

28.9

B-611

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ВОВКАНИЧ ЛЮБОМИР СТЕПАНОВИЧ

УДК 612.014.46:577.352.4

**ВПЛИВ КАТІОНІВ ЛУЖНОЗЕМЕЛЬНИХ І ПЕРЕХІДНИХ
МЕТАЛІВ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ
ПЕЧІНКИ ЩУРІВ**

03.00.02 - біофізика

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук



Київ-1999

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському державному університеті імені Івана Франка Міністерства Освіти України

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, доцент
ДУБИЦЬКИЙ Леонід Олександрович
Львівський державний університет імені Івана Франка,
доцент кафедри фізіології людини і тварин

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, ст. наук, співробітник
КОСТЕРІН Сергій Олександрович
зав. відділу Інституту біохімії
ім. О.В.Палладіна НАН України

доктор біологічних наук, професор
БЕРЕЗОВСЬКИЙ Валдим Якимович
зав. відділу Інституту фізіології
ім. О.О.Богомольця НАН України

Г.О.С.

Провідна установа: Національний медичний університет імені О.О.Богомольця МОЗ України, м. Київ

Захист відбудеться "22" серпня 1999 р. о 14 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 при Київському університеті імені Тараса Шевченка за адресою: 252033, м. Київ, вул. Володимирська 64, біологічний факультет Київського університету імені Тараса Шевченка, кімната 212.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Київського університету імені Тараса Шевченка за адресою: 252033, м. Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розісланий "21" серпня 1999 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради, кандидат біологічних наук

Т.Л.Давидовська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Дослідження закономірностей функціонування клітин організму в екстремальних умовах, у тому числі під впливом антропогенних факторів, є одним із пріоритетних напрямків сучасної біології. Серед таких факторів одне з перших місць займають катіони металів, які характеризуються широким спектром патогенного впливу на організм людини і тварин. Вони впливають на активність ряду ферментів (Левина, 1972, Ериков, Плетнева, 1989), стан клітинних мембран (Уильямс, 1978, Venugopal, Luckey, 1978, Evans, 1990), виступають антагоністами кальцію в клітині (Клевець, Манько, 1992, Дубицький, Сабадаш, 1995, Пономарев, 1980). Це суттєво відбивається на функціональній активності клітин та їх органел, зокрема мітохондрій (МХ), які здатні накопичувати ряд металів при інтоксикації ними в умовах *in vivo* (Probst, 1979, Korek, 1986). Порушення функціонування МХ, які займають важливе місце у забезпеченні енергетичних потреб (Gunter et. al., 1994) і кальцієвого гомеостазу (Gunter, Pfeiffer, 1990) клітин, може бути одним з механізмів, за яким реалізується токсичний ефект металів. Проте більшість досліджень впливу катіонів металів на функціонування МХ носять фрагментарний характер і в основному пов'язані із вивченням кальційтранспортних функцій цих органел. Практично відсутні роботи, присвячені комплексній оцінці порушень основних функцій МХ під впливом катіонів металів. Слабо дослідженим залишається також питання залежності ефектів металів на функції МХ від їх фізико-хімічних властивостей, зокрема від спорідненості до різних біолігандів. Відсутність достатньої бази даних у цьому напрямку обмежує можливості розробки методів підвищення стійкості організмів до цих факторів, та методів терапії інтоксикацій, викликаних солями металів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота виконана в рамках науково-дослідних тем "Вивчення клітинних механізмів порушень секреторної функції шлункових залоз катіонами металів" (№ держреєстрації 0194 V 015656), "Дослідження механізмів дії катіонів перехідних металів на секреторну функцію клітин травних залоз" (№ держреєстрації 0195 V 006596), "Виявлення механізмів функціонування Na-Ca обміну мембрани секреторних клітин" (№ держреєстрації 1096 V 002178) та "Дослідження Na-залежного транспорту кальцію через мембрани секреторних клітин у прямому і зворотному напрямках та ролі у ньому функціональних груп протейну обмінника" (№ держреєстрації 0198 V 004853).

Мета і задачі дослідження. Вивчити первинні механізми дії катіонів металів з різними фізико-хімічними властивостями (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+}) на функціонування МХ печінки щурів. Ця мета досягалась вирішенням таких основних завдань: 1) з'ясувати механізми впливу катіонів металів на дихання МХ

та транслокацію протонів через мембрану цих органел; 2) дослідити вплив металів на протоніофор-стимульоване дихання МХ та фосфорилування ADP цими органелами; 3) вивчити механізми впливу катіонів металів на Ca^{2+} -акumuлюючу здатність МХ; 4) вивчити вплив катіонів металів на стан проникності внутрішньої мембрани МХ печінки та механізми цього впливу; 5) з'ясувати залежність ефектів катіонів металів на функціонування МХ від їх фізико-хімічних властивостей.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження змін функціонального стану МХ печінки під впливом катіонів ряду металів з різними фізико-хімічними властивостями (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+}). У процесі досліджень отримано такі нові дані: 1) здатність катіонів металів стимулювати дихання МХ обумовлена їх енергозалежним транспортом у матрице цих органел і характеризується оберненою кореляцією з ентальпією їх гідратації та спорідненістю до карбоксильних груп Ca^{2+} -уніпортера МХ; 2) вплив катіонів різних груп металів на дихання МХ не залежить від субстрату окислення; 3) здатність катіонів металів пригнічувати протоніофор-стимульоване дихання МХ та фосфорилування ADP цими органелами корелює з їх спорідненістю до SH-груп біолігандів; 4) катіони металів з високою спорідненістю до кисневмісних лігандів (Mn^{2+} і ін.) інгібують транспорт Ca^{2+} у МХ за конкурентним типом, а катіони металів з високою спорідненістю до сірковмісних лігандів (Cd^{2+}) - за змішаним типом; 5) здатність катіонів металів інгібувати транспорт Ca^{2+} в МХ характеризується оберненою кореляцією з ентальпією їх гідратації та спорідненістю до карбоксильних груп Ca^{2+} -уніпортера; 6) катіони Ca^{2+} і Cd^{2+} індукують перехід внутрішньої мембрани МХ у стан високої неспецифічної проникності за різними механізмами, проте шляхом формування одних і тих же пор; 7) катіони Sr^{2+} і Mn^{2+} пригнічують Ca^{2+} -індуковані зміни проникності внутрішньої мембрани МХ за конкурентним типом.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати поглиблюють і уточнюють знання про механізми впливу катіонів металів із різними фізико-хімічними властивостями на функціонування МХ. Вони розширюють базу даних, необхідних для розробки методів підвищення стійкості організмів до інтоксикацій катіонами металів, а також для направленного пошуку антидотів до катіонів металів з різною спорідненістю до киснев- і сірковмісних груп лігандів клітини, що має важливе значення для України у зв'язку з високим техногенним забрудненням ряду її регіонів. Результати використовуються при викладанні загального курсу "Фізіологія людини і тварин", та спецкурсів "Фізіологія мінерального обміну" і "Біоенергетичні основи фізіологічних процесів" у Львівському державному університеті імені Івана Франка, а також загального курсу "Нормальна фізіологія" у Львівському державному медичному університеті. Вони можуть бути використані для

підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю в інших навчальних закладах України.

