

ИНТЕНСИВНОСТЬ ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ФТОРИДА НАТРИЯ

Проф. И. Ю. Багмут, доц. И. Л. Колесник, доц. А. В. Титкова

Харьковская медицинская академия последипломного образования

На половозрелых крысах популяции Вистар ($N = 24$), которым ежедневно внутрижелудочно вводились водные растворы фторида натрия из расчета 20 мг/кг массы животных, из расчета 200 мг/кг LD_{50} длительностью субтоксического поступления малых доз — 1,5 месяца изучались патофизиологические механизмы фторидной интоксикации. Метаболическое состояние митохондрий после определения скорости потребления кислорода в безакцепторной среде (V_4), скорости потребления кислорода в присутствии акцептора (V_3), скорости потребления кислорода после исчерпания, добавляемого АДФ в присутствии разобщителя 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) (V_{4p}) было существенно снижено. Расчет отношения АДФ/ O_2 аналогичное по своему значению с коэффициентом фосфорилирования P/O и характеризующее сопряженность процессов окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи также определен и существенно снижен; дыхательный коэффициент (ДК) — отношение скорости поглощения кислорода в состоянии V_3 к скорости поглощения в состоянии V_4 (до ввода АДФ) и активность АТФ-гидролазных реакций как отношение V_4/V_{4p} характеризующее скорость регенерации АДФ после его фосфорилирования был снижен. Измерение АТФ-азной активности (Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы), которая рассчитывалась в мкмольях фосфата/1 мг белка за 1 ч показало снижение показателей. Фторид натрия в субтоксической дозе 20 мг/кг массы животного ($1/10 LD_{50}$) оказывает ингибирующее действие и разобщает процессы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, что раскрывает механизм фторидной (малыми дозами) экспериментальной хронической интоксикации.

Ключевые слова: фторид натрия, митохондрии, гепатоциты, крысы популяции Вистар.

Важнейшим фактором, обеспечивающим функционирование восстановительных синтезов, являются биоэнергетические процессы и связанные с ними поглощение неорганического фосфата и потребление кислорода, которые сопровождаются генерацией макроэргических субстратов в виде АТФ [2, 7]. Наши исследования монооксигеназной и редуцтазной системы печени в условиях субтоксического воздействия фторида натрия у животных обнаружили увеличение всех параметров микросомального окисления гепатоцитов белых крыс популяции Вистар, кроме цитохрома b_5 [1, 3, 11, 12]. Это позволило судить о стимуляции свободнорадикальных процессов, перекисного окисления липидов и накоплении активных форм кислорода, которые обладают высокой реакционной способностью и участвуют в окислительной деструкции биологически активных веществ и мембран.

Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Харьковской медицинской академии последипломного образования МЗ Украины и является фрагментом научно-исследовательской работы кафедры клинической патофизиологии, топографической анатомии и оперативной хирургии ХМАПО «Патофизиологические механизмы действия радиотоксинов на организм и принципы ранней диагностики и коррекции» (номер госрегистрации 0117U000589, 2017–2021 гг.).

Цель работы — изучение влияния фторида натрия в субтоксической дозе на биоэнергетические процессы в условиях эксперимента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы выполнена на половозрелых крысах популяции Вистар весом 180–200 г, которым ежедневно внутрижелудочно вводились водные растворы фторида

натрия из расчета 20 мг/кг массы животных. Длительность субтоксического поступления препарата в организм составляла 1,5 мес. При работе с животными придерживались требований “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в эксперименте и других научных целях” (Страсбург, 1986 г.), Закона Украины № 3447-IV от 21.02.2006 г. “О защите животных от жестокого обращения”.

При изучении интенсивности дыхания и окислительного фосфорилирования печень животных после декапитации перфузировали охлажденным раствором Кребс-Рингера: 1 г охлажденной ткани измельчали и гомогенизировали (стекло-тефлон) в 4 мл среды, содержащей 0,3 М сахарозы, 1мМ ЭДТА, 10 мМтрис-НСIбуфер, рН = 7,4. Оценку интенсивности дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях гепатоцитов измеряли полярографически с помощью закрытого платинового электрода Кларка [4, 7].

В реакционную среду, содержащую 200 мМ маннитола, 50 мМ сахарозы, 10 мМ KH_2PO_4 , 30 мМтрис-НСI (рН = 7,4), вносили сукцинат (8 мМ) и АДФ (250 мкмоль). По кривым потребления кислорода определяли скорость дыхания в метаболических состояниях 3 (V_3), 4 (V_4), а также V_{4P} в присутствии разобшителя 2,4-динитрофенола (ДНФ, 50 мкмоль). Скорость дыхания выражали в нмоль O_2 /мин на 1 мг белка [10].

