

УДК 546.65-022.532:577.337

ЩОДО МЕХАНІЗМІВ ВПЛИВУ РЕДОКСАКТИВНИХ НАНОЧАСТИНОК НА ОСНОВІ РІДКІСНОЗЕМЕЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ НА РЕДОКС-ПРОЦЕСИ В МІТОХОНДРІЯХ

К.А. Аверченко*, Н.С. Кавок, С.Л. Єфімова

Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, пр. Науки 60, Харків, 61001, Україна

Тел: +380573410332

e-mail: averchenko@isma.kharkov.ua

Надійшла до редакції 26 травня 2016 року

Прийнята 9 червня 2016 року

За допомогою кінетичної обчислювальної моделі, що демонструє залежність генерації активних форм кисню (АФК) комплексами I і III дихального ланцюга мітохондрій (МХ) від величини мітохондріального потенціалу, рН матриксу, наявності різних дихальних субстратів та інгібіторів, а також даних, отриманих експериментально, запропоновані основні механізми впливу наночастинок (НЧ) на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ) на біоенергетичні процеси в МХ. Розглянуто такі показники, як мітохондріальний потенціал, процеси дихання та окислювального фосфорилування, рівень АТФ в МХ після дії частинок, а також здатність НЧ впливати на генерацію АФК в дихальному ланцюгу МХ. Запропоновано два основні механізми впливу редоксактивних НЧ на основі РЗЕ на редокс-процеси в МХ: перший механізм передбачає інгібування транспорту електронів і активацію утворення супероксиду та пероксиду водню, другий – інтеграцію НЧ в електрон-транспортні процеси в МХ у якості донорів або акцепторів електронів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: редоксактивні наночастинки, мітохондрії, активні форми кисню.

О МЕХАНИЗМАХ ВЛИЯНИЯ РЕДОКСАКТИВНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА РЕДОКС-ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ

К.А. Аверченко*, Н.С. Кавок, С.Л. Ефимова

Институт сцинтиляционных материалов НАН Украины, пр. Науки 60, Харьков, 61001, Украина

С помощью кинетической вычислительной модели, которая демонстрирует зависимость генерации активных форм кислорода (АФК) комплексами I и III дыхательной цепи митохондрий (МХ) от величины митохондриального потенциала, рН матрикса, наличия различных дыхательных субстратов и ингибиторов, а также данных, полученных экспериментально, предложены основные механизмы воздействия наночастиц (НЧ) на основе редкоземельных элементов (РЗЭ) на биоэнергетические процессы в МХ. Рассмотрены такие показатели, как митохондриальный потенциал, процессы дыхания и окислительного фосфорилирования, уровень АТФ в МХ после воздействия частиц, а также способность НЧ влиять на генерацию АФК в дыхательной цепи МХ. Предложены два основных механизма влияния редоксактивных НЧ на основе РЗЭ на редокс-процессы в МХ: первый механизм предполагает ингибирование транспорта электронов и активацию образования супероксидов и пероксида водорода, второй – интеграцию НЧ в электрон-транспортные процессы в МХ в качестве доноров или акцепторов электронов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: редоксактивные наночастицы, митохондрии, активные формы кислорода.

CONCERNING THE MECHANISMS OF INFLUENCE OF REDOX-ACTIVE NANOPARTICLES BASED ON RARE-EARTH ELEMENTS ON THE REDOX-PROCESSES IN MITOCHONDRIA

K.A. Averchenko¹, N.S. Kavok, S.L. Yefimova

Institute for Scintillation Materials National Academy of Sciences of Ukraine, 60 Nauky Ave., Kharkiv, 61001, Ukraine

Using the kinetic computation model, which demonstrates the dependence of generation of reactive oxygen species (ROS) by complexes I and III of mitochondrion respiration chain on the values of mitochondrial potential, pH of matrix, presence of different respiratory substrates and inhibitors, and data obtained experimentally, the basic mechanisms of the influence of nanoparticles (NPs) on the basis of rare earth elements on the bioenergetic processes in the mitochondria have been proposed. The mitochondrial potential, the processes of respiration and oxidative phosphorylation, as well as the ability

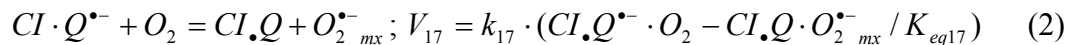
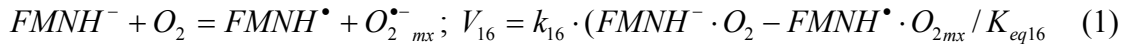
of NPs to have an influence on the generation of ROS in the respiratory chain of mitochondria have been investigated. We propose two main mechanisms of the influence of the redox-active NPs based on the rare earth elements on the redox-processes in the mitochondria: the first mechanism involves the inhibition of electron transport and activation of the formation of superoxide and hydrogen peroxide, the second - integration of NPs into the electron-transport processes in the mitochondria as donors or acceptors of electrons

KEY WORDS: redox-active nanoparticles, mitochondria, reactive oxygen species.

