ВЛИЯНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА PRE-II НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ

Мардиева К.М.[1], Далимова С.Н.[2], Левицкая Ю.В.[3], Бурхонова М.Х.[4]

[1]*Мардиева Камила Маратовна – магистрант;*
[2]*Далимова Сурайё Нугмановна - доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой, кафедра биохимии,*
Национальный университет Узбекистана;
[3]*Левицкая Юлия Владимировна - кандидат биологических наук, доцент, заведующая лабораторией, лаборатория биохимии и биофизики,*
учебно-экспериментальный центр высоких технологий;
[4]*Бурхонова Мунира Хикматилла кизи - магистрант,*
кафедра биохимии,
Национальный университет Узбекистана,
г. Ташкент, Республика Узбекистан

Аннотация: *изменению состояния митохондриальной поры неспецифической проводимости отводится ключевая роль в процессах запуска и регуляции апоптоза, поэтому изучение механизмов открытия и регулирования состояния этих пор может иметь большое значение для поиска путей коррекции многих митохондриальных дисфункций, в том числе и связанных с возрастными изменениями. В нашей работе проведен сравнительный анализ набухания митохондрий головного мозга взрослых (9 месяцев) и зрелых крыс (12-15 месяцев). Изучено влияние супрамолекулярного комплекса PRE-II на проницаемость мембран митохондрий головного мозга крыс.*

Ключевые слова: *митохондрии, старение, неселективная Ca^{2+} зависимая пора.*

УДК 577.23

Введение.

Митохондриям отведена ключевая роль в процессах запуска и регуляции апоптоза, поэтому весьма вероятно, что нарушение функций митохондрий, наблюдаемое при старении, связано с нарушением регуляции программируемой гибели клеток.

Открытие Ca^{2+} зависимой неспецифической поры (PTP) на внутренней мембране митохондрий приводит к набуханию этих органелл, разобщению окислительного фосфорилирования, снижению синтеза молекул АТФ, что крайне пагубно может сказаться на состоянии как отдельных клеток, так и целых тканей, и органов, и в конечном итоге, организма в целом.

Изучение механизмов открытия и регулирование открытия этих пор может иметь большое значение для поиска путей коррекции многих митохондриальных дисфункций, в том числе и связанных с возрастными изменениями.

Материалы и методы исследования.

В работе использовали самцы белых беспородных крыс 3-х возрастных категорий - 9, 12, 15 месяцев.

С целью оценки влияния супрамолекулярного комплекса PRE-II на проницаемость мембран митохондрий проводились эксперименты в условиях *in vivo*, вводимый внутрибрюшинно в концентрации 30мг/кг ежедневно 1-кратно в течение 5 дней

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [1] в среде, содержащей 320 мМ сахарозы, 10 мМ трис-HCl и 0,5 мМ ЭДТА или 0.5 мМ ЭГТА, 0,2% БСА, pH 7,4. Изолированный мозг измельчали, очищали от кровеносных сосудов и разрушали в десятикратном объеме среды, с помощью стеклянного гомогенизатора. Гомогенат центрифугировали при 2000 g в течение 3 мин, осадок удаляли, а супернатант центрифугировали повторно для более полного удаления ядер и поврежденных клеток. Митохондрии осаждали центрифугированием при 12 500 g в течение 10 мин при 4°C. Осадок (1.5 мл) смешивали с 3% перколом (1 мл), далее митохондрии очищали в градиенте перкола (10–24%), осаждая несинаптические митохондрии при 31 500 g в течение 10 мин. Осадок митохондрий промывали средой выделения без ЭДТА, ЭГТА и БСА (11500 g, 10 мин) и суспендировали в той же среде

Содержание белка определяли колориметрически по биуретовому методу [2] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Набухание митохондрий крысы определяли по изменению светорассеяния, при длине волны 540 нм, на спектрофотометре Agilent Technologies-Cary 60 в открытой ячейки (объем 3 мл) с интенсивным перемешиванием при 25°C. [3] В среде инкубации, содержащей 10 мМ трис-HCl, 120 мМ KCl, 5 мМ глутамат, 1 мМ малат и 2,5 мМ KH_2PO_4.

Результаты и их обсуждение

В экспериментах *in vivo* было обнаружено, что в отсутствии Ca^{2+} в среде митохондрии старых крыс не подвержены набуханию, а чувствительность митохондриальных мембран к нагрузке Ca^{2+} зависит от возраста животного. Ca^{2+} -стимулированное набухание на 95-98% блокировалось специфическим

ингибитором PTP циклосопорином А, что свидетельствует о главной роли этой поры в процессе набухания митохондрий.