Особистий внесок здобувача полягає у виконанні всього обсягу експериментальної частини дисертації, статистичній обробці результатів, підборі і опрацюванні даних літератури, а також, за участю наукового керівника та співавторів, у аналізі та інтерпретації одержаних результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, що включені до дисертації, доповідались на: I-му з'їзді Українського біофізичного товариства (1994 р., Київ), XIV з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. І.П. Павлова (1994 р., Київ), науково-практичному симпозиумі "Медико-біологічні проблеми адаптації в сучасних умовах існування організму" (1995 р., Кузнецовськ), конференції до 100-річчя кафедри фізіології Львівського державного медичного університету (1995 р., Львів), щорічних наукових конференцій Львівського університету (1994-1998 рр., Львів), 9-тій Європейській конференції з проблем біоенергетики (1996 р., Ловеїн-ла-Неув), 4-й Європейській студентській науковій конференції (1996 р., Глазго), VII Українському біохімічному з'їзді (1997 р., Київ), XV з'їзді Українського фізіологічного товариства (Донецьк, 1998 р.).

Публікації. Основні положення дисертації висвітлені у 11 публікаціях, у тому числі у 3 статтях в наукових журналах та 8 тезах.

Структура дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису об'єкта і методів досліджень, викладу отриманих результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел (332 назви) і додатків. Робота викладена на 106 сторінках основного тексту, містить 10 таблиць, 14 рисунків та додатки на двох сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження механізмів дії катіонів металів на функціонування МХ проводили в умовах *in vitro*. Використовували хлориди металів. МХ ізолювали з печінок білих щурів методом диференціального центрифугування (Кондрашова, Григоренко, 1985). До складу середовища виділення МХ входили (ммоль/л): сахароза - 300, тріс - 10 (рН 7,4, t 0°C). Дихання МХ вивчали полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка та кисневимірювального блоку ГФ-012 (НДІ біол. досліджень, Пушино, Росія). Середовище інкубації МХ містило (ммоль/л): сахароза - 150, KCl - 50, K₂HPO₄ - 1, тріс - 5, сукцинат - 0,35 (рН 7,4, t 26°C). Вихід H⁺ з МХ печінки реєстрували рН-метричним методом з використанням електрода ЭСЛ-43-07 та універсального іонметра ЭВ-

74. У цих дослідженнях концентрацію трісу у середовищі інкубації зменшували до 3 ммоль/л (рН 7,4, t 26°C).

Кальційакумулюючу функцію МХ вивчали з використанням радіоактивного ізотопу $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,37 МБк/ммоль) у середовищі інкубації із зменшеною кількістю K_2HPO_4 (0,1 ммоль/л). Поглинання $^{45}\text{Ca}^{2+}$ зупиняли внесенням у суспензію МХ 25 мкл стоп-розчину (сахароза - 150 ммоль/л, KCl - 50 ммоль/л, тріс - 5 ммоль/л, LaCl_3 - 20 ммоль/л, рН 7,4) із наступним її швидким фільтруванням через мембранні фільтри Synpro (0,45 мкм). Фільтри промивали 5 мл середовища такого складу (ммоль/л): KCl - 150, тріс - 5, LaCl_3 - 0,5 (рН 7,4). Радіоактивність фільтрів вимірювали на рідинному сцинтиляційному лічильнику Rackbeta-1219 з використанням сцинтиляційної рідини ЖС-8.

Неспецифічну проникність мітохондріальної мембрани оцінювали за набуханням МХ методом ресстрації світлопоглинання суспензії цих органел ($\lambda = 520$ нм) на спектрофотометрі Cary-210. У середовище виділення МХ додатково вносили ЕГТА (1 ммоль/л) і альбумін сироватки бика (1%, маса/об'єм). Середовище інкубації МХ містило (ммоль/л): сахароза - 150, KCl - 50, K_2HPO_4 - 2, тріс - 5, сукцинат - 1 (рН 7,4, t 30°C). Вміст білка в суспензії МХ визначали за методом Лоурі (Lowry et. al., 1951) або біуретовим методом (Bialek, 1967).

Отримані результати обробляли статистично з використанням критерію Стюдента, а також методами кореляційного та регресійного аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вплив катіонів лужноземельних і перехідних металів на дихання мітохондрій та транслокацію протонів через мітохондріальну мембрану.

Відомо (Saris, Akerman, 1980), що катіони Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} та Mn^{2+} викликають стимуляцію дихання ізольованих МХ. Виявлений нами гіперболічний характер (рис. 1) дозової залежності ефектів Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} та Cd^{2+} (50-400 мкмоль/л) на дихання МХ печінки дозволив визначити константу напівнасичення ($K_{0,5}$) та максимальну швидкість ($V_{\max}$) цього процесу методом лінеаризації у системі обернених координат Лайнуївера-Берка. Катіони La^{3+} (50-400 мкмоль/л) не впливали на дихання МХ, а за відсутності у середовищі інкубації екзогенних фосфатів депо пригнічували його. Інгібіторну константу (K_i) у цьому випадку визначали у координатах Уеба. Встановлено, що значення $V_{\max}$ метал-стимульованого дихання МХ спадає у такому порядку:

Катіони металів: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{La}^{3+}$

$V_{\max}$, нмоль $\text{O}_2/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка: 35,71 33,90 26,32 22,02 9,04

$K_{0,5}$ для досліджуваних металів та K_i для La^{3+} , які характеризують чутливість МХ до катіонів металів утворюють такий ряд:

Катіони металів: $\text{Cd}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{La}^{3+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Mn}^{2+}$

$K_{0,5}$, K_i (La^{3+}), мкмоль/л: 12,63 14,82 39,70 100,68 188,30

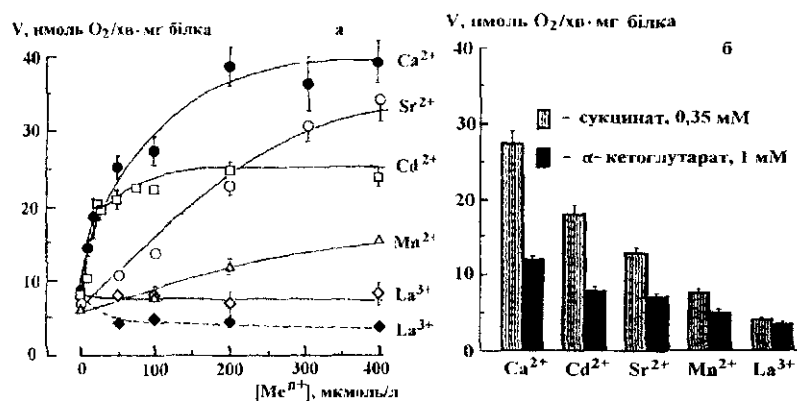


Рис. 1. Вплив катіонів металів на швидкість дихання мітохондрій печінки (V, нмоль O₂/хв·мг білка). а) Залежність швидкості дихання мітохондрій від концентрації катіонів металів ([Meⁿ⁺], мкмоль/л) у суспензії цих органел (пунктирна лінія - у середовищі інкубації відсутній екзогенний фосфат); б) вплив Ca²⁺, Sr²⁺, Mn²⁺ (100 мкмоль/л) та Cd²⁺ і La³⁺ (50 мкмоль/л) на швидкість дихання мітохондрій під час окислення ними сукцинату (0,35 ммоль/л, заштриховані стовпчики) і α-кетоглутарату (1 ммоль/л, темні стовпчики).

За здатністю стимулювати дихання MX катіони металів утворюють аналогічний ряд під час окислення ними сукцинату (0,35 ммоль/л) і α-кетоглутарату (1 ммоль/л) (див. рис. 1). Це свідчить, що вплив катіонів металів на дихання MX мало залежить від субстрату окислення.