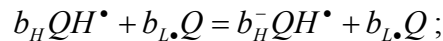
Деякі останні десятиріч супроводжуються підвищеним інтересом до нанотехнологій та наноматеріалів (НМ). В багатьох дослідженнях НМ розглядаються як потенційні лікарські засоби. Значна увага приділяється редоксактивним наночастинкам (НЧ) з антиоксидантними властивостями, які здатні до саморегенерації, у зв'язку з тим, що оксидативний стрес грає ключову роль у виникненні патологій та старінні організму. Одним з яскравих прикладів таких НЧ є діоксид церію, який у нанокристалічному стані характеризується суттєвою кисневою нестехіометрією і має велику концентрацію Ce^{3+} іонів, в тому числі і на поверхні частинки. Доступність Ce^{3+} іонів для активних форм кисню (АФК), здатність змінювати валентність (3^+ або 4^+), а також наявність великої кількості кисневих вакансій визначає редоксактивність та унікальні антиоксидантні властивості церія. Перспективними для антиоксидантної терапії також вважаються інші типи редоксактивних НЧ на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ). Завдяки наявності в кристалічній решітці іонів зі змінною валентністю, активовані європієм НЧ на основі ортованадатів РЗЕ, так само є редоксактивними і можуть залучатися до різних окислювально-відновних процесів та впливати на рівень АФК. В живих клітинах головним джерелом і мішенню для АФК є мітохондрії (МХ) [1]. Основними рисами оксидативного пошкодження із залученням мітохондріальної ланки є мітохондріальна недостатність внаслідок відкриття мітохондріальної пори, деполаризація мембрани МХ, гальмування синтезу АТФ, окислення відновленого глутатіону (GSH) та тіолових груп білків. Канцерогенез, нейродегенеративні та кардіоваскулярні захворювання, діабет асоціюються з порушенням мітохондріальної функції та підвищенням концентрації АФК. Питання щодо впливу редоксактивних НЧ на процеси генерації АФК та біоенергетичну функцію МХ нерозривно пов'язані між собою. Тому побудова адекватної фізичної моделі, яка описує вплив редоксактивних НЧ на процеси переносу електронів в мітохондріальному дихальному ланцюзі та генерацію АФК є актуальною задачею у фундаментальному і прикладному сенсі.

Дихальний ланцюг внутрішньої мембрани МХ є унікальною сукупністю білкових комплексів, які переносять електрони на молекулярний кисень, щоб сформувати протон-рушійну силу в якості основного джерела енергії для клітинного синтезу АТФ. Електрон-транспортний ланцюг (ЕТЛ) на внутрішній мембрані МХ є основним джерелом АФК. Так, наприклад, комплекси I і III ЕТЛ є основними джерелами супероксиду ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [2]. При цьому необхідно враховувати, що значення мітохондріального потенціалу, рН середовища, наявність або відсутність інгібіторів, які здатні порушувати функціонування комплексів, важливі для отримання достовірних даних. Так само одним з невирішених питань є генерація АФК при інгібуванні різних сегментів дихального ланцюга. З урахуванням застосування НМ і редоксактивних НЧ зокрема, це питання потребує вирішення. Оскільки тільки експериментальних даних для опису такої складної системи, як дихальний ланцюг, недостатньо, для дослідження всіх біоенергетичних процесів в МХ успішно застосовуються математичні комп'ютерні моделі, які описують теоретичні і експериментальні дані. Існують класичні моделі [3,4], які описують процеси, що відбуваються в дихальному ланцюзі МХ, і стандартні кінетичні моделі для опису найбільш важливих шляхів перенесення електронів в

комплексах I і III [5-11]. Так, наприклад, автори [12,13] експериментально показали, що при інгібуванні комплексу III антимиціном А (АА) основний внесок в генерацію $O_2^{\bullet-}$ належить Q_0 -сайту через перенесення електронів від окисленого цитохрому b_L до Q і зворотних реакцій в Q_0 -сайті. Автори [14] для ізольованого комплексу I припустили, що $O_2^{\bullet-}$ формується при перенесенні одного електрона від повністю окисленого флавіну на кисень згідно реакціям (1), (2) [5].



Кінетична схема, запропонована авторами [15, 16] описує етапи перенесення електронів в комплексі III. Також існує гіпотеза [17], що характеризує формування $O_2^{\bullet-}$ та перенос електронів в комплексі III дещо інакше. Автори [5] проаналізували і врахували раніше впроваджені моделі і запропонували свою обчислювальну модель, що одержала експериментальне підтвердження. Дана модель демонструє залежність генерації АФК комплексами I і III дихального ланцюга МХ від мітохондріального потенціалу, рН матриксу, наявності різних дихальних субстратів, а так само інгібітора АА. Можна припустити, що НЧ, інтеркалюючи в дихальний ланцюг і порушуючи перенесення електронів (за рахунок редоксактивності), або блокуючи взаємодію і роботу переносників, тобто виступаючи в ролі інгібіторів, подібно АА, який є інгібітором Q_i -сайту комплексу III в експериментальних [18] і модельних дослідженнях [6], можуть підсилювати генерацію АФК. За допомогою реакції (3) [5] також можна описати вплив НЧ на генерацію вільних радикалів, зокрема, супероксида, в комплексі III.



$$V_{34} = k_{34} \cdot (b_H \cdot QH^{\bullet} \cdot b_L^- \cdot Q - b_H^- \cdot QH^{\bullet} \cdot b_L \cdot Q \cdot \exp(F \cdot \delta_2 \cdot \Delta\Psi / R \cdot T) / K_{eq34}) \quad (3)$$

Інгібуючий ефект НЧ відповідно до даної реакції моделі [5] може бути результатом порушення перенесення електронів у всіх реакціях в Q_i -сайті. Інгібування Q_i -сайту НЧ може бути результатом пригнічення реакцій з перенесенням електронів в Q_0 -сайті в результаті порушення Q -циклу.

