

ДЕЙСТВИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ЦИТОПЛАЗМЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ НА ТРАНСПОРТ ИОНОВ ФОСФАТА ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ МИТОХОНДРИЙ

Каримова Шаира Фатхуллаевна

доцент кафедры «Медицинской и биологической химии, медицинской биологии, общей генетики» Ташкентского педиатрического медицинского института, Ташкент, Республика Узбекистан

kshf53@mail.ru

Акбарходжаева Хуршида Нажмиддиновна

доцент кафедры «Медицинской и биологической химии, медицинской биологии, общей генетики» Ташкентского педиатрического медицинского института, Ташкент, Республика Узбекистан

hurshida71@mail.com

Икрамова Зульфия Адыловна

доцент кафедры «Медицинской и биологической химии, медицинской биологии, общей генетики» Ташкентского педиатрического медицинского института, Ташкент, Республика Узбекистан

zulfiyaxon_65@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Во внутренней мембране митохондрий печени крыс выявлены рН-зависимые каналы для анионов, функционирующие при щелочных рН [1-2]. При физиологических рН транспорт анионов через мембрану митохондрий печени крыс индуцируется термостабильным цитоплазматическим гликопептидом [3].

В интактной клетке функциональное состояние митохондрий контролируется цитоплазматическими регуляторами, действие которых, как правило, осуществляется в изменении активности переносчиков катионов и метаболитов во внутренней мембране митохондрий [1,4,5]. В тоже время, тиреоидные гормоны являются одним из основных эффекторов потребления кислорода в клетках-мишенях [2]. Можно предположить, что при гипертиреозе стимуляция потребления кислорода может быть обусловлена изменением активности цитоплазматических регуляторов метаболизма митохондрий.

Цель исследования. Оценить действие термостабильной фракции цитоплазмы печени крысы на транспорт ионов фосфата через мембрану митохондрий

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах белых крыс массой 100—120 г. Митохондрии выделяли из печени крыс по методу [6]. Среда выделения митохондрий: 0,3 М сахараза, 5 мМ трис-НСl, 1мМ, рН 7,5 ЭДТА. Окисление сукцината суспензией митохондрий измеряли полярографическим методом. Кинетику набухания митохондрий определяли по изменению оптической плотности при 540 нм на фотометре ЛМФ-69. Гипертиреоз вызывали введением крысам тироксина в дозе 100 мкг на 100 г массы в течение 5 дней. Последняя инъекция тироксина проводилась за 20 ч до забоя. Цитоплазму выделяли из печени и сердца сытых крыс центрифугированием гомогената (1 г/мл среды выделения, содержащей 0,12 М КI, 5 мМ трис-НСl, рН 7,65) в течение 20 мин при 30 000 g. Сразу после центрифугирования на холоде супернатант подвергали нагреванию при 97°C в течение 7 мин с последующим центрифугированием денатурированных белков и фрагментов мембран. Термостабильную фракцию цитоплазмы хранили в холодильнике при —10°C. В экспериментах с добавлением термостабильной фракции цитоплазмы к суспензии митохондрий в контрольном эксперименте добавляли 0,12 М КСl.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Преинкубация митохондрий печени крыс в течение 2 мин с термостабильной фракцией цитоплазмы печени крысы увеличивала скорость набухания митохондрий в изоосмотическом растворе фосфата калия в присутствии валиномицина (рис. 1). Известно, что в этих условиях валиномицин индуцирует высокую проницаемость внутренней мембраны митохондрий для K^+ и набухание митохондрий лимитируется скоростью транспорта аниона через мембрану митохондрий [5]. Следовательно, в наших экспериментах преинкубация митохондрий с термостабильной фракцией цитоплазмы увеличивала проницаемость внутренней мембраны для фосфата. Действие термостабильной фракции цитоплазмы печени крысы на транспорт ионов фосфата через мембрану митохондрий усиливалось при гипертиреозе (см. рис. 1). Сходный эффект был получен и в эксперименте с термостабильной фракцией цитоплазмы, выделенной из сердца контрольных и гипертиреоидных крыс (см. рис. 1). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что при гипертиреозе в печени и сердце крыс повышается активность термостабильного цитоплазматического фактора, увеличивающего проницаемость внутренней мембраны митохондрий для фосфата. Этим фактором не могут быть свободные жирные кислоты или иона кальция, так как добавление 1 мМ ЭДТА или бычьего

сывороточного альбумина (2 мг/мл) не ослабляло действия термостабильной фракции цитоплазмы на транспорт фосфата.