Відомо (Nicholls, Akerman, 1982), що енергозалежне поглинання Ca²⁺ мітохондріями супроводжується виходом із них H⁺. Зокрема, нами виявлено, що поглинання 55,99±7,47 нмоль Ca²⁺ MX супроводжується виходом з цих органел 49,73±2,44 нмоль H⁺. Встановлено також, що катіони усіх досліджуваних металів стимулюють вихід H⁺ з MX печінки (рис. 2), що у випадку Ca²⁺, Sr²⁺ і Mn²⁺ підтверджується даними інших авторів (Saris, Akerman, 1980). Дозова залежність швидкості виходу H⁺ з MX для катіонів Ca²⁺, Sr²⁺ і Mn²⁺ (25-400 мкмоль/л) мала гіперболічний, а для катіонів Cd²⁺ і La³⁺ - куполоподібний характер. В цілому за здатністю стимулювати вихід H⁺ з MX (V_{max}, нмоль H⁺/хв·мг білка) катіони металів утворюють такий ряд:

Катіони металів: Ca²⁺ > Sr²⁺ >> La³⁺ > Cd²⁺ > Mn²⁺

V_{max}, нмоль H⁺/хв·мг білка: 990,10 800,00 166,95 108,39 95,15

Отриманий ряд аналогічний рядові металів, побудованому на основі їх здатності до стимуляції дихання MX, за винятком іонів La³⁺, які у цьому ряді зміщуються вліво.

Для з'ясування ролі транспорту катіонів досліджуваних металів у матрикс

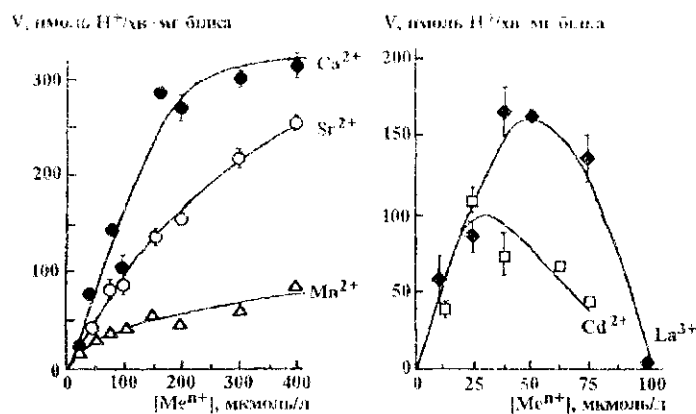


Рис. 2. Вплив різних концентрацій катіонів металів ($[Me^{n+}]$, мкмоль/л) на швидкість виходу H^+ (V , нмоль H^+ /хв·мг білка) з мітохондрій печінки.

МХ у реалізації їх впливу на функціонування цих органел нами була проведена серія дослідів з використанням некоюкурентного інгібітора Ca^{2+} -уніпортера мітохондріальної мембрани - рутенію червоного. Показано, що рутеній червоний (10 мкмоль/л) зменшує сумарний вихід H^+ з МХ печінки, який стимулювали катіонами Ca^{2+} , Sr^{2+} і Mn^{2+} (100 мкмоль/л), відповідно на 97, 100 та 90% ($P < 0,05$). Проте рутеній червоний не впливав на сумарний вихід H^+ з МХ печінки, який стимулювали катіонами Cd^{2+} і La^{3+} (50 мкмоль/л), хоча зменшував його швидкість на 65 і 43% ($P < 0,05$). Це свідчить, що стимуляція дихання МХ та виходу з них H^+ катіонами Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} визначається їх транспортом в ці органели за участю Ca^{2+} -уніпортера. Кулоподібний характер дозової залежності ефектів Cd^{2+} і La^{3+} на вихід H^+ з МХ та повне інгібування цього процесу рутенієм червоним свідчать, що він лише частково визначається їх транспортом у МХ через Ca^{2+} -уніпортер.

Ряд металів, побудований на основі їх здатності до стимуляції дихання МХ, характеризується тісною оберненою кореляцією (табл. 1) з сигналь-

Таблиця 1

Кореляційний аналіз залежності кінетичних параметрів метал-стимульованого дихання мітохондрій від фізико-хімічних властивостей іонів металів.

Кінетичні параметри дихання мітохондрій	Коефіцієнт кореляції, r				
	Іон. радіус, нм	ΔH^0 гідр., ккал/моль	$\lg K_1$ метал-ацетат	$\lg K_1$ метал-Асп	$\lg K_1$ метал-уц
V_{max} , нмоль O_2 /хв·мг білка	-0,25 $r=0,35$	-0,95 $r=0,98$	-0,90 $r=0,96$	-0,84 $r=0,93$	-0,70 $r=0,88$

Примітка. r - вірогідність коефіцієнта кореляції.

пісю гідратації катіонів металів ($r = -0,95$), та константами стійкості їх комплексів з ацетатом ($r = -0,90$) та аспарагіновою кислотою ($r = -0,84$). Це свідчить про важливу роль дегідратації катіонів металів та їх взаємодії з карбоксильними групами Ca^{2+} -уніпортера під час їх енергозалежної транспортації в матрикс МХ.

Таким чином, МХ печінки здатні до енергозалежної акумуляції катіонів Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} і Cd^{2+} , швидкість якої визначається ентальпією гідратації катіонів металів та їх спорідненістю до COO^- -груп Ca^{2+} -уніпортера МХ. Разом з тим, пригнічення дихання МХ іонами La^{3+} та куполоподібний характер дозової залежності ефектів Cd^{2+} і La^{3+} на вихід іонів H^+ з МХ печінки вказують на здатність цих металів взаємодіяти з іншими функціональними системами цих органел.

Вплив катіонів перехідних і лужноземельних металів на протонофор-стимульоване дихання та АДФ-фосфорилуючу здатність мітохондрій

Відомо, що швидкість дихання МХ, стимульованого протонофорами, зокрема *p*-трихлорметоксикарбоніліціанідфенілгідразоном (СССР) та 2,4-динітрофенолом (DNP), визначається інтенсивністю процесів окислення у дихальному ланцюгу цих органел. Нами встановлено, що СССР (0,5 мкмоль/л) різко збільшує швидкість дихання МХ ($V_{\text{СССР}}$) після їх інкубації з іонами Ca^{2+} , Sr^{2+} та Mn^{2+} (100 мкмоль/л) (рис. 3). У цьому випадку $V_{\text{СССР}}$ мало зале-

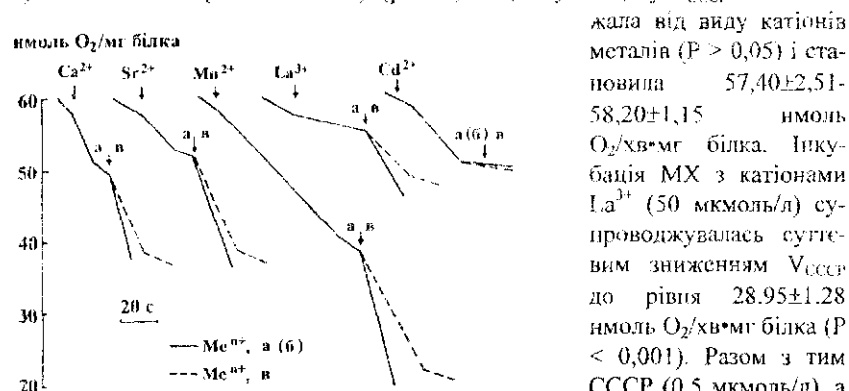


Рис. 3. Вплив катіонів Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} (100 мкмоль/л) та Cd^{2+} і La^{3+} (50 мкмоль/л) на протонофор- та АДФ-стимульоване дихання мітохондрій. Дихання мітохондрій реєстрували за зменшенням кількості O_2 (нмоль O_2 /мг білка) у суспензії цих органел. Стрілкою вказано момент внесення у суспензію мітохондрій катіонів металів. СССР (а, 0,5 мкмоль/л), DNP (б, 10 мкмоль/л) та АДФ (в, 200 мкмоль/л).

