установлено, что гуминовые кислоты торфа (ГКТ) в условиях экспериментальной нормобарической гиперкапнической гипоксии нормализуют активность сукцинат- и НАД-зависимых процессов энергопродукции в митохондриях головного мозга и печени мышей и предотвращают разобщение окислительного фосфорилирования. Антигипоксическое действие ГКТ не уступает эффектам эталонного антигипоксанта дигидрокверцетина в головном мозге и превосходит таковое в печени. Выявленная под действием ГКТ нормализация окислительного фосфорилирования в митохондриях головного мозга и печени, вероятно, обусловлена их протекторными свойствами, благодаря которым предотвращается свободнорадикальное повреждение клеток и органелл в условиях гипоксии.

**Ключевые слова:** гуминовые кислоты торфа; гипоксия; антигипоксическое действие; окислительное фосфорилирование.

Согласно литературным данным, гипоксическое воздействие сопровождается усилением процессов перекисного окисления липидов и, как следствие, разобщением окислительного фосфорилирования в митохондриях (МХ) в результате свободнорадикального повреждения клеток [1]. Гуминовые кислоты торфа (ГКТ) проявляют выраженные антиоксидантные [2–5] и хелатирующие свойства [6–9], обладают способностью образовывать комплексы с ионами металлов, в том числе и ионами кальция, повреждающими мембраны МХ при гипоксических состояниях [10–13].

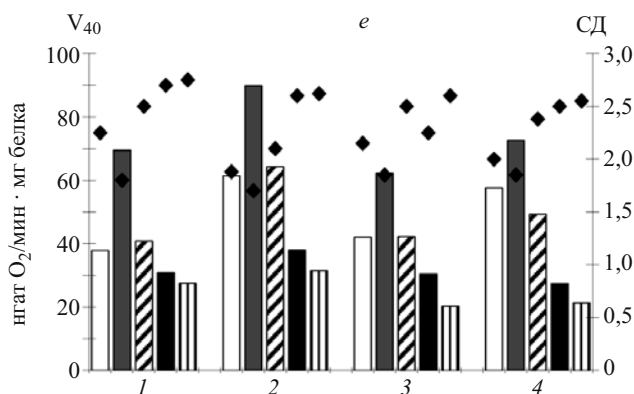
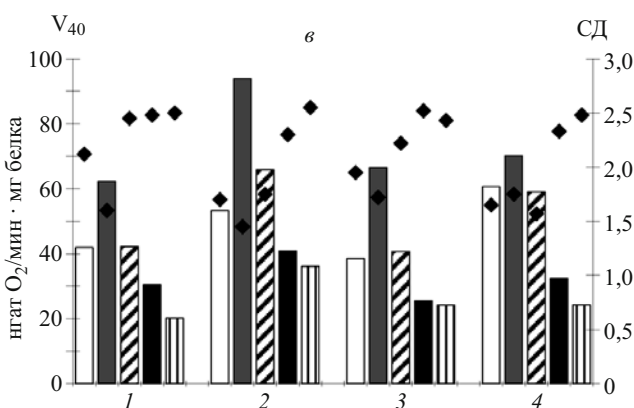
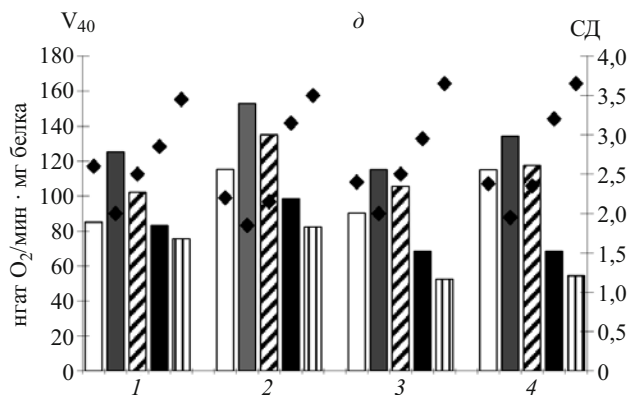
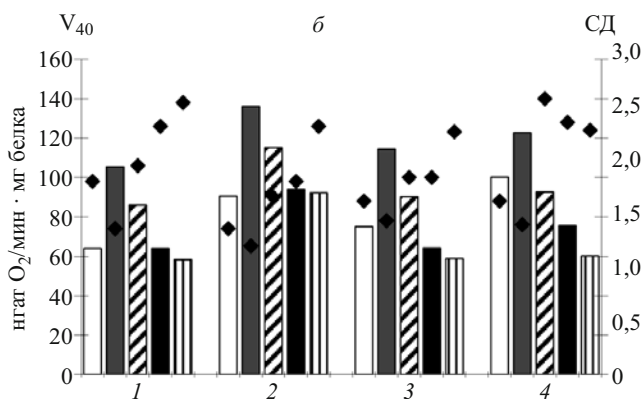
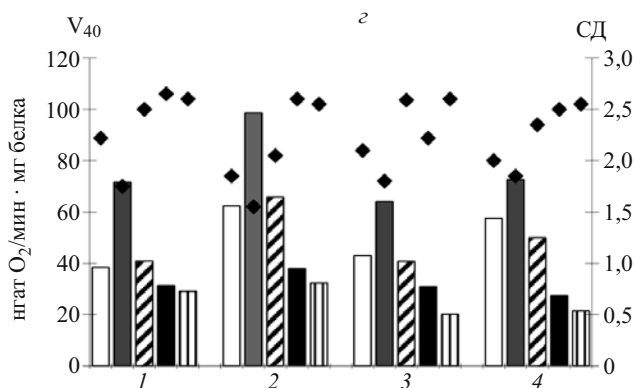
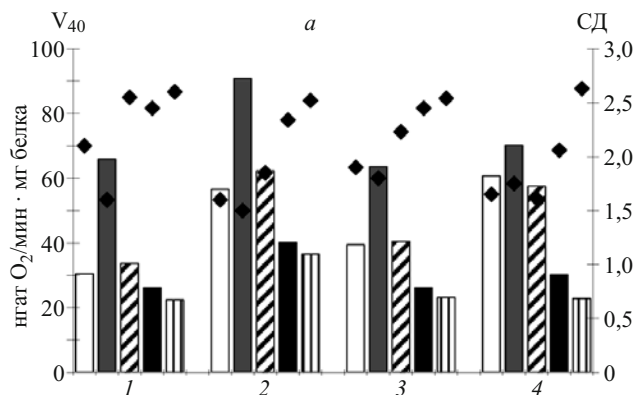
Исходя из этого, с целью выявления возможных механизмов антигипоксического действия ГКТ мы провели исследование их влияния на окислительное фосфорилирование в МХ головного мозга и печени на фоне гипоксического воздействия в сравнении с антиоксидантом дигидрокверцетином (ДКВ) [14], обладающим церебропротекторными и гемореологическими свойствами при острой ишемии головного мозга [15] и инфаркте миокарда [16].