Таблица 1. Влияние PRE-II на Ca^{2+}- индуцированное набухание энергизованных митохондрий

Возраст, мес		Добавка Ca^{2+}, мкМ	Vнабух, оп.ед/мин	t полн, мин	t 1/2, мин
9	Контроль	40	0,18±0,02	6,17±0,06	4,3±0,07
	Опыт	20	0,48±0,05	1,57±0,01	0,68±0,02
12	Контроль	40	0,32±0,01	3,02±0,03	1,14±0,02
	Опыт	20	0,34±0,08	1,93±0,04	0,96±0,03
15	Контроль	20	0,88±0,03	1,56±0,01	0,76±0,01
	Опыт		0,24±0,05	4,50±0,04	1,70±0,05

Полученные результаты совпадают с результатами других исследователей, свидетельствующих о том, что при старении повышается чувствительность митохондрий к активации PTP, выражающаяся в снижении пороговой концентрации Ca^{2+}, которая инициирует открытие PTP. В нашей работе проведен сравнительный анализ набухания митохондрий головного мозга взрослых (9 месяцев) и зрелых крыс (12-15 месяцев). Нагрузка митохондрий кальцием, количество которого соответствовало пороговым концентрациям, вызывала ускорение набухания митохондрий у зрелых крыс в 4-5 раз по сравнению с митохондриями взрослых крыс. У опытных животных контролируемое набухание митохондрий вызывалось добавкой 20 мкМ Ca^{2+}, в то время как у контрольных 9- и 12-месячных животных эта концентрация ионов кальция практически не вызывала набухания. Так, у 9-месячных крыс введение PRE-II приводило к сокращению времени полного набухания практически в 4 раза, при этом значительно менялась кинетика, о чем свидетельствует резкое, более чем в 6 раз, сокращение времени полумаксимального набухания. В группе контрольных животных контролируемое набухание вызывалось только в ответ на добавление 40мкМ Ca^{2+} и скорость при этом составляла 0,18 опт.ед./мин, в то же время в группе животных, получавших PRE-II, добавление в два раза меньшей концентрации ионов кальция вызывало набухание митохондрий со скоростью 0,48 опт.ед/мин. Таким образом, в данной возрастной группе препарат PRE-II приводит к снижению резистентности митохондрий.

В группе 12-месячных контрольных животных минимальной концентрацией, вызывающей набухание, являлась 30 мкМ Ca^{2+}. При этом набухание происходило в 2 этапа. В группе животных, получавших PRE-II, скорость набухания митохондрий составляла 0,34 опт.ед/мин, то в контроле этот показатель равнялся 0,32 опт.ед/мин. Таким образом, препарат PRE-II для животных возрастной группы 9 и 12 месяцев оказывал явное негативное воздействие.

Иная картина наблюдалась в группе 15-месячных животных - в этом случае препарат PRE-II оказывал ярко выраженное стабилизирующее воздействие. В данной возрастной группе контролируемое набухание как в контрольной, так и в опытной группе, вызывалось добавлением 20 мкМ Ca^{2+}. Однако в группе опытных животных митохондрии набухали значительно медленнее и более продолжительное время: по сравнению с контрольными значениями, скорость набухания была снижена практически в 4 раза (3,7-3,85 раз), при этом как время полумаксимального, так и полного набухания было увеличено в 2,2 раза по сравнению с контрольными значениями.

Таким образом, препарат PRE-II проявляет свою активность не на начальных этапах возрастных изменений, а уже во время более позднего развития событий и может стать эффективным средством в борьбе с уже имеющимися нарушениями в проницаемости мембран митохондрий. А значит и функционирования этой ключевой органеллы.

Список литературы

1. *Sims N.R.* Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using percoll density gradient centrifugation // J. Neurochem, 1990. V. 55. P. 698–707.
2. *Gornal A.G. Bardawill C.J., David M.* Determination of serum protein by means of biuret reaction. // J. Biol. Chem., 1949. V. 177. P. 751-766.
3. *Крестинина О.В., Круглов А.Г., Грачев Д.Е., Бабурина Ю.Л., Евтодиенко Ю.В., Мошков Д.А., Санталова И.М., Азарашвили Т.С.* Возраст-зависимые изменения функций митохондрий при Ca^{2+}-индуцируемом открытии поры // Биологические мембраны, 2010. Т. 27. № 2. С. 178-183.