Добавление в среду инкубации N-этилмалеимида - ингибитора активности переносчика, осуществляющего Φ_n^-/OH^- обмен в мембране митохондрий, [3], не оказывало влияния на стимуляцию транспорта фосфата термостабильной фракцией цитоплазмы (рис. 2), хотя базальный транспорт фосфата ингибировался при добавлении N-этилмалеимида. Этот эксперимент позволил сделать вывод о том, что добавление термостабильной фракции цитоплазмы индуцирует транспорт фосфата по механизму, не связанному с повышением активности Φ_n^-/OH^- -антипортера в мембране митохондрий.

На рис. 2 представлены результаты эксперимента, которые показывают, что при добавлении термостабильной фракции цитоплазмы индуцируется электрогенный транспорт фосфата через мембрану митохондрий. Известно, что в условиях нашего эксперимента, когда валиномицин индуцирует электрогенный транспорт K^+ , набухание деэнергизованных митохондрий может происходить только в двух случаях: 1) если осуществляется электрогенный транспорт аниона; 2) если происходит Φ_n^-/OH^- обмен. Добавление 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) индуцирует H^+ (или OH^-) транспорт через мембрану. Так как в отсутствие 2,4-ДНФ снижение рН матрикса митохондрии лимитирует Φ_n^-/OH^- обмен [4], то в наших экспериментах в отсутствие 2, 4-ДНФ базальная скорость набухания митохондрий очень низка и сильно увеличивается при добавлении 2,4-ДНФ (см. рис. 2). Это связано с тем, что в митохондриях печени крысы без добавления термостабильной фракции цитоплазмы в основном происходит Φ_n^-/OH^- обмен [3] и практически не удается обнаружить электрогенного транспорта фосфата. Напротив, набухание митохондрий, индуцированное инкубацией с термостабильной фракцией цитоплазмы, происходит и в отсутствие 2,4-ДНФ в среде инкубации, причем эксперименты показали, что в этих условиях не увеличивается проницаемость внутренней мембраны для H^+ или OH^- . Следовательно, термостабильная фракция цитоплазмы индуцирует электрогенный транспорт фосфата через мембрану митохондрий.

Одним из следствий индукции электрогенного транспорта фосфата через мембрану митохондрий должно быть разобщение окислительного фосфорилирования, так как одновременное функционирование Φ_n^-/OH^- -антипортера и электрогенного транспорта фосфата в энергизованных митохондриях должно приводить к возникновению фосфатного цикла, шунтирующего $\Delta\mu, \text{H}^+$. Обнаружено, что при добавлении термостабильной фракции цитоплазмы действительно имеет место разобщение окислительного

фосфорилирования, причем, при гипертиреозе этот эффект термостабильной фракции цитоплазмы проявляется сильнее, чем в контроле (см. таблицу).

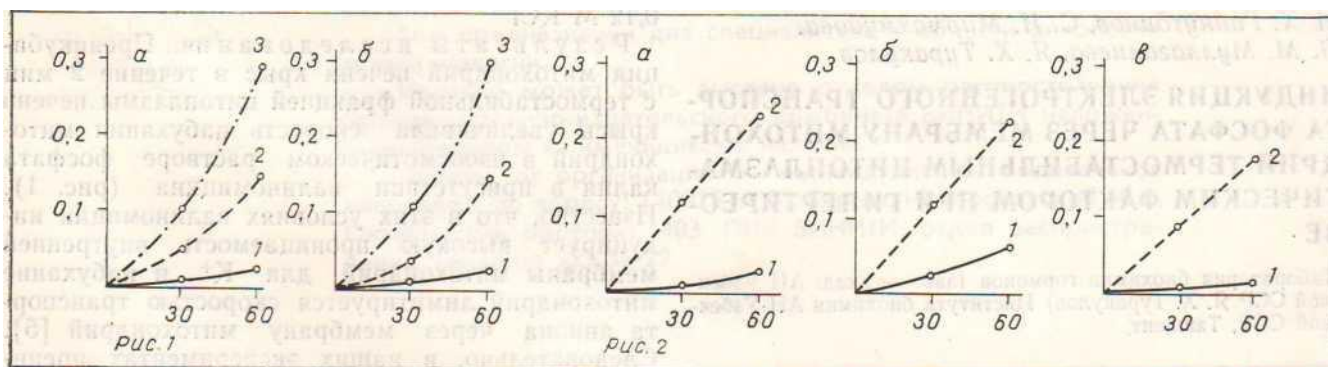


Рис. 1. Влияние гипертиреоза на активность термостабильного цитоплазматического индуктора транспорта фосфата в печени (а) и сердце (б) крыс.