Для оценки метаболического состояния митохондрий определяли скорость потребления кислорода в безакцепторной среде (V_4), скорость потребления кислорода в присутствии акцептора (V_3), скорость потребления кислорода после истощения, добавляемого АДФ в присутствии

разобшителя 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) (V_{4P}). Рассчитывали отношение АДФ/ O_2 , аналогичное по своему значению с коэффициентом фосфорилирования P/O и характеризующее сопряженность процессов окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи; дыхательный коэффициент (ДК) — отношение скорости поглощения кислорода в состоянии V_3 к скорости поглощения в состоянии V_4 (до ввода АДФ) и активность АТФ-гидролазных реакций как отношение V_4/V_{4P} характеризующее скорость регенерации АДФ после его фосфорилирования. В качестве субстрата окисления использовали сукцинат.

Измерение активности Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы проводилось общепринятыми методами. АТФ-азная активность рассчитывалась в мкмоль фосфата/1 мг белка за 1 час [2, 11, 13, 16].

Статистический анализ результатов проводился с помощью компьютерного пакета прикладных программ для обработки статистической информации Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что скорость окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой в положении V_4 опытной группы животных несколько снижалось в сравнении с контролем (табл. 1). Учитывая прочную связь фермента сукцинатдегидрогеназы с внутренней мембраной митохондрий, следует в таком случае полагать о нарушении структурно-функционального состояния мембраны, связанного с изменением ее физико-химических свойств — проницаемости, вязкости, заряда, гидрофобного объема, полярности и др.

Таблица 1

Метаболическое состояние митохондрий печени крыс при развитии фторидной интоксикации (1/100 LD₅₀) (нмоль• O_2 •мин⁻¹•мг⁻¹ белка), М ± м

Показатели	Контроль (n = 12)	Опыт (n = 12)
Дыхание после добавления сукцината V_4	1,96 ± 0,40	1,30 ± 0,06↓
Дыхание после добавления АДФ- V_3	6,10 ± 0,43	3,90 ± 0,52↓
Дыхание после добавления разобшителя 2,4-ДНФ- V_4 Р	7,30 ± 0,84	4,30 ± 0,25↓
Дыхательный коэффициент (ДК) — V_3/V_4 , отн. ед.	3,60 ± 0,14	2,60 ± 0,12↓
АДФ-гидролазная реакция — V_4/V_{4P}	4,28 ± 0,22	2,90 ± 0,20↓
Коэффициент фосфорилирования — адф/ O_2	2,30 ± 0,18	1,45 ± 0,07↓

Изменение физико-химических свойств мембран тесным образом сопряжено с нарушением биоэнергетических процессов. Экспериментальное изучение метаболического состояния митохондрий гепатоцитов крыс контрольной группы обнаружило достаточно высокий его уровень по всем исследуемым показателям и энергетическим состояниям [15].

Так, добавление акцептора в состоянии V_3 и дополнительно разобщителя 2,4-ДНФ в состоянии V_{4p} вызывало увеличение скорости дыхания в присутствии сукцината и АДФ, что, очевидно, связано со снижением мембранного потенциала. При этом дыхательный коэффициент, который измерялся как отношение V_3/V_{4p} в интактной группе составлял $3,60 \pm 0,14$ отн. ед, что свидетельствует о высоком уровне энергетического состояния митохондрий печени интактных животных. Воздействие фторида натрия приводило к снижению дыхания в состоянии V_3 , что отражает активность дыхательной цепи при функционировании H^+ -АДФ-синтетазы. При этом наблюдалось снижение скорости дыхания в присутствии 2,4-ДНФ, что сопровождалось снижением ДК до $2,6 \pm 0,12$ отн. ед.

Исследования показывают, что фторид натрия в опытной группе приводит к снижению фосфорилирующего окисления в митохондриях печени и увеличению доли свободного дыхания. Об этом свидетельствуют снижение интенсивности дыхания в безакцепторной среде и в третьем метаболическом состоянии (V_3) после добавления АДФ. Дыхательный коэффициент (отношение V_3/V_4) и коэффициент-фосфорилирования (АДФ/ОД) существенно снижались в опытной группе животных, что позволяет судить о разобщении дыхания и фосфорилирования [6, 8, 9, 13].

Регенерация АДФ при оценке АТФ-гидролазной реакции падала у опытных животных сравнительно с контрольной группой наблюдения. Выраженное подавление дыхания в состоянии V_3 указывает на снижение интенсивности реакций окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ, что может быть связано с изменением структуры митохондрий и их фрагментации. Исследования свидетельствуют, что фторид натрия в дозе 20 мг/кг массы животного приводит к нарушению окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания, сопровождающихся снижением продукции макроэргических субстратов в виде АТФ, используемой в восстановительных синтетических нуждах клеточного аппарата.

Приведенные результаты о нарушении метаболического состояния митохондрий гепатоцитов коррелировали с активностью их АТФ-аз (табл. 2).