Супероксиддисмутіза-подібна активність НЧ, показана раніше в дослідженнях [19], вписується в рамки моделі [5], оскільки утворення перекису водню в реакціях за участю НЧ може служити причиною порушення роботи дихальних комплексів і зсуву в роботі тіолових антиоксидантів. Модель [5] демонструє за допомогою отриманих раніше даних [6,20], що утворення АФК в дихальному ланцюзі МХ дуже чутливе до флуктуацій мітохондріального потенціалу у випадках, коли субстратом дихання є сукцинат або NADH-пов'язані субстрати. Запропонована модель пов'язує зміни потенціалу МХ, синтезу АТФ, і безпосередньо генерацію АФК – процеси, динаміка яких залежить від безлічі електрокінетичних транспортних систем на внутрішній мембрані МХ як в нормальних умовах, так і за умов дії інгібіторів.

Тож сумісне використання в даній роботі адекватної обчислювальної моделі і власних даних, отриманих експериментально, дозволяє побудувати та розглянути основні механізми впливу редоксактивних НЧ на основі РЗЕ з різними розмірами та формою на біоенергетичні процеси в МХ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Водні колоїдні розчини наночастинок. В дослідженнях використані НЧ на основі РЗЕ з різними розмірами та формою: сферичні ($GdYVO_4:Eu^{3+}$ (1-2 нм)), веретеноподібні ($GdVO_4:Eu^{3+}$ (25×8 нм), усереднений розмір – 13 нм) и стрижнеподібні ($LaVO_4:Eu^{3+}$

(57×6-8 нм)) і сферичні НЧ CeO_{2-x} (з розмірами 1-2 нм і 8-10 нм). Синтез водних колоїдних розчинів НЧ виконано згідно з [19,21]. Були отримані прозорі безбарвні розчини НЧ з концентрацією твердої фази кожного типу – 1г/л. Розміри і морфологію НЧ оцінювали за допомогою просвічуючої електронної мікроскопії на електронному мікроскопі ПЕМ 125 К (Selmi, Україна), прискорюючи напруга – 100 кВ. Стандартне відхилення не перевищує $\pm 10\%$ від середнього розміру частинки. Склад сферичних НЧ був $\text{Gd}_{(0,6-0,8)}\text{Y}_{(0,1-0,3)}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$, веретеноподібних – $\text{Gd}_{(0,9)}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$ та стрижнеподібних – $\text{La}_{(0,9)}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$.

Препаративні методи. У роботі використовували гепатоцити і МХ, ізольовані з печінки щурів-самців з масою тіла 180-200 г. лінії Вістар, згідно методам, описаним раніше [22-24]. Всі маніпуляції з тваринами проходили під поверхневим ефірним наркозом. Експерименти проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей».

Флуоресцентний аналіз клітин було виконано за допомогою JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboxyanine iodide), як описано в [25,26]. Клітини (з концентрацією 5×10^5 кліт/мл) інкубувались з JC-1 (10^{-6} М) в середовищі ІГЛА з 10% ембріональною бичачою сироваткою, рН 7,4, при кімнатній температурі протягом 1,5 год. для досягнення урівноваження барвника в системі, після чого проводили наступні дії: 1) дослідження механізмів проникнення НЧ в клітини: спільна експозиція НЧ (концентрація вихідного розчину – 1 г/л) з інгібіторами ендоцитозу – нокодазолом (10 мкМ) і цитохалазіном D (10 мкМ); 2) експозиція з НЧ: 50 мкл вихідного розчину НЧ (1 г/л) додавали в кожну кювету, і клітини інкубувались з частинками протягом 24 год. Кінцева концентрація НЧ в зразках становила 0,05 г/л; 3) експозиція з 2 мМ GSH для оцінки його протекторного впливу: GSH вносили на 1 год. перед додаванням НЧ. Спостереження за змінами мітохондріального потенціалу проводили, як описано в [25].

Визначення рівня АТФ. Після впливу НЧ (інкубація з частинками протягом 25 хвил. при 25°C) на ізольовані МХ рівень АТФ визначали в реакційному середовищі наступного складу: 100 мМ трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА, 2 мМ MgCl_2 , 4 мМ NADP натрієва соль за допомогою екзогенних гексогенази – 5 од/мл (+0,02% БСА або 72 мг/мл глюкоза) і глюкозо-6-фосфату (від 0,35 до 25 од/мл) по методу [27], описаному в [28]. Результати виражали у відсотках, за 100% (контроль) прийнято показники (інтенсивність флуоресценції, рівень АТФ) в системі без НЧ.

Результати виражені як середнє значення \pm стандартна похибка середнього з 4-5 незалежних експериментів. Результати статистично оброблені за допомогою програмного забезпечення Statistika v. 5.0 (StatSoft, США) і Origin 6.1 (Origin Lab Corporation, США), використовуючи t-критерій Стьюдента. Отримані результати статистично значимо відрізняються при $p < 0,05$.

Обчислювальна модель Маркевича та Хоека. Для аналізу даних та інтерпретації отриманих результатів ми використовували кінетичну схему переносу електронів і утворення супероксиду, запропоновану авторами Маркевичем і Хоеком [5]. Дана схема описує основні шляхи перенесення електронів в ЕТЛ і в головних центрах утворення АФК – комплексах I і III і лежить в основі обчислювальної моделі для мітохондріального дихального ланцюга. Дана кінетична схема включає в себе наступні переносники електронів:

- 1) Для комплексу I: флавін мононуклеотид (ФМН), послідовність залізо-сірчаних кластерів, починаючи з N3 і N1A і закінчуються N2 кластером, і коензим Q.
- 2) Для комплексу III: коензим Q, цитохроми b_L , b , b_H , c_1 .

Комплекси II і IV в даній моделі не розглядаються як прямі джерела АФК.