### *Экспериментальная химическая часть*

Гуминовые кислоты (ГК) извлекали из низинного древесно-травяного вида торфа месторождения “Клюквенное” Томской области 0,1 н раствором натрия гидроксида без нагревания, осаждали из экстракта 10 % раствором хлористоводородной кислоты, отмывали водой, очищенной до нейтральной реакции по лакмусу, и высушивали при комнатной температуре. Стандартизацию исследуемых ГКТ проводили согласно разработанному нами ранее критериям [17], основанным на результатах ИК-спектроскопии (анализ проводили на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 5700, Thermo

Electron corp., США, по методу прессования с КВг в соотношении 1:100 соответственно, в интервале значений частоты от 500 до 4000 см<sup>-1</sup>), методов обратного титрования (содержание кислых функциональных групп определяли баритовым — для суммы фенольных и карбоксильных групп и кальций-ацетатным методом — для суммы карбоксильных групп [18], содержание фенольных гидроксидов находили по разности между суммарным содержанием функциональных групп и содержанием карбоксильных групп), элементного анализа (определяли методом сжигания на С,Н,N-анализаторе “Carlo Erba Strumentazione” модель 1106, Италия, содержание кислорода — по разности), спектроскопии в УФ области (проводили на спектрофотометре Uvikon 943, Италия, в диапазоне длин волн 190–700 нм в кварцевой кювете толщиной 1 см 0,001 % водных растворов ГК), эксклюзионной хроматографии (проводили методом ВЭЖХ на эксклюзионной колонке Supelco PROGEL-TSK GMPXL 300 × 7,8 mm, Япония; сорбент — 13 микрон, эффективность колонки — 11000 т.т.; подвижная фаза — вода, 1 мл/мин; хроматограф Agilent 1100, Германия, с вакуумным дегазатором, четырехканальным градиентным насосом и колоночным термостатом).