жала від виду катіонів металів ($P > 0,05$) і становила $57,40 \pm 2,51$ – $58,20 \pm 1,15$ нмоль O_2 /хв·мг білка. Інкубація МХ з катіонами La^{3+} (50 мкмоль/л) супроводжувалась суттєвим зниженням $V_{\text{СССР}}$ до рівня $28,95 \pm 1,28$ нмоль O_2 /хв·мг білка ($P < 0,001$). Разом з тим СССР (0,5 мкмоль/л), а також DNP (1 мкмоль/л) не впливали на швидкість дихання МХ після їх взаємодії з катіонами Cd^{2+} (50 мкмоль/л). Пригнічення

протонофор-стимульованого дихання МХ під впливом іонів Cd^{2+} і La^{3+} свідчить про здатність цих катіонів інгібувати процеси мітохондріального окислення. Інгібуючий ефект іонів Cd^{2+} розвивається після попередньої стимуляції дихання, обумовленої їх енергозалежною акумуляцією в МХ.

Порушення мітохондріального окислення під впливом катіонів металів (50-100 мкмоль/л) суттєво позначається на процесах окисного фосфорилування у МХ. Показано, що швидкість ADP-стимульованого дихання МХ (V_{ADP} , 200 мкмоль/л) після їх преінкубації з катіонами Ca^{2+} і Sr^{2+} суттєво не відрізняється від V_{ADP} за відсутності в середовищі інкубації катіонів металів ($34,66 \pm 0,33$ нмоль $\text{O}_2/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка) і становить відповідно $32,63 \pm 1,95$ і $32,36 \pm 1,87$ нмоль $\text{O}_2/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка ($P > 0,05$). Преінкубація МХ з катіонами Mn^{2+} та La^{3+} супроводжувалась зменшенням V_{ADP} відповідно до $26,16 \pm 2,25$ та $15,58 \pm 1,09$ нмоль $\text{O}_2/\text{хв} \cdot \text{мг}$ білка, тобто на 25 та 31% ($P < 0,05$). Інкубація МХ з катіонами Cd^{2+} призводила до повного пригнічення ADP-стимульованого дихання цих органел. За здатністю пригнічувати протонофор- та ADP-стимульоване дихання МХ катіони металів утворюють такий ряд:

Катіони металів:	Ca^{2+}	Sr^{2+}	Mn^{2+}	La^{3+}	Cd^{2+}
Зменшення $V_{\text{СССР}}$, %:	0	1	0	50	100
Зменшення V_{ADP} , %:	6	7	25	31	100

Інгібуючий ефект катіонів металів на $V_{\text{СССР}}$ і V_{ADP} тісно корелює ($r = 0,93 - 0,99$) з константами стійкості комплексів цих металів з SH-групами цистеїну (табл. 2). Таким чином, катіони досліджуваних металів, зокрема Cd^{2+} , La^{3+} і частково Mn^{2+} , пригнічують процеси окислення і фосфорилування в МХ печінки. Здатність катіонів металів пригнічувати процеси окислення і фосфорилування в МХ визначається їх спорідненістю до сірковмісних лігандів цих органел.

Таблиця 2

Залежність інгібуючих ефектів катіонів металів на протонофор- та ADP-стимульоване дихання мітохондрій від їх фізико-хімічних властивостей

Параметри дихання мітохондрій	Іон. радіус, нм	Коефіцієнт кореляції, r				
		ΔH^0 гідр, ккал/моль	$\lg K_1$ ме-тац-ацетат	$\lg K_1$ ме-тац-Асп	$\lg K_1$ ме-метал-С'ys	
Зменшення $V_{\text{СССР}}$, %	0,15 $r=0,22$	0,32 $r=0,59$	0,67 $r=0,81$	0,66 $r=0,75$	0,93 $r=0,98$	
Зменшення V_{ADP} , %	-0,17 $r=0,22$	0,07 $r=0,15$	0,50 $r=0,61$	0,63 $r=0,75$	0,99 $r=0,99$	

Примітка. r – вірогідність коефіцієнта кореляції.

Механізми дії катіонів лужноземельних і перехідних металів на кальційакумулюючу функцію мітохондрій

Відомо, що висока кальційакумулююча здатність МХ має важливе значення у підтриманні кальцієвого гомеостазу клітини (Gunter, Pfeiffer, 1990, Костерин, Бурдыга, 1993) та у регуляції функціонування цих органел (McConnell et al., 1990). Встановлено, що катіони Sr^{2+} (20-200 мкмоль/л), Cd^{2+} і La^{3+} (2-50 мкмоль/л), внесені у суспензію МХ одночасно з катіонами Ca^{2+} (30 мкмоль/л), пригнічують поглинання іонів Ca^{2+} цими органелами (рис. 4).

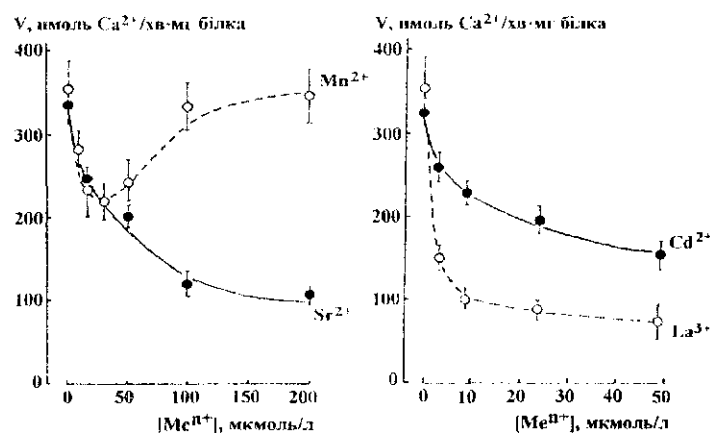


Рис. 4. Залежність швидкості поглинання Ca^{2+} (V, $\mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{h} \cdot \text{mg}$ білка) мітохондріями від концентрації катіонів металів ($[\text{Me}^{n+}]$, $\mu\text{mol/L}$) у суспензії цих органел.

Дозова залежність ефектів катіонів Sr^{2+} , Cd^{2+} і La^{3+} мала експоненціальний характер. Катіони Mn^{2+} у концентраціях 10-50 мкмоль/л також пригнічували поглинання кальцію мітохондріями печінки. Проте збільшення концентрації іонів Mn^{2+} у суспензії МХ в діапазоні 50-200 мкмоль/л супроводжувалось зменшенням їх інгібуючого впливу на поглинання іонів Ca^{2+} мітохондріями. Подібний ефект був відмічений і іншими авторами (Hughes, Exton, 1983, Allshire et al., 1985) які виявили здатність іонів Mn^{2+} стимулювати поглинання Ca^{2+} МХ печінки шурів та мозку морської свинки. Ймовірно, іони Mn^{2+} у високих концентраціях здатні взаємодіяти з катіонзв'язуючими групами Ca^{2+} -уніпортера, що супроводжується модифікацією його провідності.