1. — без добавления цитоплазмы; 2— 0,1 мл цитоплазмы контрольных крыс; 3 — 0,1 мл цитоплазмы гипертиреоидных крыс.

По оси абсцисс — время (в с); По оси ординат — увеличение оптической плотности суспензии при 540 нм.

Рис. 2. Влияние 2,4 ДНФ и N-этилмалеимида на транспорт фосфата через мембрану митохондрий в присутствии термостабильной фракции цитоплазмы печени крыс.

1 - контроль; 2 - 0.2 мл цитоплазмы, а — среда инкубации; б - среда инкубации + 2,4-ДНФ (10^{-4} М); в - среда инкубации + 2,4-ДНФ (10^{-4} М) + N-этилмалеимид ($1,5 \cdot 10^{-3}$ М).

Среда преинкубации: 120 мМ КСl, 10 мМ трис-НСl, 1,5 мМ ЭДТА, рН 7,6. Среда инкубации; 80 мМ

КНРО₄, 10 мМ трис-НСl, 1 мкг/мл ротенона, 1 мг/мл валиномицина, 1,5 мМ ЭДТА рН 7,6.

По оси абсцисс время (в с); по оси ординат - увеличение оптической плотности суспензий митохондрий.

Влияние термостабильной фракции цитоплазмы печени контрольных и гипертиреоидных крыс на окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс ($M \pm t$)

Условия опыта	V ₃	V ₄	ДК
Контроль	57,6±3,7	25,5±1,2	2,26
Цитоплазма			
контрольных крыс	61,0±4,2	33,4±1,7	1,82
Цитоплазма			
гипертиреоидных крыс	58,0±3,8	41,5±1,8	1,39

Примечание. Среда инкубации митохондрий: 0,15 М КСl, 1 мМ фосфата, 1 мМ ЭГТА, 0,7 мкг/мл ротенона, 10 мМ трис-НСl, рН 7,4. Субстрат окисления - 5 мМ сукцината. Добавляли: АДФ ($1 \cdot 10^{-4}$ М), 2,4-ДНФ ($1 \cdot 10^{-4}$ М). Митохондрии - 4 мг белка в 1 мл.

Потребление кислорода в мкА за 1 мин на 1 мг белка митохондрий. Цитоплазму добавляли в концентрации 0,2 мл на 1 мл среды инкубации. В контроле добавляли 0,2 мл 0,12М КСl. ДК — дыхательный контроль.

Экспериментальные данные, изложенные в этой работе, позволяют сделать 3 вывода: 1) При добавлении термостабильной фракции цитоплазмы индуцируется электрогенный транспорт фосфата через мембрану митохондрий; 2) При гипертиреозе повышается активность термостабильного индуктора транспорта фосфата в цитоплазме; 3) При гипертиреозе функционирование фосфатного цикла может быть причиной разобщения окислительного фосфорилирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ: (REFERENCES)

1. Горбачева О. С., Венедиктова Н. И., Миронова Г. Д. Изучение кинетики и регуляции цикла калия // Патогенез. 2011. Т. 9. № 3. С. 26-27.
2. Зоров Д. Б., Исаев Н. К., Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н. Перспективы митохондриальной медицины // Биохимия. 2013. Т. 78. № 9. С. 1251-1264
3. Гайнутдинов М. Х., Ахматов М. С., Лученко М. Б. и др. — В кн.: Всесоюзный биофизический съезд. Пленарные лекции и заседания. 1-й. Тезисы докладов. М., 1982 с 55-56.
4. Пожилова Е.В., Новиков В.Е., Левченкова О.С. Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал и его фармакологические модуляторы Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 2016. Том 14, № 1 С. 29-36
5. Warhurst I. W., Dawson A. P., Selwyn M J. FEBS Lett., 1982, v. 149, N 2, p. 249-252.
6. Schneider W. C. J. biol. Chem., 1948, v. 176, p. 259.
7. Каримова Ш.Ф., Акбарходжаева Х.Н., Туляганова З.Б., Алимходжаева Н.Т., Мирмахмудова С.И. Журнал U55 Universum: Биология и химия, Выпуск 10(88), 96с. Изд. "МЦНО" 2021, С.6875-6881 (Vol.25, Issue1, Pages 6875-6881)

DOI: 10.32743/UniChem.2021.88.10-1