Кінетична схема перенесення електронів і утворення супероксида в дихальному ланцюзі МХ та повна схема реакцій, що описують перенос електронів і утворення супероксида відповідно до кінетичної схеми містить 40 реакцій, які наведені в [5]. За аналогією з даною моделлю, де застосовано АА, який є широко використовуваним інгібітором Q_i сайту в комплексі III в експериментальних і обчислювальних дослідженнях генерації АФК в дихальному ланцюгу МХ, запропоновані механізми дії НЧ на дихальний ланцюг МХ.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

В наших попередніх дослідженнях ми показали, що вплив НЧ на основі РЗЕ на інтенсивність генерації вільних радикалів в модельних біосистемах має свої особливості: прооксидантні та антиоксидантні ефекти НЧ залежать і від їх фізико-хімічних характеристик, і від мікрооточення; у біосистемах, що містять МХ, ми спостерігали зміну антиоксидантних ефектів НЧ на прооксидантні; з'ясували, що найбільш виражені прооксидантні властивості притаманні малим НЧ, а також отримали дані про те, що GSH грає ключову роль в регуляції інтенсивності генерації вільних радикалів у присутності НЧ [24, 28-30].

На сьогоднішній день механізми проникнення НЧ в клітини є предметом широкої дискусії. З використанням зонда JC-1, спостерігаючи за змінами трансмембранного потенціалу МХ, і використовуючи нокодазол і цитохолазін D – сполуки, які блокують ендоцитоз, ми встановили, що малі сферичні ортованадатні НЧ здатні безпосередньо проникати в клітини без участі механізмів ендоцитозу і пригнічувати функцію МХ (спостерігається зниження флуоресценції агрегатів зонда під впливом НЧ в порівнянні з контролем) (рис. 1).

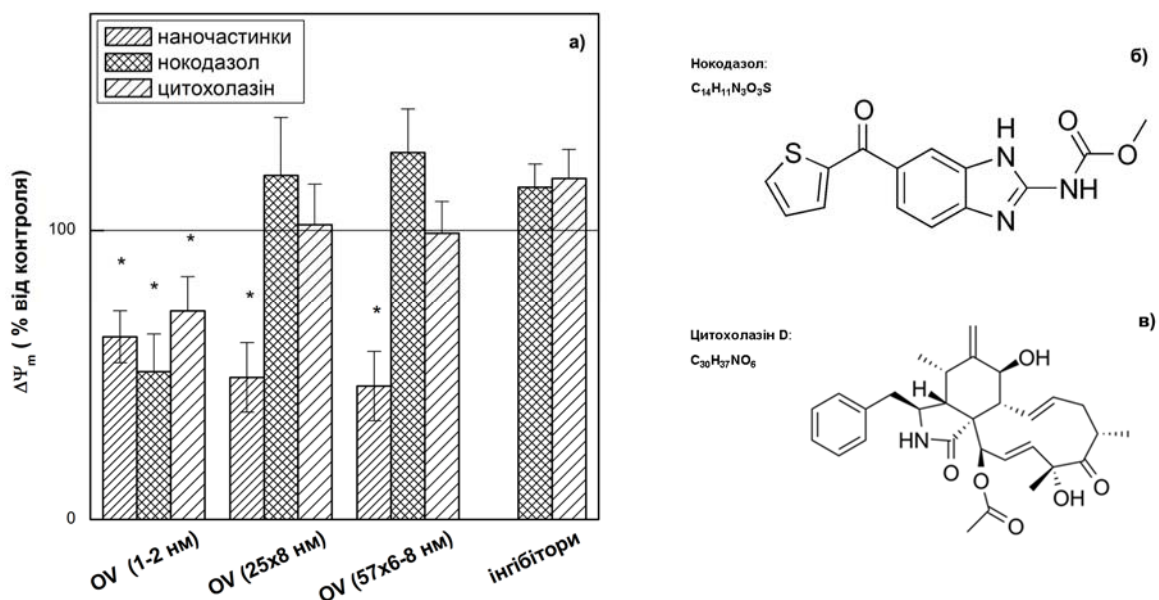


Рис. 1. а) оцінка механізмів проникнення НЧ різних розмірів в клітини: зміни мітохондріального потенціалу ($\Delta\Psi_m$) при пригніченні ендоцитозу інгібіторами (нокодазол, $C=10$ мкМ, цитохолазін D, $C=10$ мкМ) під впливом НЧ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем); структурні формули інгібіторів ендоцитозу – б) нокодазол, в) цитохолазін D.

Надходження інших ортованадатних НЧ з розмірами 25×8 і 57×6-8 нм відбувається за ендоцитозним механізмом (падіння мітохондріального потенціалу при дії НЧ і інгібіторів ендоцитозу не відбувається). При цьому самі інгібітори не чинили впливу на мітохондріальний потенціал (Рис. 1).

Відомо, що концентрація продуктів вільнорадикального пошкодження біомолекул в тканинах значною мірою визначається швидкістю генерації АФК мембранозв'язаними і розчинними ферментними системами. При цьому вважається, що основна кількість АФК утворюється в редокс-ланцюгах МХ [31]. Згідно з даними [32], швидкість генерації $O_2^{\bullet-}$, яка відбувається при випадкових збоях в роботі ЕТЛ, прямо пропорційна швидкості споживання кисню при диханні: $I = q \times V$, где q – коефіцієнт пропорциональності. Теоретично, при надійній роботі дихального ланцюга МХ, q може наблизитися до нуля, але практично будь-яка причина, що порушує нормальні умови її роботи (часткова або повна гіпоксія, стан забезпеченості субстратами дихання, температура, дія ксенобіотиків, НЧ та ін.), значно збільшує цей коефіцієнт, і, як наслідок, призводить до зростання потоку $O_2^{\bullet-}$ в МХ і в клітині в цілому. Дослідження впливу НЧ на рівень АТФ в ізольованих МХ показали, що при дії всіх типів НЧ ортованадатів і малих частинок SeO_{2-x} рівень АТФ в МХ знижений, причому найбільше це зниження виражено у разі малих сферичних частинок – ортованадатів і SeO_{2-x} (Таблиця 1).