Лінії дозової залежності інгібуючих ефектів катіонів Sr^{2+} , Mn^{2+} та La^{3+} на поглинання Ca^{2+} мітохондріями у координатах Усба перетинають вісь ординат у точках, близьких до одиниці (рис. 5). Це вказує на конкурентний тип інгібування цими катіонами транспорту Ca^{2+} у МХ. У випадку з іонами Cd^{2+}

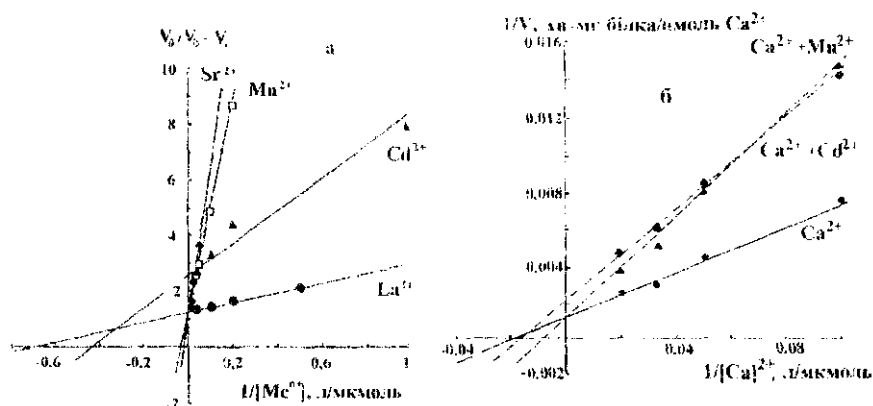


Рис. 5 Кінетичний аналіз інгібуючого впливу катіонів металів на поглинання Ca^{2+} мітохондріями печінки в системі координат Уеба (а) та Лайнуївера-Берка (б). а) $1/[\text{Mn}^{2+}]$ - обернені величини концентрації катіонів металів у суспензії мітохондрій, $V_0/(V_0 - V_i)$ - обернені величини частки неінгібованої швидкості поглинання Ca^{2+} мітохондріями; б) $1/[\text{Ca}^{2+}]$ - обернені значення концентрації катіонів Ca^{2+} у суспензії мітохондрій; $1/V$ - обернені значення швидкості поглинання кальцію мітохондріями.

координати точки перетину отриманої лінії з віссю ординат значно відрізняються від одиниці, що свідчить про інший тип інгібування.

Визначення типу інгібування катіонами Cd^{2+} транспорту Ca^{2+} в МХ проводили графічним методом у координатах Лайнуївера-Берка. Для порівняння у цій системі координат був оцінений тип інгібування поглинання Ca^{2+} мітохондріями катіонами Mn^{2+} . Виявлене під впливом Mn^{2+} (50 мкмоль/л) збільшення $K_{0.5}$ поглинання Ca^{2+} мітохондріями з 56,99 до 113,68 мкмоль/л та відсутність суттєвих змін V_{max} цього процесу підтверджує конкурентний характер інгібування. Під впливом Cd^{2+} (10 мкмоль/л) $K_{0.5}$ поглинання кальцію МХ збільшувалась з 56,99 до 67,37 мкмоль/л, а V_{max} цього процесу зменшувалась з 913,79 до 532,50 нмоль Ca^{2+} /хв·мг білка, що вказує на змішаний тип інгібування. Можливим механізмом цього є виявлене нами пригнічення під впливом іонів Cd^{2+} процесів окислення у дихальному ланцюгу МХ.

Порівняння інгібуючого впливу катіонів металів на кальційакумуючу здатність МХ проводили на основі інгібіторних констант (K_i), які визначали методом лінеаризації експоненціальних кривих доза-ефект в координатах Уеба (див. рис. 5). Для порівняльного аналізу була використана також K_i транспорту Ca^{2+} в МХ іонами Ba^{2+} , визначена К.Акерманом із співавторами (Akerman et al., 1977). Встановлено, що за зменшенням інгібуючого впливу на поглинання кальцію мітохондріями (K_i , мкмоль/л) катіони металів утворюють такий ряд:

$$\text{Катіони металів: } \text{La}^{3+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$$

$$K_i, \text{ мкмоль/л: } 2,11 \quad 10,36 \quad 49,29 \quad 66,43 \quad 70,00$$

Отриманий ряд характеризується тісною оберненою кореляцією (табл. 3) з ентальпією гідратації ($r = -0,78$) іонів металів та константами стійкості їх комплексів з карбоксильними групами ацетату ($r = -0,96$) та аспарагінової кислоти ($r = -0,91$). Це вказує на важливу роль процесів дегідратації катіонів металів та їх взаємодії з карбоксильними групами Ca^{2+} -уніпортера у механізмах транслокації Ca^{2+} через мембрану МХ та у пригніченні цього процесу катіонами металів. На користь цього свідчить високий вміст (24%) дикарбонових амінокислот у складі Ca^{2+} -транспортного глікопротеїну МХ серця бика (Миронова, Утешева, 1989).

Таблиця 3

Залежність інгібуючих ефектів катіонів металів на поглинання Ca^{2+} мітохондріями від фізико-хімічних властивостей іонів металів.

Кінетичні параметри інгібування поглинання Ca^{2+} мітохондріями	Коефіцієнт кореляції, r					
	Іон. радіус, нм	ΔH° гідр., ккал/моль	$\lg K_1$ ме- тал-ацетат	$\lg K_1$ ме- тал-Asp	$\lg K_1$ ме- тал-Cys	
K_i поглинання Ca^{2+} , мкмоль/л	-0,26 $r = -0,35$	-0,78 $r = -0,90$	-0,96 $r = -0,98$	-0,91 $r = -0,97$	-0,72 $r = -0,83$	

Примітка. r - вірогідність коефіцієнта кореляції.

Таким чином, катіони металів інгібують транспорт Ca^{2+} в МХ печінки за конкурентним (Sr^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+}) та змішаним (Cd^{2+}) типом. Здатність катіонів металів інгібувати транспорт Ca^{2+} в МХ визначається ентальпією їх гідратації та спорідненістю до карбоксильних груп Ca^{2+} -уніпортера цих органел.

Вплив катіонів лужноземельних і перехідних металів на неспецифічну проникність внутрішньої мембрани мітохондрій

Відомо (Zoratti, Szabo, 1995), що нагромадження кальцію у МХ за певних умов призводить до переходу їх внутрішньої мембрани у стан високої неспецифічної проникності (ВНП), набухання цих органел, що супроводжується втратою ними здатності до окисного фосфорилування. Поряд з тим дані про вплив катіонів металів на стан проникності мембрани МХ, що може бути одним із механізмів реалізації їх впливу на функціонування цих органел, обмежені. Нами встановлено, що індуковане Ca^{2+} (30-100 мкмоль/л) набухання МХ включає фази повільного (лаг-фаза) та швидкого набухання цих органел (рис. 6). Зменшення світлопоглинання суспензій МХ, що свідчить про їх набухання, досягло $0,178 \pm 0,003$ од. екст./мг білка ($P = 0,001$), а його швидкість - $0,009 \pm 0,008$ од. екст./хв*мг білка. Катіони Cd^{2+} (15-50 мкмоль/л) також індукували набухання МХ, яке, проте, характеризувалось відсутністю лаг-фази, меншою амплітудою та тривалістю процесу. Так, максимальна амплітуда Cd^{2+} -

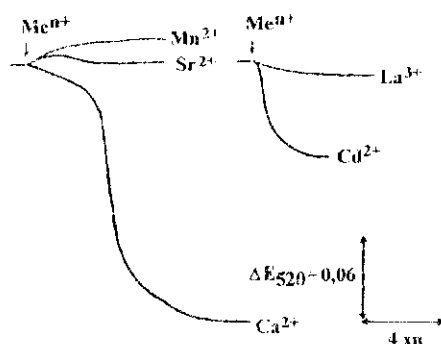


Рис. 6. Часова кінетика впливу катіонів металів (50 мкмоль/л) на світлопоглинання суспензії мітохондрій (ΔE_{520} , од. екст./мг білка).