Полученные ГКТ представляют собой кристаллический порошок темно-коричневого цвета, без запаха. ИК-спектр исследуемых ГКТ содержит характерные полосы поглощения при длинах волн 3500–3300, 3250–3200, 2920, 2860, 1460–1440, 700–900, 2600–2500, 1725–1700, 1625–1610, 1510–1500, 1250–1225, 1050–1150 см<sup>-1</sup>. Содержание карбоксильных групп 2,86 мг · экв/г; фенольных гидроксидов — 3,22 мг · экв/г. Абсорбционный спектр ГКТ в ультрафиолетовой области выглядит как пологая кривая, имеет сплошное поглощение в интервале от 220 до



Влияние гуминовых кислот торфа и дигидрокверцетина на окислительное фосфорилирование митохондрий головного мозга (а, б, в) и печени (z, д, е) мышей при нормобарической гиперкапнической гипоксии.

**Примечания:** а) По оси абсцисс указаны группы: 1 — контроль; 2 — гипоксия; 3 — гипоксия + ГК; 4 — гипоксия + ДКВ. Светлые столбики — значения исследуемых показателей при окислении эндогенных субстратов; темные — сукцината; заштрихованные — смеси малата и глутамата; черные — малата, глутамата и малоната; с вертикальной штриховкой — малата, глутамата и аминоксиацетата. б) По осям ординат ромбами сверху обозначены величины правой шкалы (СД, ДК, АДФ/О), столбцами — величины левой шкалы (нанограмм — атом  $O_2/\text{мин} \cdot \text{мг белка}$ ). в) Приведены только значения статистически значимых ( $p < 0,05$ ) отличий ГКТ от ДКВ и контроля.

800 нм, резко возрастающее в коротковолновую сторону, имеет 2 максимума поглощения в области  $245 \pm 2$  нм и  $294 \pm 2$  нм. Коэффициенты экстинкции при длине волны 465 нм ( $E_{465}$ ) составляют  $0,020 \pm 0,002$ , при длине волны 650 нм ( $E_{650}$ ) —  $0,0041 \pm 0,0004$ , рассчитанный на их основании коэффициент цветности ( $E_{465}/E_{650}$ ) составляет  $4,88 \pm 0,05$ . По элементному составу ГКТ содержат масс. %: С 47,0; Н 5,5; N 3,8; О 43,5. Молекулярно-массовое распределение ГКТ имеет характерный спектр, молекулярная масса ГКТ составляет 1000 – 1200 кДа.

#### Экспериментальная биологическая часть

Эксперименты проведены на 24 половозрелых беспородных мышках-самцах массой 18 – 22 г. [19], которые были разделены на 4 исследуемые группы, в каждой по 6 животных. 1-я группа — мыши, до моделирования гипоксии, получавшие ГКТ внутрибрюшинно 1 раз в сут в течение 5 дней в дозе 100 мг/кг в виде 3 масс. % водного раствора. 2-я группа — животные, получавшие в качестве препарата сравнения антиоксидант дигидрокверцетин (Лавитол, дигидрокверцетин (ДКВ), ЗАО “Аметис”, Благовещенск, ТУ

9325-001-70692152-07 от 12.04.2007 г.) — соединение с полифенольной структурой (флавоноид) [14], обладающее церебропротекторными и гемореологическими свойствами при острой ишемии головного мозга [15] и инфаркте миокарда [16]. Дигидрокверцетин вводили предварительно внутривенно 1 раз в сут курсом 5 дней в виде раствора, приготовленного на 10 % этаноле в дозе 100 мг/кг. Последнее введение препарата ГКТ и ДКВ осуществляли за 2 ч до создания гипоксии. 3-я группа — животные группы сравнения, получавшие до гипоксии эквивалентные количества дистиллированной воды. В 4-ю группу вошли мыши интактного контроля.

Для моделирования нормобарической гиперкапнической гипоксии [20] мышей помещали в герметичную емкость объемом 0,2 л при  $t = 20 - 22$  °С до наступления агонального дыхания и генерализованных судорог, определяемых визуально (в среднем для интактных животных этот период составлял  $16,5 \pm 1,5$  мин и сопровождался нарушением координации движений, дыхания и судорогами). Животных умерщвляли методом дислокации шейных позвонков, непосредственно после 16,5 мин экспозиции гипоксии.