Таблиця 1

Рівень АТФ в МХ після інкубації з НЧ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем)

	Концентрація АТФ, % від контролю
OV (1-2 нм)	38,94±4,4*
OV (25×8 нм)	82,24±1,5*
OV (57×6-8 нм)	79,44±1,5*
SeO_{2-x} (1-2 нм)	45,79±8*
SeO_{2-x} (8-10 нм)	84,27±12,7

Спостережувані ефекти можуть бути пов'язані з редоксактивністю НЧ і їх здатністю безпосередньо втручатися в електрон-транспортні процеси в якості донорів або акцепторів вільних радикалів. Подібність іонів фосфату і ванадату може бути причиною порушення синтезу АТФ [33]. Крім того, АТФ може витрачатися для підтримки мітохондріального потенціала. Подальше дослідження мітохондріального потенціалу показало, що при впливі всіх досліджуваних НЧ, крім SeO_{2-x} розміром 8-10 нм, відбувається падіння потенціалу (таблиця 2).

Отримані дані свідчать про те, що ресурсів ендогенної системи захисту недостатньо для запобігання мітохондріальній дисфункції, яку викликають НЧ. Однак НЧ можуть впливати на МХ не тільки через утворення АФК, а й безпосередньо взаємодіяти з мітохондріальними структурами, що характерно, зокрема, для малих НЧ [34]. Використання GSH нейтралізує негативні наслідки впливу НЧ на МХ (таблиця 2). GSH є одним з основних компонентів тіолової буферної окислювально-відновної системи в клітині. Виснаження пулу відновленого глутатіону і зміна співвідношення відновленого/окисленого глутатіону можуть бути опосередковані ферментативними процесами детоксикації НЧ [35].

Таблиця 2

Захисний вплив глутатіону (2 мМ) на мітохондріальний потенціал гепатоцитів щурів на тлі дії НЧ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем)

	Мітохондріальний потенціал, % від контролю
OV (1-2 нм)	63±9*
OV (25×8 нм)	49±12*
OV (57×6-8 нм)	46±12*
CeO _{2-x} (1-2 нм)	75±5*
CeO _{2-x} (8-10 нм)	98±15
GSH+OV (1-2 нм)	95±7
GSH+OV (25×8 нм)	101±8
GSH+OV (57×6-8 нм)	105±6

GSH здатний проникати в клітини в незмінному вигляді і таким чином захищати не тільки позаклітинні, але і внутрішньоклітинні структури. Таким чином, показано, що досліджувані НЧ ортованадатів РЗЕ та малі НЧ діоксиду церія (1-2 нм) викликають падіння потенціалу МХ, рівня АТФ в МХ, і викликають додаткову генерацію АФК. В наших експериментах тільки НЧ діоксиду церію розміром 8-10 нм, не мають негативного впливу на жоден з досліджених показників і стабільно демонструють антиоксидантні властивості.

Отримані дані служать підтвердженням наших попередніх досліджень. Використання моделі [5], що описує процеси перенесення електронів в комплексах I і III, збільшення генерації супероксидного радикала при пригніченні цих комплексів інгібіторами, враховує зміни рН і мітохондріального потенціалу в генерації АФК, надає можливість запропонувати механізми дії редоксактивних НЧ на біоенергетичні процеси в МХ.

Перший механізм – інгібування транспорту електронів НЧ.

Вбудова НЧ в мембрани, безпосередня взаємодія з переносниками електронів може приводити до пригнічення транспорту електронів і активації утворення супероксида і перекису водню. Молекулярний механізм даного процесу можна пояснити за допомогою ряду реакцій [5], що описують перенесення електронів від повністю відновленого флавіна на кисень (реакція 1) з утворенням супероксида, так само передбачається, що семіхінон в комплексі з *CI.Q* (реакція 2) є джерелом генерації супероксиду в комплексі I. За аналогією з даною моделлю швидкість генерації супероксиду під впливом НЧ насамперед може бути пов'язана зі зміною констант і швидкості даних реакцій (1), (2).

Експериментальні та розрахункові результати моделювання показують, що зворотні реакції в Q_i сайті можуть відігравати важливу роль у формуванні АФК при інгібуванні комплексу III AA (реакція 3). Дана реакція обчислювальної моделі [5] передбачає, що AA повністю пригнічує перенесення електронів від цитохрому *b_L* до *b_H*, тобто в даному випадку константа $v_{34}=0$. Необхідно відзначити, що умови, при яких $v_{34}=0$, по суті є результатом пригнічення реакцій перенесення електронів від семіхінонів до цитохрому *b_L*, і від цитохрома *b_L* к *b_H* в Q₀ сайті. Інгібування Q_i сайту так само може бути результатом порушення перенесення електронів в Q₀ сайті в результаті

порушення Q-циклу. Такий же механізм можливий і при дії НЧ, що підтверджується результатами наших досліджень про пригнічення ФАД-залежного дихання ізольованих МХ в присутності малих ортованадатних НЧ (дані не представлені).

