

УДК: 576.311.347.3

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СОЛИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ДЫХАНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

А.С. ИЛЬЯСОВ, К.Р. ОЧИЛОВ

Бухарский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Бухара

ОЎИР МЕТАЛЛ ТУЗЛАРИ ИОНЛАРИНИНГ КАЛАМУШ НАФАСИ ЖИГАР МИТОХОНДРИЙЛАРИ ОКСИДЛАНИШ-ФОСФОРЛАНИШ ЖАРАЁНЛАРИГА ТАЪСИРИ

А.С. ИЛЬЯСОВ, К.Р. ОЧИЛОВ

Бухоро давлат медицина институти, Ўзбекистон Республикаси, Бухоро шаҳри

THE INFLUENCE OF IONS OF SALTS OF HEAVY METALS ON RESPIRATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION OF MITOCHONDRIA OF RAT LIVER

A.S. IL'YASOV, K.R. OCHILOV

Bukhara State Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Bukhara

Таърибада (in vitro) оғир металллар Co_2^+ ва Cd_2^+ ҳужайра нафас олиши ва митохондриядаги оксидлангиш – фосфорлаш (ОФ) жараёнларига таъсир кўрсатади. Co_2^+ ионлари ОФ жараёндан ташқари V_3 и V_4 ҳолатда митохондрия нафас олишини ингибациялайди. Cd_2^+ нинг митохондриялар нафас олиши ва ОФ жараёнларига таъсири Co_2^+ га нисбатан фарқ қилиб, Cd_2^+ кичик концентрацияларда ҳужайра митохондрияси нафас олишини яқшиласа, юқори концентрацияларда – ингибациялайди.

Калим сўзлар: оғир металл ионлари, оксидланиш-фосфорланиш, митохондрия, гепатоцитлар.

In experiments in vitro it is established, that heavy metals Co_2^+ and Cd_2^+ effectively influence breath and system of mitochondrion. Ions Co_2^+ inhibits breath mitochondrion in conditions V_3 and V_4 , separating oxidizing phosphorylation (OPh). Effect Cd_2^+ on breath and OPh mitochondrion differs from action Co_2^+ and other heavy metals. Thus, Cd_2^+ in low concentration increases breath mitochondrion, in high concentration inhibits it. The results received in the present work expand traditional representations about various mechanisms of action of heavy metals on a biopower metabolism of a cell.

Key words: Ions heavy metals, oxidative phosphorylation, mitochondrion, hepatocytes.

Актуальность. Соли тяжелых металлов присутствуют в окружающей среде и являются причиной многих хронических заболеваний человека и животных [1]. В основе токсического действия тяжелых металлов на живой организм лежит повреждение клеток и их органелл, сопровождающееся их функциональными, либо структурно-функциональными изменениями. Среди тяжелых металлов опасными для жизни и здоровья являются кадмий, кобальт, свинец, цинк, алюминий, хром и др.

Кадмий способен оказывать мутагенный и тератогенный эффекты на организм, которые приводят к незначительным разрушениям клеточного аппарата плаценты и эмбриональных тканей на ранних этапах органогенеза [2].

Увеличение гепатосоматического индекса и наличие выраженных некротических изменений в печени, является основным проявлением влияния высоких доз кадмия [3]. В труде [4] было дано объяснение, что гепатотоксическое действие кадмия, приводит к формированию значительных изменений в биохимических показателях крови

человека. В условиях хронического отравления, кадмий приносит к деструкции печени и повреждению почек, так как обладает выраженным гепатотоксическим и нефротоксическим действием [5].

Токсического действия кадмия, приводя к развитию митохондриальной дисфункции. Рост ишемических явлений, возникающих из-за повреждения эндотелиальных клеток сосудов печени, приводящих к формированию гепатоцеллюлярной травмы [6]. В экспериментальном исследовании [7], было установлено, что наибольшей чувствительностью к токсическому влиянию кадмия обладают митохондрии и эндоплазматическая сеть гепатоцитов.