Функциональное состояние МХ оценивали по дыхательной активности гомогената головного мозга и печени полярографическим методом на анализаторе “Эксперт-001-401” (Эконикс-Эксперт, Москва), имеющем датчик измерения растворенного в воде кислорода [21]. Рассчитывали скорость потребления кислорода МХ до, во время и после цикла фосфорилирования добавленной до концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М АДФ ( $V_{4п}$ ,  $V_3$  и  $V_{4о}$ ) и время фосфорилирования. В качестве субстратов использовали флавинзависимый — сукцинат  $1 \cdot 10^{-3}$  М и НАД-зависимые — малат и глутамат, по  $3 \cdot 10^{-3}$  М. С целью выявления вклада в энергопродукцию МХ при окислении НАД-зависимых субстратов (НАД-ЗС) эндогенной ЯК (ЭЯК) применяли ингибитор сукцинатдегидрогеназы (СДГ) малонат  $2 \cdot 10^{-3}$  М и ингибитор аминотрансфераз аминоксиацетат  $5 \cdot 10^{-4}$  М. Вычисляли коэффициенты стимуляции дыхания ( $СД = V_3/V_{4п}$ ), дыхательного контроля ( $ДК = V_3/V_{4о}$ ) и сопряженности окислительного фосфорилирования АДФ/О.

Достоверность различий оценивали по критерию Вилкоксона — Манна — Уитни при уровне значимости 5 % ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и их обсуждение

Гипоксия в условиях нашего эксперимента приводит к возрастанию скорости поглощения кислорода МХ головного мозга и печени мышей при окислении эндогенных субстратов и уменьшению эффективности окислительного фосфорилирования (снижение величин СД, ДК и АДФ/О) (рисунок, а). Подобная закономерность наблюдается также и при утилизации МХ головного мозга и печени экзогенных субстратов — сукцината и смеси НАД-ЗС. При окислении органел-

лами НАД-ЗС наблюдали снижение метаболического контроля дыхания органелл, на что указывает повышение скоростей контролируемого окисления субстратов ( $V_{4п}$ ,  $V_{4о}$ ) в значительно большей степени, чем фосфорилирующего ( $V_3$ ), и существенное снижение эффективности окислительного фосфорилирования — коэффициента АДФ/О. Комплекс выявленных изменений может указывать на разобщение процесса окислительного фосфорилирования в МХ головного мозга и печени мышей под действием гипоксии.

Ингибиторный анализ указывает на снижение при избранной модели гипоксии чувствительности дыхания МХ в головном мозге при окислении НАД-ЗС в миокарде к блокатору СДГ — малонату и аминотрансфераз — аминоксиацетату (рисунок, б), что отражает развивающееся торможение образования и окисления ЭЯК [22, 23]. В отличие от МХ головного мозга, МХ печени мышей при окислении НАД-ЗС характеризовались (рисунок, д) увеличением чувствительности к ингибитору СДГ — малонату, что говорит о преимущественном окислении ими ЭЯК. Подобные данные хорошо согласуются с литературными сведениями о меньшей чувствительности клеток печени к недостатку кислорода в сравнении с головным мозгом [24].

В группе мышей, предварительно получавших ГКТ, к 16,5 минуте экспозиции гипоксии признаков агонального дыхания и генерализованных судорог не отмечалось. Гуминовые кислоты способствовали уменьшению скоростей утилизации эндогенных субстратов ( $V_{4п}$ ,  $V_3$  и  $V_{4о}$ ) МХ головного мозга и печени во всех метаболических состояниях при увеличении сопряженности окислительного фосфорилирования (увеличение коэффициента АДФ/О) (рисунок, б, д). Под действием ГКТ в МХ головного мозга и печени гипоксических животных наблюдается увеличение эффективности окисления субстратов всех типов (снижение скоростей дыхания МХ во всех метаболических состояниях) и окислительного фосфорилирования (увеличение коэффициентов СД, ДК), происходило восстановление метаболического контроля дыхания. Следует отметить, что при окислении МХ печени НАД-зависимых субстратов ГКТ наряду с увеличением коэффициентов СД и ДК способствовали значительному снижению скоростей контролируемого окисления  $V_{4о}$  и  $V_{4п}$ , что приводило к расширению диапазона дыхательной активности органелл ( $V_3 - V_4$ ). В МХ группы животных, получавших ГКТ, отмечена нормализация значений коэффициентов АДФ/О при окислении субстратов всех типов по сравнению с таковым показателем нелеченых животных (рисунок, б, д). Это свидетельствует об устранении признаков разобщения окислительного фосфорилирования при гипоксии под действием ГКТ.