За допомогою розрахунків автори [5] продемонстрували, що зростання загальної кількості АФК залежить від величини мітохондріального потенціалу при інгібуванні Q_1 сайту АА при окисленні NADH і сукцинату. Це відбувається через значне збільшення продукції $O_2^{\bullet -}$ окисленим флавінмононуклеотидом в комплексі I при інгібуванні комплексу III, і так само може бути одним з механізмів впливу НЧ на процеси в МХ.

Другий механізм – інтеграція НЧ в електрон-транспортні процеси в якості донорів або акцепторів електронів.

НЧ діоксиду церію відповідно до редокс-потенціалу пари $Ce^{4+}/Ce^{3+} = +1440$ мВ здатні перехоплювати електрони з дихального ланцюга і переносити їх на гідроксильний радикал з його нейтралізацією ($OH^{\bullet}/HO^- = +1900$ мВ). Однак виведення електронів з дихального циклу впливає на ефективність фосфорилування. Для НЧ ортованадатів виведення електронів з дихального циклу менш ймовірно, оскільки значення редокс-потенціалу допуючої пари Eu^{3+}/Eu^{2+} нижче значень для переносників дихального ланцюга МХ. Але нейтралізація гідроксильного радикала також можлива, що підтверджується результатами аналізу в безклітинній системі [24].

Під впливом ортованадатних НЧ також можливе утворення супероксиду в МХ без пригнічення дихального ланцюга за механізмом редокс-ціклінга, з переносом електрона на кисень відповідно до значень редокс потенціалів пари $O_2/O_2^{\bullet -} = -137$ мВ і допуючого іона $Eu^{3+}/Eu^{2+} = -350$ мВ.

Схематичне зображення можливих шляхів генерації/нейтралізації АФК в дихальному ланцюзі МХ представлено на рисунку 2.

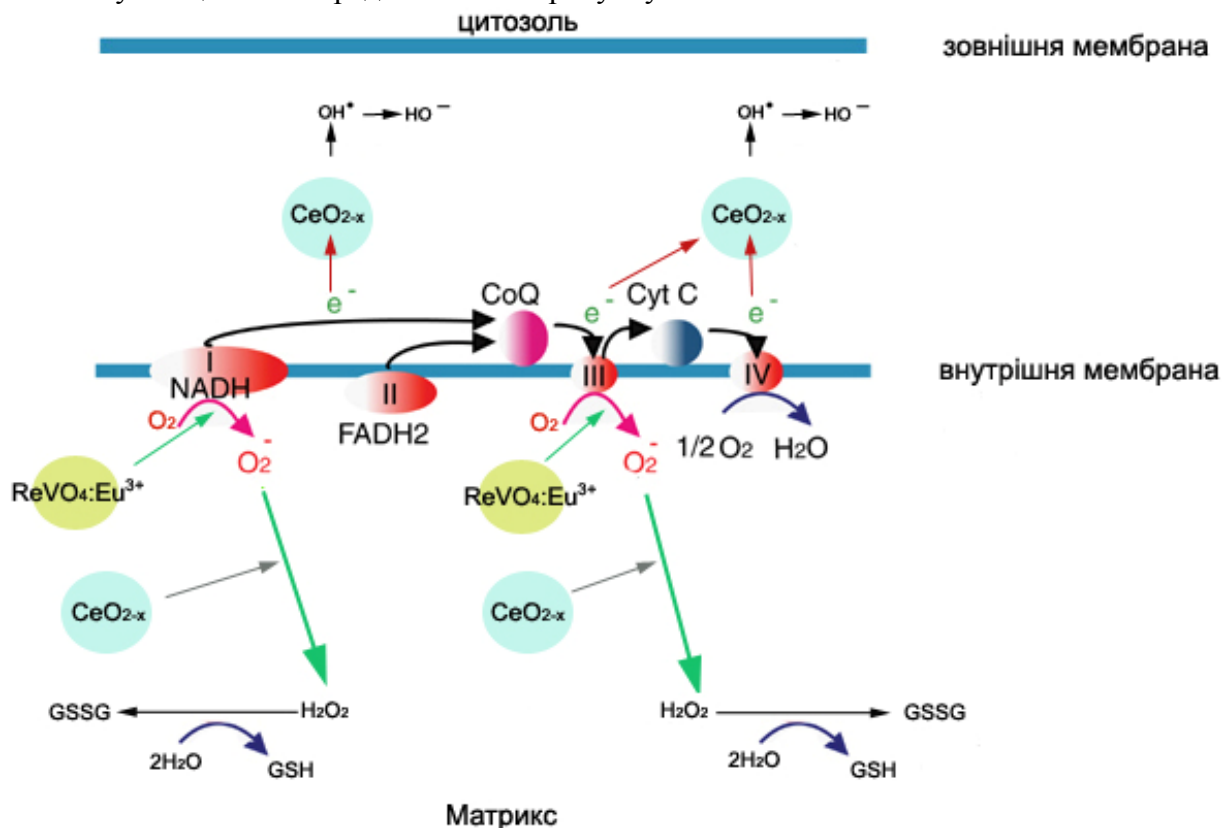


Рис. 2. Імовірна модель механізмів дії НЧ на біоенергетичні процеси в МХ.

Ще одним імовірним механізмом пригнічення МХ процесів НЧ є те, що малі частинки схильні до агрегації при накопиченні у внутрішньоклітинних структурах. Тому в разі малих НЧ може відбуватися механічне пошкодження мембран через безпосереднє проникнення в МХ.

