

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ И КОБАЛЬТА НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Очилов К.Р.,

Бухарский государственный медицинский институт.

✓ Резюме,

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 V3 и V4, 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: гепатоциты, митохондрии, кадмий, кобальт, окислительное фосфорилирование

КАДМИЙ ВА КОБАЛЬТ ИОНЛАРИНИНГ КАЛАМУШ ЖИГАР МИТОХОНДРИЯЛАРИНИНГ НАФАС ОЛИШИГА ТАЪСИРИ

Очилов К.Р.,

Бухоро давлат тиббиёт институти.

✓ Резюме,

In vitro тажрибалар оғир металллар Cd^{2+} ва Co^{2+} нафас олиш тизими ва митохондрияга таъсир кўрсатди. Co^{2+} ионлари V3 ва V4, ҳолатларида митохондриал нафас олиш ингибиция қилиб, ОФ ни ажратади. Cd^{2+} нинг нафас олиш ва митохондрияларга таъсири Co^{2+} ва бошқа оғир металлларникидан фарқ қилади. Шу билан бирга, Cd^{2+} паст концентрацияларда митохондриал нафас олиш оширади ва уни юқори концентрацияларда ингибиция қилади. Ушбу мақолада олинган натижалар оғир металлларнинг ҳужайраларнинг биоэнергетик метаболизмига таъсир қилишининг турли механизмларини анъанавий тушунчани кенгайтиради.

Калит сўзлар: гепатоцитлар, митохондриялар, кадмий, кобальт, оксидловчи фосфорланиш

EFFECT OF CADMIUM AND COBALT IONS ON RAT LIVER MITOCHONDRIA RESPIRATION

Ochilov K.R.,

Bukhara State Medical Institute named after Abu Ali Ibn Sina,
200101, Uzbekistan, Bukhara city, 1 Navai Avenue stride <http://bsmi.uz>.

✓ Resume,

In experiments *in vitro* it is established, that heavy metals Cd^{2+} and Co^{2+} effectively influence breath and system of mitochondrion. Ions Co^{2+} inhibits breath mitochondrion in conditions V3 and V4, 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.

Keywords: hepatocytes, mitochondria, cadmium, cobalt, oxidative phosphorylation

Актуальность

Материал и методы

Если тяжелых металлов присутствуют в окружающей среде и являются причиной многих хронических заболеваний человека и животных [1,2]. 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. В связи с вышеизложенным становится актуальным изучение конкретных механизмов влияния ионов тяжелых металлов на энергопреобразующие функции биомембран.

Цель исследования: В настоящей работе изучены влияния солей тяжелых металлов - хлористого кобальта и хлористого кадмия на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс в опытах *in vitro*.

Митохондрии выделяли из печени крыс массой 150-200 г. методом дифференциального центрифугирования по Шнайдеру [3] 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 [4].

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, KH_2PO_4 - 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.

Результат и обсуждения

При изучении действия ионов кобальта на дыхание и ОФ митохондрий в экспериментах *in vitro*

(табл.1), показано, что ионы Co^{2+} 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 Co^{2+} ($5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ - 10^{-4} М).

Таблица 1.

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

Условия опыта	Скорость потребления O_2 , нг-атом О/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
$\text{Co}^{2+} 1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$	65,8±1,82 P<0,02	19,0±0,31 P>0,05	3,46	1,85±0,05 P<0,05
$\text{Co}^{2+} 2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$	58,6±2,82 P<0,01	18,4±0,24 P<0,02	3,19	1,74±0,04 P<0,01
$\text{Co}^{2+} 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$	52,4±3,55 P<0,01	16,4±0,81 P<0,02	3,16	1,70±0,08 P<0,03
$\text{Co}^{2+} 1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$	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, KH_2PO_4 - 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.

Известно, что в отличие от Zn^{2+} , низкие концентрации Co^{2+} не влияют на дыхательную цепь, тогда одной из причин угнетения дыхания и разобщения ОФ ионами Co^{2+} , 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.[6,7] ионы Co^{2+} являются активаторами цитохром с -оксидазной и ротеноннечувствительной НАД.Н -оксидазной системы мембран митохондрий. Этими авторами показано, что повышение активности этих ферментов зависит от концентрации CoCl_2 . Ионы Co^{2+} также активируют сукциноксидазные системы дыхательной

цепи митохондрий. Авторы делают вывод, что присутствие ионов Co^{2+} в среде приводит к значительным изменениям в цепи переноса электронов митохондрий [6,7,8].