MX, наближаючи її до кінетики власного впливу (табл. 4). Так, катіони Cd^{2+} (50 мкмоль/л) зменшували амплітуду Ca^{2+} -індукованого (30 мкмоль/л) набухання MX з $0,178 \pm 0,003$ до $0,076 \pm 0,005$ од. екст./мг білка ($P < 0,001$), а також тривалість лаг-фази та загальну тривалість набухання. Відсутність адитивності ефектів іонів Ca^{2+} і Cd^{2+} на набухання MX свідчить, що їх вплив реалізується через формування одних і тих же пор у мембрані цих органел. Проте особливості кінетики Ca^{2+} - і Cd^{2+} -індукованого набухання вказують на різні механізми ініціації формування цих пор, в основі чого може лежати неодинакова спорідненість катіонів цих металів до карбоксильних і сульфгідрильних груп біолігандів.

Катіони Sr^{2+} і Mn^{2+} у концентрації 50–200 мкмоль/л суттєво пригнічували Ca^{2+} -індуковане набухання MX (див. табл. 4). Інгібуючий ефект катіонів Sr^{2+} і Mn^{2+} збільшувався із зростанням їх концентрації у суспензії MX. Так, катіони Mn^{2+} у концентрації 50 мкмоль/л збільшували тривалість лаг-фази Ca^{2+} -індукованого (30 мкмоль/л) набухання MX від $268,50 \pm 32,03$ до $562,00 \pm 72,38$ с ($P < 0,01$), а у концентрації 200 мкмоль/л повністю занебівали розвитку цього процесу. Аналогічні, хоча і менш виражені зміни, спостерігались під впливом іонів Sr^{2+} . Інгібуючий вплив катіонів Sr^{2+} і Mn^{2+} на Ca^{2+} -індуковане набухання MX зменшувався із збільшенням концентрації Ca^{2+} у середовищі інкубації. Так, катіони Mn^{2+} у концентрації 100 мкмоль/л збільшували тривалість лаг-фази набухання MX, індукованого Ca^{2+} у концентраціях 30 та 100 мкмоль/л, відповідно на 110 ($P < 0,01$) та 32% ($P < 0,05$). Аналогічні зміни спостерігались під впливом Sr^{2+} . Наведені результати свідчать

індукованого набухання, досягали $0,097 \pm 0,002$ од. екст./мг білка ($P < 0,05$), а його швидкість – $0,148 \pm 0,006$ од. екст./хв·мг білка. Катіони Sr^{2+} (50, 100 мкмоль/л), Mn^{2+} (50, 200 мкмоль/л) та La^{3+} (2, 50 мкмоль/л) на протязі 7–8 хв. не викликали суттєвих змін світлопоглинання суспензії MX ($P > 0,05$). Очевидно, що катіони Sr^{2+} , Mn^{2+} та La^{3+} у досліджуваних концентраціях не викликають переходу внутрішньої мембрани MX у стан ВНП.

Катіони Cd^{2+} у концентраціях 15 і 50 мкмоль/л суттєво змінювали кінетику Ca^{2+} -індукованого набухання

Таблиця 4
Вплив катіонів металів на Ca^{2+} -індуковане набухання мітохондрій печінки (М лт, n = 4)

Концентрація катіонів металів, мкмоль/л	Відносні зміни об'єму мітохондрій, ΔE_{520} од. екст./хв*мг білка	Відносна швидкість набухання мітохондрій, ΔE_{520} од. екст./хв*мг білка	Загальна тривалість процесу, с	Тривалість лат-фаз, с
Ca^{2+} , 30	0,178±0,003	0,080±0,008	839,63 ±4,31	268,50±32,03
Ca^{2+} , 100	0,166±0,004	0,099±0,008	750,69±43,67	258,60±31,74
Cd^{2+} , 50	0,065±0,002	0,089±0,004	283,20±23,03	23,72±0,85
Ca^{2+} , 30 Cd^{2+} , 50	0,076±0,005 $P_1 < 0,001$	0,111±0,011 $P_1 > 0,05$	376,50±19,19 $P_1 < 0,001$	28,20±2,24 $P_1 < 0,001$
Ca^{2+} , 100 Cd^{2+} , 50	0,090±0,007 $P_1 < 0,001$	0,107±0,013 $P_1 > 0,05$	451,80±15,40 $P_1 < 0,001$	31,00±1,00 $P_1 < 0,001$
Ca^{2+} , 30 Sr^{2+} , 50	0,175±0,010 $P_1 > 0,05$	0,038±0,004 $P_1 < 0,01$	1069,80±49,80 $P_1 < 0,01$	225,75±43,39 $P_1 > 0,05$
Ca^{2+} , 30 Sr^{2+} , 100	0,159±0,016 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	0,032±0,001 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,05$	1241,00±32,05 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$	440,25±62,85 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,05$
Ca^{2+} , 100 Sr^{2+} , 50	0,163±0,007 $P_1 > 0,05$ $P_3 > 0,05$	0,058±0,005 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$	692,50±73,33 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,01$	237,75±21,51 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$
Ca^{2+} , 30 Mn^{2+} , 50	0,184±0,001 $P_1 > 0,05$	0,099±0,017 $P_1 > 0,05$	1115,00±32,79 $P_1 < 0,01$	562,00±72,38 $P_1 < 0,01$
Ca^{2+} , 30 Mn^{2+} , 200	0,008±0,001 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$	Набухання відсутнє		
Ca^{2+} , 100 Mn^{2+} , 50	0,166±0,003 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,01$	0,088±0,005 $P_1 > 0,05$ $P_2 > 0,05$	891,75±41,33 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,01$	341,25±30,10 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$

Примітка. P_1 - достовірність різниці показників Ca^{2+} -індукованого набухання мітохондрій у присутності та за відсутності у середовищі іонів металів; P_2 - достовірність різниці показників Ca^{2+} -індукованого (30 мкмоль/л) набухання мітохондрій у присутності різних концентрацій іонів металів; P_3 - достовірність різниці показників набухання мітохондрій, індукованого різними концентраціями Ca^{2+} (30 і 100 мкмоль/л) у присутності іонів металів.

про конкурентний характер пригнічення Ca^{2+} -індукованого збільшення неспецифічної проникності мембрани МХ катіонами Sr^{2+} і Mn^{2+} . В основі цього лежить, імовірно, пригнічення цими катіонами акумуляції катіонів Ca^{2+} мітохондріями та їх взаємодія з Ca^{2+} -зв'язуючими групами пороутворюючих білків мембрани МХ.

Таким чином, катіони Ca^{2+} і Cd^{2+} індукують перехід внутрішньої мембрани МХ у стан ВНП. Особливості кінетики Ca^{2+} - і Cd^{2+} -індукованого набухання МХ свідчать про відмінність механізмів їх впливу на стан проникності мембрани цих органел, що, ймовірно, обумовлено їх неодинаковим спорідненістю

до COO^- і SH -груп. Катіони Sr^{2+} , Mn^{2+} і La^{3+} не індукують набухання MX . Sr^{2+} і Mn^{2+} пригнічують Ca^{2+} -індуковані зміни проникності внутрішньої мембрани MX за конкурентним типом.