Пояснюючи молекулярний механізм дії НЧ на біоенергетичні процеси в МХ шурів різного віку, згідно з авторами [36], які за допомогою модельних розрахунків і експериментально показали, що вихід перекису водню з МХ і ступінь генерації АФК при диханні залежить від активності глутатіон/тіоредоксін – захисної системи, також можна припустити, що утворення перекису водню в МХ в присутності НЧ може безпосередньо відбуватися в ферментних комплексах дихального ланцюга, а також за рахунок дисмутації вже утвореного супероксиду завдяки власній супероксиддисмутаза-подібної активності НЧ діоксиду церію. Дані процеси призводять до підвищеного витрачання GSH. Це підтверджується тим, що експериментально ми спостерігаємо захисну дію GSH, який необхідний для роботи ферментів, відповідальних за утилізацію перекису водню. Також треба враховувати, що помірною генерацією АФК здатна запускати внутрішньоклітинні антиоксидантні системи, що і є одним з базових механізмів захисту клітин від оксидативного стресу. На рівні клітин і організму ефект НЧ може проявлятися не як пряма антирадикальна дія, а як активація внутрішньоклітинних сигнальних процесів для відновлення окислювального балансу, але ці припущення потребують подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

Таким чином, експериментально доведено, що малі НЧ ортованадатів та діоксиду церію проникають в клітини за механізмом адсорбції-дифузії, на відміну від великих НЧ, для яких основним шляхом є ендоцитоз. Показано, що здатність НЧ впливати на інтенсивність генерації радикалів корелює з їх здатністю порушувати мітохондріальний потенціал, процеси дихання і окисного фосфорилування, що свідчить про те, що біоенергетичними процеси в МХ є мішенню для редоксактивних НЧ. На основі кінетичної моделі Маркевича та Хоека запропоновано два основні механізми впливу НЧ ортованадатів РЗЕ та діоксиду церію на редокс-процеси в МХ. Перший механізм пов'язаний з інгібуванням транспорту електронів і активацією утворення супероксиду та пероксиду водню, другий – з інтеграцією НЧ в електрон-транспортні процеси в МХ у якості донорів або акцепторів електронів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aluminium oxide nanoparticles induce mitochondrial-mediated oxidative stress and alter the expression of antioxidant enzymes in human mesenchymal stem cells / A. A. Alshatwi, P. V. Subbarayan, E. Ramesh [et al.] // *Food Addit. Contam. Part A: Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* – 2013. – V. 30, № 1. – P. 1-10.
2. Superoxide production by cytochrome bc1 complex: a mathematical model / F. Guillaud, S. Dröse, A. Kowald [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – V. 1837, № 10. – P. 1643-52.
3. Bistability of mitochondrial respiration underlies paradoxical reactive oxygen species generation induced by anoxia / V.A. Selivanov, T.V. Votyakova, J.A. Zeak [et al.] // *PLoS Comput. Biol.* – 2009. – V. 5: e1000619
4. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain // V.A. Selivanov, T.V. Votyakova, V.N. Pivtoraiko [et al.] // *PLoS Comput. Biol.* – 2011. – V. 7: e1001115.
5. Markevich N.I. Computational modeling analysis of mitochondrial superoxide production under varying substrate conditions and upon inhibition of different segments of the electron transport chain / N.I. Markevich, J.B. Hoek // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2015. – V. 1847. – P. 656–679.
6. A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain / O.V. Demin, B.N. Kholodenko, V.P. Skulachev // *Mol. Cell. Biochem.* – 1998. – V. 184. – P. 21–33.