Хроническое воздействие ксенобиотика приводит к формированию структурных изменений в клетках печеночной ткани, что проявляется в виде набухания и изменения формы митохондрий, а также в появлении признаков их биодegradации. Токсическое действие кадмия способствует развитию тотальной гидропической дистрофии гепатоцитов, местами переходящей в бал-

лонную дистрофию. При острой интоксикации солями кобальта обнаружено: лейкоцитоз, эритроцитоз, повышение концентрации гемоглобина в крови; при хронической: лейкопения, эритроцитоз, повышение концентрации гемоглобина. При интоксикации солями металлов выявлено разрушение мембран эритроцитов крыс [8].

В связи с вышеизложенным становится актуальным изучение конкретных механизмов влияния ионов тяжелых металлов на энергопреобразующие функции биомембран. В настоящей работе изучены влияния солей тяжелых металлов – хлористого кобальта и хлористого кадмия на дыхание и окислительное фосфорилирование (ОФ) митохондрий печени крыс в опытах *in vitro*.

Материалы и методы. Митохондрии выделяли из печени крыс массой 150-200 г. методом дифференциального центрифугирования по Шнайдеру в среде выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-хлорида, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4. Содержание белка митохондрий определяли колориметрически по биуретовому методу.

Скорость дыхания митохондрий в состояниях V₃ и V₄ измеряли при помощи полярографа ОН - 102 (Венгрия, Radelkis) с открытым платиновым электродом. Величины ДК и АДФ/О определяли по методу Чанса [5].

Исходя из того, что количество кислорода в 0,5 мл среды инкубации при 26°С составляет 250 нг - атом кислорода. В экспериментах использовали среду инкубации (СИ): сахароза - 125 мМ, KCl - 60 мМ, KH₂PO₄ - 2,5 мМ, сукцинат - 5 мМ, трис-HCl - 5 мМ, pH -7,4; добавки АДФ до конечной концентрации 0,2 мМ; концентрация белка Мх 3 мг/мл. В инкубационную среду вносили ротенон, для предотвращения накопления щавелевоуксусной кислоты, конкурентного ингибитора окисления сукцината.

Результаты и их обсуждения. При изучении действия ионов кобальта на дыхание и ОФ митохондрий в экспериментах *in vitro* (табл. 1),

показано, что ионы Co²⁺ ингибируют дыхание в метаболических состояниях V₃ и V₄. При этом снижаются показатели дыхательного контроля (ДК) и АДФ/О. Однако полное разобщение ОФ не наблюдается. Достоверное ингибирование дыхания и разобщения ОФ митохондрий отмечается и при воздействии более высоких концентраций Co²⁺ (5·10-5М - 10-4М).

Известно, что в отличие от Zn²⁺, низкие концентрации Co²⁺ не влияют на дыхательную цепь, тогда одной из причин угнетения дыхания и разобщения ОФ ионами Co²⁺, возможно, является снижение потенциала мембран в результате увеличения пассивной проницаемости для заряженных частиц мембран или изменение состояния ЦсА-чувствительной поры.

По мнению профессора К.Т. Алматова и соавт. [9] ионы Co²⁺ являются активаторами цитохром с -оксидазной и ротеноннечувствительной НАДН -оксидазной системы мембран митохондрий. Этими авторами показано, что повышение активности этих ферментов зависит от концентрации CoCl₂. Ионы Co²⁺ также активируют сукцинатоксидазные системы дыхательной цепи митохондрий. Авторы делают вывод, что присутствие ионов Co²⁺ в среде приводит к значительным изменениям в цепи переноса электронов митохондрий [10, 11].

С.М. Коротковым и соавторами [12] выявлено, что действие ионов Cd²⁺ на дыхание и ОФ Мх является своеобразным: сравнительно низкие концентрации стимулируют дыхание в состояниях V₃ и V₄, при этом коэффициенты ДК и АДФ/О незначительно снижаются.