С.М.Коротковым и соавторами [9,10] выявлено, что действие ионов Cd^{2+} 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 Cd^{2+} на дыхание и ОФ митохондрий печени крыс (табл. 2).

Таблица 2.

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

Условия опыта	Скорость потребления O_2 , нг-атом О/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
$\text{Cd}^{2+} 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ М}$	75,8±1,13 P<0,05	20,1±0,40 P<0,02	3,77	1,9±0,02 P<0,05
$\text{Cd}^{2+} 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$	83,6±2,99 P<0,01	22,5±0,80 P<0,001	3,72	1,9±0,02 P<0,05
$\text{Cd}^{2+} 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$	23,3±3,78 P<0,001	14,5±0,84 P<0,01	1,61	1,3±0,20 P<0,02
$\text{Cd}^{2+} 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ +ДТТ400мкМ	46,3±4,86 P<0,01	20,7±0,21 P<0,001	2,24	1,6±0,10 P<0,02
$\text{Cd}^{2+} 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$	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 V3 и V4, однако при этом коэффициенты ДК и АДФ/О незначительно снизились. Добавление к суспензии митохондрий Cd^{2+} до конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М также вызывало одновременную стимуляцию дыхания в состояниях V3 и V4, при этом величины ДК и АДФ/О были чуть ниже уровня контроля. Дальнейшее увеличение концентрации Cd^{2+} в среде приводило к угнетению дыхания. При увеличением концентрации Cd^{2+} до $2 \cdot 10^{-5}$ М дыхание митохондрий в состоянии V3 угнеталось на 67%. Подавление дыхания наблюдалось и в состоянии V4. Вследствие отмеченного угнетения уменьшалась величина коэффициента ДК до 1,61; АДФ/О-1,3. При концентрации Cd^{2+} $7,5 \cdot 10^{-5}$ М 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 [11]. 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 [12], 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 [13], 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.

Выводы

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 V3 и V4, 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Borisova T. Presynaptic malfunction: The neurotoxic effects of cadmium and lead on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport // *Neurochemistry International*. - 2011. - V. 59. - № 2. - P. 272-279.
2. Akbar, M. Effect of chromium and cobalt ions on primary human lymphocytes in vitro / M. Akbar, J.M. Brewer, M.H. Grant // *Journal of Immunotoxicology*. - 2011. - Vol. 8. - № 2. - P. 140-149.
3. Шумакова, А.А. Токсичность кадмия при его совместном введении с диоксидом титана (рутил), наноструктурным диоксидом кремния и фуллеренолом // *Профилактика и клиническая медицина*. - 2015. - №1 (54). - С. 86-93.
4. Хантурина Г.Р. Токсическое действие некоторых тяжелых металлов в организме человека и // "Новые научные достижения-2011": междуна. научно-практ. конфер. (17.03 - 25.03). - София. - 2011. - С.39-41.
5. Алматов К.Т., Саидходжаев Г.М., Клемешева Л.С., Иргашев М.С. Защитное действие кобальта при инактивации сукцинатоксидазы и НАД.Н-оксидазы дыхательной цепи митохондрией фосфолипазой A2 // *Узб.биол.журн.* - Ташкент, 1998. № 2. - С. 32-35.
6. Ибрагимова К.М., Алматов К.Т. Действие ионов кобальта на дыхательную функцию митохондрий // *Наука, образование, техника. Международный научный журнал*. - Министерство образования и культуры Кыргызской Республики, 2003. - № 1-2. - С. 104-109.
7. Саидходжаев Г.М., Иргашев М.С., Клемешева Л.С., Алматов К.Т. Влияние ионов кобальта на активность полиферментных систем дыхательной цепи митохондрии печени крыс // *Узб.биол.журн.* - Ташкент, 1996. № 1-2. - С. 17-20.
8. Коротков С.М., Глазунов В.В., Розенгарт Е.В., Суворов А.А., Нестеров И.П., Хованских А.Е. Влияние гидрофильного комплекса кадмия с анабазином на энергизованные митохондрии печени крысы // *Доклады Академии наук России*. -Россия, 1996. - Т. 346. - № 4. - С. 552-554.
9. Коротков С.М., Скульский И.А. Изменение влияния Cd^{2+} на дыхание изолированных митохондрий печени крысы после их преинкубации с Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} и рутениевым красным // *Цитология*. - 1996. - Т. 38. - № 4-5. - С. 500-509.

Поступила 09.03. 2020