7. Orii Y. Oxidation process of bovine heart ubiquinol-cytochrome c reductase studied by stopped-flow rapid-scan spectrophotometry and simulations based on the mechanistic Q cycle model / Y. Orii, T. Miki // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 17594–17604
8. A computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria / L.D. Gauthier, J.L. Greenstein, S. Cortassa [et al.] // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105. – P. 1045–1056.
9. Analysis of the kinetics and bistability of ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase / J.N. Bazil, K.C. Vinnakota, F. Wu [et al.] // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105. – P. 343–355.
10. Korzeniewski B. A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle / B. Korzeniewski, J.A. Zoladz // *Biophys. Chem.* – 2001. – V. 92. – P. 17–34.
11. Beard D.A. A biophysical model of the mitochondrial respiratory system and oxidative phosphorylation / D.A. Beard // *PLoS Comput. Biol.* – 2005. – V. 1: e36.
12. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle / C.L. Quinlan, A.A. Gerencser, J.R. Treberg [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – P. 31361–31372.
13. Drose S. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc₁ complex / S. Drose, U. Brandt // *J. Biol. Chem.* – 2008. V. 283. – P. 21649–21654.
14. Kussmaul L. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria / L. Kussmaul, J. Hirst // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – V. 103. – P. 7607–7612.
15. Proton pumping in the bc₁ complex: a new gating mechanism that prevents short circuits / A.R. Crofts, S. Lhee, S.B. Crofts [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1757 (8). – P. 1019–1034.
16. The mechanism of ubihydroquinone oxidation at the Q_o-site of the cytochrome bc₁ complex / A.R. Crofts, S. Hong, C. Wilson, [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1827. – P. 1362–1377.
17. Domain conformational switch of the iron-sulfur protein in cytochrome bc₁ complex is induced by the electron transfer from cytochrome b_L to b_H / C.A. Yu, X. Cen, H.W. Ma [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1777. – P. 1038–1043.
18. Cadenas E. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria / E. Cadenas, A. Boveris // *Biochem. J.* – 1980. – V. 188. – P. 31–37.
19. The influence of agglomeration of nanoparticles on their superoxide dismutase-mimetic activity / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects.* – 2012. – V. 409 – P. 176 – 182.
20. Lambert A.J. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane / A.J. Lambert, M.D. Brand // *Biochem. J.* – 2004. – V. 382. – P. 511–517
21. Характеристики зольей nReVO₄:Eu³⁺ (Re = La, Gd, Y, Sm) с наночастицами разной формы и размеров. В.К. Клочков, А.В. Григорова, О.О. Седых [и др.] // *ЖПС.* – 2012. – 79(5). – С. 738-742. / *Harakteristiki zolej nReVO₄:Eu³⁺ (Re = La, Gd, Y, Sm) s nanochasticami raznoj formy i razmerov.* V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh, [i dr.] // *ZhPS.* – 2012. – 79(5). – S. 738-742.
22. Kamatch S.A. Interaction of Ca²⁺ with endoplasmic reticulum of rat liver: a standart procedure for the isolation of microsomes / S.A. Kamatch, K.A. Narayan // *Anal. Biochem.* – 1972. – V. 48, № 1. – P. 53 – 61.
23. Возрастные перестройки структурно-функционального состояния мембранных редокс-систем: автореф. дис. на соиск. уч. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.02 «Биофизика» / В. В. Лемешко. – Минск, 1983. – 36 с. / *Vozrastnye perestrojki strukturno-funkcional'nogo sostojanija membrannyh redoks-sistem: avtoref. dis. na soisk. uch. stepeni dokt. biol. nauk: spec. 03.00.02 «Biofizika»* / V. V. Lemeshko. – Minsk, 1983. – 36 s.
24. Хемилюминесцентная диагностика свободнорадикальных процессов в абiotической системе и в клетках печени в присутствии наночастиц на основе редкоземельных элементов nReVO₄:Eu³⁺ (Re = Gd, Y, La) и CeO₂ / Е.А. Аверченко, Н.С.Кавок, В.К. Клочков [и др.] // *Журнал прикладной спектроскопии.* – 2014. Вып. 81 (5). – С. 754-760. / *Hemiljuminiscentnaja diagnostika svobodnoradikal'nyh processov v abioticheskoj sisteme i v kletkah pecheni v prisutstvii nanochastic na osnove redkozemel'nyh jelementov nReVO₄:Eu³⁺ (Re = Gd, Y, La) i CeO₂* / Е.А. Averchenko, N.S.Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // *Zhurnal prikladnoj spektroskopii.* – 2014. V. 81 (5). – S. 754-760.
25. Mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) changes in single rat hepatocytes: The effect of orthovanadate nanoparticles doped with rare-earth elements / N.S. Kavok, K.A. Averchenko, V.K. Klochkov, [et al.] // *European Physical Journal: E Soft Matter and Biological Physics.* – 2014. – V. 37 (12). – P. 127.
26. The energy-state of the hepatocytes of satiated rats, isolated with the use of EDTA and vibratory / A.Yu. Petrenko, V.P. Grishuk, A.N. Sukach [et al.] // *Biochemistry (Moscow).* – 1989. – V. 54, № 12. – P. 1952-1955.
27. Lamprecht W. Adenosine-5'-triphosphate, determination with hexokinase and glucose 6-phosphatedehydrogenase / W. Lamprecht, I. Trautshold // *Methods of enzymatic analysis* / Bergmyer H.U. (ed.) - New York: Acad. Press., 1965. – P. 543-551.

28. Методы биохимических исследований / [под ред. М.И. Прохоровой]. – Л.: ЛГУ, 1982. – 272 с. /Metody biohimicheskikh issledovanij / [pod red. M.I. Prohorovoj]. – L.: LGU, 1982. – 272 s.
29. Effect of inorganic nanoparticles and organic complexes on their basis on free-radical processes in some model systems / K.A. Awerchenko, N.S. Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // Biopolimers and Cell. – 2015. – V. 31, № 2. – P. 138–145.
30. Pro-oxidant and antiradical properties of rare-earth based nanoparticles evaluated by chemiluminometry / K.A. Awerchenko N.S. Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // Book of Abstracts of XXI Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals”. – Beregove (Crimea), 2013. – P. 173-174.
31. Skulachev V. P. Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group / V. P. Skulachev // Aging Cell. – 2004. – V. 3, № 1. – P. 17–19.
32. Кольтовер В.К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк / В.К. Кольтовер // Успехи геронтол. – 2000. – Вып. 4. – С. 33 – 40. /Koltover V.K. Svobodnoradikalnaja teorija starenija: istorichskij ocherk / V.K. Koltover // Yspexi gerontol. – 2000. – V. 4. – P. 33-40.
33. Byczkowski J.Z. Interaction of vanadate with respiratory chain of rat liver and wheat seedling mitochondria / J.Z. Byczkowski, L. Zychlinski, J. Tluczkiwicz // Int. J.Biochem. – 1979. – V. 10. – P. 1007-1011.
34. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells / Y. Wang, W.G. Aker, H.M. Hwang [et al.] // Sci Total Environ. – 2011. – V. 409, № 22. – P. 4753-4762.
35. Абрамова Ж.И. Человек и противooksислительные вещества / Ж.И. Абрамова, Г.И. Оксенгендлер; ред. Н.В. Саватеев – Ленинград: Наука, 1985. – 230 с. / Abramova G.I. Chelovek i protivooksislitelnie vewestwa // Abramova J.I., G.I. Okcengendler; red. N.V. Savateev – Leningrad: Nayka, 1985. – 230 s.
36. Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: an experimental-computational study / M.A. Aon, B.A. Stanley, V. Sivakumaran [et al.] // J. Gen. Physiol. – 2012. – V. 139. – P. 479–491.