В этих условиях высокие концентрации этого катиона ингибируют дыхание в обоих состояниях и приводят к полному разобщению ОФ со снятием механизма ДК. В опытах *in vitro* нами изучено влияние Cd²⁺ на дыхание и ОФ митохондрий печени крыс (табл. 2).

Таблица 1.

Действие ионов кобальта на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс*

Условия опыта	Скорость потребления O ₂ , нг-атом O/мин. мг. белка		ДК	АДФ/О
	V ₃	V ₄		
Контроль	74,0±1,22	19,6±0,24	3,78	2,00±0,03
Co²⁺ 1·10-5М	65,8±1,82 P<0,02	19,0±0,31 P>0,05	3,46	1,85±0,05 P<0,05
Co²⁺ 2·10-5М	58,6±2,82 P<0,01	18,4±0,24 P<0,02	3,19	1,74±0,04 P<0,01
Co²⁺ 5·10-5М	52,4±3,55 P<0,01	16,4±0,81 P<0,02	3,16	1,70±0,08 P<0,03
Co²⁺ 1·10-4М	48,0±5,18 P<0,01	14,4±1,96 P<0,05	3,3	1,62±0,03 P<0,001

Примечание*. СИ: Сахароза - 125 мМ, KCl - 60 мМ, KH₂PO₄ - 2,5 мМ, сукцинат - 5 мМ, трис-HCl - 5 мМ, pH - 7,4; добавки АДФ до конечной концентрации 200 мкМ, концентрация белка 3 мг/мл.

Действие ионов кадмия на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс (опыты in vitro)*

Условия опыта	Скорость потребления O_2 , нг-атом O /мин.мг белка		ДК	АДФ/О
	V_3	V_4		
Контроль	70,9±0,98	18,3±0,21	3,87	2,0±0,02
$Cd_2+ 5,0 \cdot 10^{-6} M$	75,8±1,13 $P<0,05$	20,1±0,40 $P<0,02$	3,77	1,9±0,02 $P<0,05$
$Cd_2+ 1,0 \cdot 10^{-5} M$	83,6±2,99 $P<0,01$	22,5±0,80 $P<0,001$	3,72	1,9±0,02 $P<0,05$
$Cd_2+ 2,0 \cdot 10^{-5} M$	23,3±3,78 $P<0,001$	14,5±0,84 $P<0,01$	1,61	1,3±0,20 $P<0,02$
$Cd_2+ 2,0 \cdot 10^{-5} M + ДТТ 400 \mu M$	46,3±4,86 $P<0,01$	20,7±0,21 $P<0,001$	2,24	1,6±0,10 $P<0,02$
$Cd_2+ 7,5 \cdot 10^{-5} M$	14,0±2,92 $P<0,001$	14,0±0,93 $P<0,01$	1,00	-

Примечание*. Среда инкубации: Сахароза - 125 мМ, KCl-60 мМ, KH_2PO_4 - 2,5 мМ, сукцинат - 5 мМ, трис-HCl-5 мМ, pH -7,4; добавки АДФ до конечной концентрации 0,2 мМ.

Ионы Cd_2+ в сравнительно низких концентрациях увеличивали показатели V_3 и V_4 , однако при этом коэффициенты ДК и АДФ/О незначительно снизились. Добавление к суспензии митохондрий Cd_2+ до конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5} M$ также вызывало одновременную стимуляцию дыхания в состояниях V_3 и V_4 , при этом величины ДК и АДФ/О были чуть ниже уровня контроля. Дальнейшее увеличение концентрации Cd_2+ в среде приводило к угнетению дыхания. При увеличении концентрации Cd_2+ до $2 \cdot 10^{-5} M$ дыхание митохондрий в состоянии V_3 угнеталось на 67%. Подавление дыхания наблюдалось и в состоянии V_4 . Вследствие отмеченного угнетения уменьшалась величина коэффициента ДК до 1,61; АДФ/О-1,3. При концентрации Cd_2+ $7,5 \cdot 10^{-5} M$ коэффициент ДК уменьшился до 1, т.е. происходило полное разобщение ОФ со снятием механизма ДК.