ВИСНОВКИ

1. Мітохондрії печінки здатні до енергозалежної акумуляції катіонів ряду лужноземельних (Ca^{2+} , Sr^{2+}) і перехідних (Mn^{2+} , Cd^{2+}) металів, що супроводжується стимуляцією їх дихання та виходом H^+ з цих органел. Катіони La^{3+} (50-400 мкмоль/л) не змінюють, а у відсутності екзогенного фосфату частково пригнічують швидкість дихання мітохондрій, хоча і стимулюють вихід H^+ з цих органел.

2. Здатність катіонів металів стимулювати дихання мітохондрій (V_{max}), обумовлена їх транслокацією в матрикс цих органел, визначається ентальпією гідратації катіонів металів та їх спорідненістю до карбоксильних груп Ca^{2+} -уніпортера мітохондріальної мембрани і спадає у такому ряді: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} \gg \text{La}^{3+}$.

3. Катіони Ca^{2+} , Sr^{2+} і Mn^{2+} (100 мкмоль/л) не впливають, а катіони Cd^{2+} і La^{3+} (50 мкмоль/л) пригнічують дихання мітохондрій, стимульоване пронофорами (CCCP, 0,5 мкмоль/л; DNP, 10 мкмоль/л), що свідчить про безпосереднє інгібування ними процесів окислення в дихальному ланцюгу цих органел. В цілому, здатність катіонів металів пригнічувати процеси окислення в дихальному ланцюгу мітохондрій збільшується у такому порядку: Ca^{2+} , Sr^{2+} , $\text{Mn}^{2+} < \text{La}^{3+} < \text{Cd}^{2+}$.

4. Катіони Mn^{2+} (100 мкмоль/л), Cd^{2+} і La^{3+} (50 мкмоль/л) пригнічують ADP-стимульоване дихання мітохондрій, а катіони Ca^{2+} і Sr^{2+} (100 мкмоль/л) не впливають на цей процес. Здатність іонів металів пригнічувати ADP-стимульоване дихання мітохондрій зростає в ряді: Ca^{2+} , $\text{Sr}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{La}^{3+} < \text{Cd}^{2+}$.

5. Здатність катіонів металів пригнічувати процеси окислення і фосфорилювання в мітохондрії визначається їх спорідненістю до SH - груп макромолекул дихального ланцюга цих органел.

6. Катіони Mn^{2+} , Sr^{2+} і La^{3+} інгібують транспорт Ca^{2+} у мітохондрії за конкурентним, а катіони Cd^{2+} - за змішаним типом. Інгібіторна константа (K_i , мкмоль/л) транспорту Ca^{2+} у мітохондрії для катіонів металів збільшувалась у такому порядку: $\text{La}^{3+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Sr}^{2+}$. Здатність катіонів металів інгібувати транспорт Ca^{2+} в мітохондрії значною мірою визначається ентальпією їх гідратації та спорідненістю до карбоксильних груп Ca^{2+} -уніпортера цих органел.

7. Катіони Ca^{2+} (30-100 мкмоль/л) і Cd^{2+} (15-50 мкмоль/л) індукують перехід внутрішньої мембрани мітохондрій у стан високої неспецифічної проникності за різними механізмами, проте шляхом формування одних і тих же

пор. Найбільш імовірно в основі цього лежить неординарна спорідненість катіонів Ca^{2+} і Cd^{2+} до карбоксильних і сульфгідрильних груп макромолекул мембрани мітохондрій.

8. Катіони Sr^{2+} (50-100 мкмоль/л), Mn^{2+} (50-200 мкмоль/л) та La^{3+} (2-50 мкмоль/л) не індукують набухання мітохондрій печінки. Разом з тим вони пригнічують Ca^{2+} -індуковані зміни проникності внутрішньої мембрани мітохондрій за конкурентним типом. В основі цього лежить, імовірно, пригнічення цими катіонами акумуляції катіонів Ca^{2+} мітохондріями та їх взаємодія з Ca^{2+} -зв'язуючими групами пороутворюючих білків мембрани мітохондрій.

9. Катіони ряду лужноземельних (Ca^{2+} , Sr^{2+}) і перехідних (Mn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+}) металів суттєво впливають на функціонування мітохондрій печінки, зокрема на дихання, ADP-фосфорилюючу та кальційакумулюючу функції мітохондрій, а також на стан проникності внутрішньої мембрани цих органел. Здатність катіонів металів взаємодіяти з різними функціональними системами мітохондрій неординарна і визначається їх фізико-хімічними властивостями: ентальпією гідратації, спорідненістю до карбоксильних і сульфгідрильних груп макромолекул. Це створює можливості для направлено пошуку антидотів до металів з різною спорідненістю до кисне- і сірковмісних лігандів клітини.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С. Вплив катіонів перехідних металів на дихання і продукування H^+ мітохондріями печінки // Укр. біохім. журн. - 1996. - Т. 68, N 5. - С. 59-63.
2. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С., Полотнюк С.Я. Роль кальційтранспортних систем і мітохондрій у порушенні екзоцитозу секреторних клітин шлунка катіонами перехідних металів // Актуал. пробл. медицини, біології, ветеринарії та сільського господарства. - Львів: Віче, 1997. - С. 59-62.
3. Вовканич Л.С., Дубицький Л.О. Вплив катіонів лужноземельних і перехідних металів на неспецифічну проникність внутрішньої мембрани мітохондрій // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - 1998. - N 1. - С. 5-9.
4. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С. Дослідження впливу катіонів перехідних металів на Ca^{2+} -стимульоване дихання мітохондрій печінки щурів // Матеріали 1-го з'їзду Українського біофізичного товариства. - Київ. - 1994. - С. 90 - 91.
5. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С., Сабадан Г.І. Дослідження впливу катіонів перехідних металів на функціональну активність секреторних клітин шлунка. // Тез. доп. XIV з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. І.П. Павлова. - Київ. - 1994. - С. 157.

6. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С. Дослідження адаптивних реакцій мітохондрій печінки щурів при інтоксикаціях металами // *Мат. наук.-практ. симп. "Медико-біологічні проблеми адаптації в сучасних умовах існування організму"* (14-16 березня 1995 р., м. Кузнецовськ). - Львів, 1995. - С. 19.

7. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С., Сабадан Г.І., Синюк З.В. Вплив катіонів перехідних металів на системи підтримання кальцієвого гомеостазу секреторних клітин шлунку // *Експериментальна та клінічна фізіологія*. - Львів, 1995. - С. 148-149.

8. Vovkanych L.S. Investigation of the mechanisms of metals' cations effect on respiration and H^+ release of rat liver mitochondria // *Book of abstracts of the 4-th International students' scientific conference*. - Gdansk, 1996. - P. 6.

9. Vovkanych L.S., Dubitsky L.O. Investigation of the mechanisms of metals' cations effect on respiration of rat liver mitochondria // *9-th European bioenergetic conference*. - August 17-22, EBEC Reports. - *Biochim. Biophys. Acta*. - 1996, V. 9. - P.192.

10. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С., Полотнюк С.Я. Дослідження ролі кальційтранспортних систем в порушенні функціональної активності секреторних клітин катіонами металів // *Тез. доп. VII Укр. біохім. з'їзду*. - Київ, 1997. - С. 40-41.

11. Вовканич Л.С., Дубицький Л.О. Вплив катіонів металів на дихання та кальційтранспортні процеси у мітохондріях печінки щура // *Матеріали XV з'їзду Українського фізіологічного товариства* (Донецьк, 1998). - *Фізіол. журн.* - 1998. - Т. 44, N 3. - С. 156.

АНОТАЦІЯ

ВОВКАНИЧ Л.С. Вплив катіонів лужноземельних і перехідних металів на функціонування мітохондрій печінки щурів. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика. - Київський університет імені Тараса Шевченка, Київ, 1999.