Ингибиторный анализ НАД-зависимого окисления показал (рисунок, б) увеличение в МХ головного мозга мышей, предварительно получавших ГКТ, активности образования и окисления ЭЯК [25] что, по сути, отражает протективное действие ГКТ в данных условиях. ГК в МХ печени мышей поддерживали высокую

активность окисления и образования ЭЯК и резистентное состояние энергопродукции.

В отличие от ГКТ, в группе мышей, предварительно получавших ДКВ, к 16,5 мин гипоксии судороги наблюдаются у 16,7 % животных. Дигидрохверцетин способствовал увеличению коэффициента АДФ/О при окислении МХ головного мозга мышей эндогенных субстратов. При окислении МХ головного мозга мышей экзогенных субстратов (сукцината либо смеси малата и глутамата) ДКВ препятствовал увеличению скорости фосфорилирующего дыхания МХ и падению величин коэффициентов СД, ДК и АДФ/О, сниженных у гипоксических животных, не защищенных препаратом (рисунок, а, б, в). Это свидетельствует об увеличении эффективности окислительного фосфорилирования в МХ головного мозга животных, получавших ДКВ.

Ингибиторный анализ НАД-зависимого дыхания с использованием малоната позволил установить снижение под действием ДКВ скоростей контролируемого дыхания МХ головного мозга гипоксических животных ( $V_{4n}$  и  $V_{4o}$ ) при увеличении коэффициента АДФ/О (рисунок, а, б, в); применение ингибитора аминоксиацетата показало уменьшение дыхательной активности МХ печени во всех метаболических состояниях при неизменных коэффициентах СД и ДК (рисунок, з, д, е). Следовательно, ДКВ препятствует нарушению при гипоксии НАД-зависимого звена окисления субстратов в МХ, наиболее чувствительно к данной патологии [26].

Под действием ДКВ происходит увеличение эффективности окислительного фосфорилирования в МХ печени гипоксических животных при окислении ими эндогенных субстратов. Дигидрохверцетин при окислении сукцината препятствовал увеличению скоростей дыхания МХ печени до, во время и после цикла фосфорилирования АДФ и разобщению окислительного фосфорилирования (увеличение величин СД, ДК и АДФ/О). При окислении смеси малата и глутамата МХ печени мышей, получавших ДКВ в условиях гипоксии, наблюдали (рисунок, з, д, е) уменьшение скоростей дыхания во всех метаболических состояниях, а увеличение коэффициентов СД, ДК и АДФ/О также позволяет говорить о росте сопряженности окислительного фосфорилирования, сохранности структуры органелл [27]. Ингибиторный анализ НАД-зависимого дыхания МХ печени мышей, получавших ДКВ, позволил установить значительное увеличение чувствительности органелл к аминоксиацетату (рисунок, д), что указывает на сохранность под действием препарата механизмов интенсивного образования АТФ в клетке при гипоксии — продукции ЭЯК [25, 27].

Вместе с тем скорости дыхания МХ печени при утилизации эндогенных и НАД-ЗС в группе мышей, защищенных ДКВ, превышали величины, наблюдаемые у гипоксических животных, профилактически получавших ГКТ (рисунок), что может указывать на относительно меньшую антигипоксическую активность ДКВ в печени при избранной модели гипоксии.