В наших экспериментах дитиотреитол (ДТТ) снимает эффект Cd_2+ на дыхание и систему ОФ (табл. 2). Известно, что ДТТ защищает тиоловые группы митохондриальных мембран. Можно предположить, что эффект Cd_2+ на функцию мембран митохондрий опосредован через тиоловые группы мембран.

Механизмы действия Cd_2+ на дыхание и ОФ митохондрий достаточно сложны и привлекают многих исследователей. Еще в 80 годы было показано, что Cd_2+ увеличивает проницаемость мембран митохондрий для катионов и активирует дыхание. Более высокие концентрации Cd_2+ ингибируют дыхание в присутствии разобщителей ОФ.

Действие Cd_2+ на функции митохондрий зависит от его концентрации. По-видимому, в присутствии высоких концентраций ингибируются активности сукцинатдегидрогеназы, цитохром

С - оксидазы и др. ферментов, в результате чего подавляется дыхание.

Эффект Cd_2+ на дыхание частично снимается ионами тяжелых металлов и классическим ингибитором транспорта Ca^{2+} в Мх - рутениевым красным [10], однако механизмы действия этих агентов окончательно не выяснены.

Необходимо отметить, что эффекты Cd_2+ на дыхание и ОФ Мх отличается от влияния Co_2+ . В более высоких концентрациях Co_2+ полностью не разобщает ОФ (табл. 1), в то время Cd_2+ полностью разобщает ОФ митохондрий.

Проведенными нашими исследованиями в настоящей работе установлено, что ионы Co_2+ и Cd_2+ разобщают ОФ. Однако, механизмы разобщения ОФ тяжелыми металлами окончательно не установлены. К настоящему времени установлены механизмы действия разобщителей ОФ. Все механизмы и постулаты действия разобщителей ОФ полагают, что они облегчают переход протонов (H^+) или других заряженных частиц непосредственно через мембрану митохондрий.

Двигателем же процесса образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата как раз и является градиент протонов по обе стороны мембраны Мх, не проницаемой для H^+ , поддерживаемый реакциями биологического окисления. Однако, молекулы разобщителей - протонофоров могут связать H^+ , а ионофоры какой-либо катион и переносить их через внутреннюю мембрану, в результате чего наблюдается снижение МП мембран и разобщение ОФ.

Возможно, в наших экспериментах ионы тяжелых металлов взаимодействуют с мембранами митохондрий и индуцируют пассивную их проницаемость. В результате чего наблюдается снижение мембранного потенциала и разобщение ОФ митохондрий.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* установлено, что исследуемые нами тяжелые металлы Co_2^+ и Cd_2^+ эффективно влияют на дыхание и систему ОФ митохондрий. Ионы Co_2^+ ингибируют дыхание митохондрий в состояниях V_3 и V_4 , разобщая ОФ. Эффект Cd_2^+ на дыхание и ОФ митохондрий отличается от действия Co_2^+ и других тяжелых металлов.

При этом, Cd_2^+ в низких концентрациях увеличивает дыхание митохондрий, в высоких концентрациях ингибирует его. Полученные в настоящей работе результаты расширяют традиционные представления о различных механизмах действия тяжелых металлов на биоэнергетический метаболизм клетки.