Дисертацію присвячено вивченню механізмів дії катіонів металів (КМ), зокрема Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} і La^{3+} , на дихання, ADP-фосфорилуючу і Ca^{2+} -акумулюючу функції мітохондрій (МХ) печінки, та на стан неспецифічної проникності їх внутрішньої мембрани. Встановлено, що МХ здатні до енергозалежної акумуляції КМ, швидкість якої визначається ентальпією гідратації КМ та їх спорідненістю до COO^- груп Ca^{2+} -уніпортера МХ. Пригнічення КМ процесів окислення субстратів та окисного фосфорилування у МХ корелює з константами стійкості комплексів цих металів з SH групами цистеїну. КМ інгібують транспорт Ca^{2+} у МХ за конкурентним (Sr^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+}) та змішаним типом (Cd^{2+}). Вираженість інгібування визначається ентальпією гідратації КМ та

їх спорідненістю до COO^- груп Ca^{2+} -уніпортера. Ca^{2+} і Cd^{2+} , на відміну від Sr^{2+} , Mn^{2+} та La^{3+} , індукують збільшення неспецифічної проникності мембрани МХ. Sr^{2+} і Mn^{2+} здатні конкурентно пригнічувати цей процес. Отже, здатність КМ взаємодіяти з різними функціональними системами МХ неодинакова і визначається їх фізико-хімічними властивостями, зокрема ентальпією гідратації та спорідненістю до кисне- і сірковмісних груп біолігандів, що може бути використане для направленої пошуку антидотів до різних металів.

Ключові слова: мітохондрії печінки, катіони металів, дихання, окисне фосфорилування, поглинання кальцію, неспецифічна проникність мембрани.

АННОТАЦИЯ

ВОВКАНЫЧ Л.С. Влияние катионов щелочноземельных и переходных металлов на функционирование митохондрий печени крыс. - Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 - биофизика. - Киевский университет имени Тараса Шевченко, Киев, 1999.

Диссертация посвящена изучению механизмов влияния катионов металлов (КМ), в частности Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} , на дыхание, АТФ-фосфорилирующую и Ca^{2+} -аккумулирующую функции митохондрий (МХ) печени, а также на состояние неспецифической проницаемости их внутренней мембраны.

Установлено, что МХ обладают способностью к энергозависимой аккумуляции КМ, которая сопровождается активацией дыхания МХ и выходом H^+ из этих органелл. Стимулирующий эффект КМ на дыхание МХ (V_{max} , нмоль $\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{мг}$ белка) уменьшается в следующем порядке: Ca^{2+} (35,71) > Sr^{2+} (33,90) > Cd^{2+} (26,32) > Mn^{2+} (22,02) >> La^{3+} (9,04). Полученный ряд тесно коррелирует с энтальпией гидратации КМ ($r = -0,95$) и константами устойчивости их комплексов с ацетатом ($r = -0,90$) и аспарагиновой кислотой ($r = -0,84$). Следовательно, скорость энергозависимой аккумуляции КМ в МХ печени определяется энтальпией их гидратации и сродством к COO^- группам Ca^{2+} -уніпортера МХ.

Выявленный нами ингибирующий эффект КМ на протонофосфорилированное дыхание МХ увеличивается в ряду Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} (не влияют) < La^{3+} < Cd^{2+} . Аналогичный ряд образуют КМ по их ингибирующему влиянию на АДФ-стимулированное дыхание МХ: Ca^{2+} , Sr^{2+} (не влияют) < Mn^{2+} < La^{3+} < Cd^{2+} . Оба ряда тесно коррелируют ($r = 0,93-0,99$) с константами устойчивости комплексов КМ с SH-группами цистеина. Таким образом, угнетение КМ процессов окисления субстратов и окислительного фосфорилирования в МХ определяется их сродством к SH-группам макромолекул МХ.

БІЛАНС

Відомості про автора

Відомості про роботу

Відомості про видання

Відомості про розповсюдження

КМ ингибируют транспорт Ca^{2+} в МХ по конкурентному (Sr^{2+} , Mn^{2+}) или смешанному (Cd^{2+}) типу. Ингибиторные константы (K_i , мкМ) транспорта Ca^{2+} в МХ для КМ возрастают в ряду: La^{3+} (2,11), Cd^{2+} (10,36), Mn^{2+} (49,29), Sr^{2+} (66,43). Полученный ряд характеризуется тесной корреляцией с энтальпией гидратации КМ ($r = -0,78$) и константами устойчивости их комплексов с ацетатом ($r = -0,96$) и аспарагиновой кислотой ($r = -0,91$). Следовательно, в механизме транспорта Ca^{2+} в матрице МХ и его ингибирования катионами других металлов важное место занимает их дегидратация и взаимодействие с карбоксильными группами Ca^{2+} -унипортера.

Катионы Ca^{2+} и Cd^{2+} , в отличие от Sr^{2+} , Mn^{2+} и La^{3+} , индуцируют переход внутренней мембраны МХ в состояние повышенной неспецифической проницаемости. Катионы Sr^{2+} и Mn^{2+} способны конкурентно угнетать этот процесс. Вместе с тем особенности кинетики Ca^{2+} - и Cd^{2+} -индуцированного набухания МХ указывают на различие в механизмах индуцирования ими перехода внутренней мембраны МХ в состояние повышенной неспецифической проницаемости, что, вероятно, обусловлено их неодинаковым родством к COO^- и SH -группам макромолекул мембраны МХ.

Следовательно, способность КМ взаимодействовать с различными функциональными системами МХ неодинакова и определяется их физико-химическими свойствами, в частности энтальпией гидратации и родством к кислород- и серосодержащим группам биолигандов. Это может быть использовано для направленного поиска антагонистов к катионам разных металлов.

Ключевые слова: митохондрии печени, катионы металлов, дыхание, окислительное фосфорилирование, поглощение кальция, неспецифическая проницаемость мембраны.

SUMMARY

VOVKANYCH L.S. Effect of earthy and transient metals' cations on the functioning of rat liver mitochondria. - Manuscript.

Thesis for scientific degree of the candidate of biological sciences by speciality 03.00.02 - Biophysics. - The Taras Shevchenko Kyiv University, Kyiv, 1999.

The thesis are devoted to the investigation of the mechanisms of metals' cations (MC), including Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} , effect on the rat liver mitochondria (RLM) respiration, ADP-phosphorylation, Ca^{2+} -accumulation and unspecific permeability of the RLM inner membrane. It has been shown, that RLM could accumulate MC in the energy-dependent process, velocity of which depends on their affinity to COO^- groups of the RLM Ca^{2+} -uniporter. Inhibition of the RLM substrate oxidation and oxidative phosphorylation by MC is correlated with the stability constants of MC with SH^- groups of cysteine. MC inhibit RLM

Ca^{2+} uptake in competitive (Sr^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+}) and mixed (Cd^{2+}) manner. The power of inhibition is determined by the MC hydration enthalpy and their affinity to COO^- groups of Ca^{2+} -uniporter. Ca^{2+} and Cd^{2+} , but not Sr^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+} , induce RLM inner membrane unspecific permeability transition. Sr^{2+} and Mn^{2+} are competitive inhibitors of that process. Hence, ability of the MC to interact with the different RLM functional systems is unique and is determined by their physicochemical properties, especially by their hydration enthalpy and affinity to oxygen- and sulphur-containing groups of bioligands. It could be used for the direct search of antidotes to different metals' cations.

Key words: liver mitochondria, metals' cations, respiration, oxidative phosphorylation, calcium uptake, unspecific permeability of membrane.