Таким образом, ГКТ на модели нормобарической гиперкапнической гипоксии нормализуют активность сукцинат- и НАД-зависимых процессов энергопродукции в головном мозге и печени мышей и предотвращают разобщение окислительного фосфорилирования. Антигипоксическое действие ГКТ не уступает эффектам используемого в качестве объекта сравнения дигидрохверцетина в головном мозге и превосходит таковое в печени. Выявленная под действием ГКТ нормализация окислительного фосфорилирования в митохондриях головного мозга и печени, вероятно, обусловлена их протекторными свойствами, предотвращающими свободнорадикальное повреждение клеток и органелл в условиях гипоксии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Зозуля, В. А. Барабой, Д. В. Суткова, *Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга*, Знание, Москва (2000).
2. Г. В. Наумова, В. П. Стригуцкий, Н. А. Жмакова и др., *Химия твёрдого топлива*, № 2, 3 – 13 (2001).
3. Н. В. Юдина, С. И. Писарева, А. С. Саратиков, *Химия твёрдого топлива*, № 5, 31 – 34 (1996).
4. V. I. Saldan, *Abstrs. of the 12<sup>th</sup> International Peat Congress*, Tampere, Finland (2004), pp. 1205 – 1208.
5. V. P. Solovieva, H. P. Sotnikova, T. D. Lotosh, *Abstrs. of the 10<sup>th</sup> International Peat Congress*, Germany (1996), pp. 137 – 140.
6. Н. Г. Вязова, В. Н. Крюкова, В. П. Латышев, *Химия твёрдого топлива*, № 6, 47 – 50 (1999).
7. Н. И. Гамаюнов, Б. И. Масленников, Ю. А. Шульман, *Почвоведение*, № 1, 113 – 116 (1992).
8. А. Г. Заварзина, В. В. Дёмин, *Почвоведение*, № 10, 1246 – 1254 (1999).
9. А. И. Попов, *Гуминовые вещества: свойства, строение, образование*, Изд-во С.-Петерб. ун-та, Санкт-Петербург (2004).
10. В. М. Боголюбов, Г. Н. Пономаренко, *Общая физиотерапия*, СЛП, Москва, Санкт-Петербург (1996), сс. 433 – 437.
11. Э. С. Кашицкий, В. М. Козин, В. С. Улащик и др., *Известия Белорус. инженер. акад.*, № 2(8), 53 – 56 (1999).
12. В. М. Козин, В. М. Семенов, Д. С. Янушевский, *Вестник Витебского гос. мед. универ.*, 4(4), 93 – 96 (2005).
13. M. Kühnert, V. Fuchs, S. Golbs, *Труды международного симпозиума, 4 и 2 комиссий МТО*, Минск (1982), pp. 232 – 243.
14. *Регистр лекарственных средств России: энциклопедия лекарств*, РЛС, Москва (2004).
15. М. Б. Плотников, С. В. Логинов, Н. В. Пугаченко и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, № 10, 542 – 547 (2000).
16. М. Б. Плотников, О. И. Алиев, А. В. Ямкин, *Тромбоз, гемостаз и реология*, № 2, 30 – 32 (2001).
17. М. В. Зыкова, М. В. Белоусов, А. М. Гурьев и др., *Хим.-фарм. журн.*, 47(12), 53 – 56 (2013); *Pharm. Chem. J.*, 47(12), 675 – 678 (2013).
18. Н. Н. Данченко, И. В. Перминова, А. В. Гармаш и др., *Вестник Москов. универ.*, Сер. 2, Химия, 39(2), 127 – 131 (1998).
19. Р. У. Хабриев, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005).
20. Р. В. Гурто, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Томск (2000).
21. М. Н. Кондрашова, А. А. Ананенко, *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*, Москва (1973).
22. М. Н. Кондрашова, *Биофизика*, 34(3), 450 – 458 (1989).
23. М. Н. Кондрашова, *Биохимия*, 56(3), 388 – 402 (1991).

24. М. В. Биленко, *Ишемические и реперфузионные повреждения органов*, Медицина, Москва (1989).
25. М. Н. Кондрашова, *Митохондрии*, Москва (1973).
26. В. А. Хазанов, А. Н. Поборский, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **112**(9), 258 – 260 (1991).
27. Р. Р. Сайфутдинов, В. А. Хазанов, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **6**(5), 27 – 29 (1997).

Поступила 28.12.12

## EFFECT OF NATIVE HUMIC ACIDS ISOLATED FROM LOWLAND PEAT OF TOMSK REGION ON THE MITOCHONDRIAL OXIDATIVE PHOSPHORYLATION UNDER HYPOXIA CONDITIONS

M. V. Belousov<sup>1</sup>, R. R. Akhmedzhanov<sup>2</sup>, M. V. Zykova<sup>1</sup>, K. Yu. Vasil'ev<sup>1</sup>, and M. S. Yusubov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

<sup>2</sup> Tomsk National Research Polytechnic University, Tomsk, 634050 Russia

The properties of native humic acids isolated from lowland peat of Tomsk region have been studied under conditions of experimental normobaric hypoxia with hypercapnia. It is established that peat humic acids (PHAs) normalize the activity of succinate- and NAD-dependent processes of energy production and prevent disconnection of oxidative phosphorylation in cerebral and hepatic mitochondria of mice. The antihypoxic action of PHAs is comparable with that of the reference antihypoxant dihydroquercetin in the brain and exceeds the reference drug effect in the liver. The PHA-induced normalization of oxidative phosphorylation in cerebral and hepatic mitochondria is probably related to their protective properties, which prevent free-radical damage of the cells and organelles under hypoxia conditions.

**Keywords:** humic acids of peat; hypoxia; antihypoxic action; oxidative phosphorylation.