Литература:

1. Алматов К.Т., Саидходжаев Г.М., Клемешева Л.С., Иргашев М.С. Защитное действие кобальта при инактивации сукцинатоксидазы и НАДН-оксидазы дыхательной цепи митохондрий фосфолипазой A2 // Узб.биол.журн. – Ташкент, 1998. № 2. – С. 32–35.
2. Гутникова, А.Р. Возможность восстановления структуры печени при интоксикации солями тяжелых металлов / А.Р. Гутникова, И.М. Байбеков, Д.Д. Ашурова, Б.А. Саидханов, К.О. Махмудов // Медицина труда и промышленная экология, —2012. — № 6. – С. 32—35.
3. Ибрагимова К.М., Алматов К.Т. Действие ионов кобальта на дыхательной функции митохондрий // Наука, образование, техника. Международный научный журнал. – Министерство образования и культуры Кыргызской Республики, 2003. – № 1-2. – С. 104-109.
4. Орипов Ф. С., Дехканов Т. Д., Блинова С. А. Функциональная морфология апудоцитов тощей кишки кроликов при антенатальном воздействии пестицидом //Здоровье, демография, экология финно-угорских народов. – 2015. – №. 4. – С. 41-42.
5. Орипов Ф. С. Адренергические нервные структуры тощей кишки крольчат в раннем постнатальном онтогенезе //Морфология. – 2008. – Т. 133. – №. 2. – С. 100а-100а.
6. Хантурина Г.Р. Сравнительное действие солей кобальта на баланс белков и жидкости в организме крыс [Текст] // Современные наукоемкие технологии: Мат. межд. конф. (Египет, 2011) // Между народный журнал приклад. И фундамент. исследований.- 2011.- №5.- С. 61-62.
7. Adams, S.V. Cadmium exposure and cancer mortality in the Third National Health and Nutrition Examination Survey cohort // S.V. Adams, M.N. Passarelli, P.A. Newcomb // Occupational and Envi-

ronmental Medicine. — 2012. — Vol. 69. — № 2. — P. 153—156.

8. Chen, K.L. Mercuric compounds induce pancreatic islets dysfunction and apoptosis in vivo / K.L. Chen, S.H. Liu, C.C. Su // International Journal of Molecular Sciences. — 2012. — Vol. 13. — № 10. — P.12349—12366.
9. Chen, K.L. Mercuric compounds induce pancreatic islets dysfunction and apoptosis in vivo / K.L. Chen, S.H. Liu, C.C. Su // International Journal of Molecular Sciences. — 2012. — Vol. 13. — № 10. — P.12349—12366.
10. Hodgson E., Levi P.E. Pesticides: An important but underused model for the environmental health sciences // Environ. Health Persp. – 1996. – Vol. 104. – № 1. – P. 97-106.
11. Mazzei, V. Bioaccumulation of cadmium and lead and its effects on hepatopancreas morphology in three terrestrial isopod crustacean species / V. Mazzei, G. Longo, M.V. Brundo, F. Sinatra, C. Copat, C.G. Oliveri, M. Ferrante // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 2014. — Vol. 30. № 110. — P. 269—279.
12. Blum J. L. Short-term inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model / J.L. Blum, L.K. Rosenblum, G. Grunig, M.B. Beasley, J.Q. Xiong // Inhalation Toxicology. — 2014. — Vol. 26. — № 1. – P. 48—58.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СОЛИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ДЫХАНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

А.С. ИЛЬЯСОВ, К.Р. ОЧИЛОВ

Бухарский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Бухара

В экспериментах *in vitro* установлено, что тяжелые металлы Co_2^+ и Cd_2^+ эффективно влияют на дыхание и систему ОФ митохондрий. Ионы Co_2^+ ингибируют дыхание митохондрий в состояниях V_3 и V_4 , разобщая ОФ. Эффект Cd_2^+ на дыхание и ОФ митохондрий отличается от действия Co_2^+ и других тяжелых металлов. При этом, Cd_2^+ в низких концентрациях увеличивает дыхание митохондрий, в высоких концентрациях ингибирует его. Полученные в настоящей работе результаты расширяют традиционные представления о различных механизмах действия тяжелых металлов на биоэнергетический метаболизм клетки.

Ключевые слова: ионы тяжелых металлов, окисление-фосфорилирование, митохондрия, гепатоциты.