Поскольку активность АТФ-аз митохондрий связывают с процессами окисления и фосфорилирования, эти данные представляют значительный и несомненный интерес в понимании структурно-метаболических механизмов формирования патогенеза фторидных интоксикаций. Согласно хемиосмотической теории сопряжения Митчелла, а также исследованиям других авторов [5, 6, 14], активация этого фермента наблюдается при увеличении протонной проницаемости митохондрий, в результате чего происходит окисление и фосфорилирование. Из этого следует, что снижение активности АТФ-аз, наблюдаемое при фторидной субтоксической интоксикации, подтверждает данные о разобщении окисления и фосфорилирования и, следовательно, снижении энергопродукции в этих условиях, а следовательно и восстановительных синтезов, направленных на устранение нарушенных звеньев обмена веществ. Исследования свидетельствуют, что

Таблица 2

Активность АТФ-аз митохондрий печени крыс в условиях формирования фторидной интоксикации (1/100 LD₅₀) (мкмольР/мг белка за 1 час)

Показатели	Группа животных, М ± m	
	Контрольная (n = 12)	Опытная (n = 12)
Mg ²⁺ -активируемая АТФ-аза	82,3 ± 1,75	56,8 ± 1,46 P < 0,05
Ca ²⁺ -активируемая АТФ-аза	67,5 ± 2,14	41,2 ± 1,89 P < 0,05

фторид натрия в субтоксической дозе 20 мг/кг массы животного оказывает ингибирующее влияние на процессы биоэнергетики, приводя к разобщению процессов тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, формирующих патогенетические механизмы фторидной экспериментальной интоксикации.

ВЫВОДЫ

Обнаружено существенное снижение интенсивности дыхания митохондрий печени крыс при развитии фторидной интоксикации длительного воздействия малых доз (1/10 LD₅₀) (нмоль•О₂•мин⁻¹•мг⁻¹ белка — в безакцепторной среде и в третьем метаболическом состоянии (V₃) после добавления АДФ, а также дыхательного коэффициента (отношение V₃/V₄) и коэффициента фосфорилирования (АДФ/ОД).

Снижение фосфорилирующего окисления и увеличение доли свободного дыхания проходило

на фоне снижения ферментативной активности Mg²⁺-активируемая АТФ-азы и Са²⁺-активируемая АТФ-азы, что подтверждает данные о разобщении окисления и фосфорилирования и ведет к снижению энергопродукции восстановительных синтезов для метаболизма.

Для понимания структурно-метаболических механизмов формирования патогенеза фторидных интоксикаций обнаружено, что фторид натрия в субтоксической дозе 20 мг/кг массы (1/10 LD₅₀) животного оказывает ингибирующее действие и разобщает процессы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, что раскрывает механизм фторидной экспериментальной хронической интоксикации.

В перспективе планируется комплексное исследование структурно-метаболических механизмов патогенеза биоэнергетического гомеостаза экспериментальных животных под воздействием фторида натрия.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Багмут І. Ю., Жуков В. І., Наконечная О. А. Структурно-функціональний стан мембран під впливом поліетиленоксидів в експерименті // Харківський медичний журнал. Теоретична та експериментальна медицина, електронне видання. Харків. 2013. № 1. С. 18–24.
2. Болдырев А. А., Кяйвярйянен Е. И., Илюха В. А. Биомембранология. Петрозаводск : КарНЦ РАН. 2006. 226 с.
3. Влияние олигоэфирмоноэпоксида и олигоэфирциклокарбоната на антиоксидантную систему и процессы детоксикации в подостром опыте / Наконечная О. А. и др. // Современный научный вестник. Белгород. 2013. № 52 (191). С. 48–55.
4. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активность / Петренко А. Ю. и др. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 9. С. 1647–1651.
5. Губский Ю. И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз. Винница : Нова книга. 2015. 360 с.
6. Денисов В. М., Рукавишников С. М., Жуков В. И. // Биохимия миокарда, поврежденного адреналином. Харьков : Оригинал. 1999. 183 с.
7. Кейтс М. Техника липидологии. М. : Мир, 1975. 322 с.
8. Коломыйцева И. К. Механизмы химической чувствительности синаптических мембран. Киев: Наукова думка. 1986. 238 с.
9. Нарушение метаболизма при развитии нейрогенных поражений сердца и влияние на них некоторых фармакологических средств / Аничков С. В. и др. // Пат. физиология и экспериментальная терапия. 1974. № 2. С. 50–51.
10. Новиков К. Н., Котелевцев С. В., Козлов Ю. П. Свободно-радикальные процессы в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды. М. : РУДН, 2011. 199 с.
11. Підгострий токсикологічний вплив нової групи синтезованих олігоєфірів на проксидантно-антиоксидантний гомеостаз білих щурів / Зайцева О. В. и др. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2014. Вип. 68. С. 286–292.
12. Подострое влияние олигоэфиров на антиокислительную активность печени у белых крыс / Багмут И. Ю. и др. // Ключевые вопросы в современной науке. 2014: материалы X международной научно-практической конференции (Болгария, София, 17–25 апреля 2014). Болгария, София: «Бял ГРАД-БГ» ООД. 2014. Т. 28. С. 80–85.
13. Северин С. Е. Механизмы действия и биологическая роль циклазной системы. Москва : Наука, 1981. 196 с.

14. Brockhuse R. M. Phospholipid structure of erythrocytes and hepatocytes // Clin. Biochem. 1974. Vol. 14, № 3. P. 157–158.

15. Coskun U., Simons K. Cellmembranes: the lipid perspective // Structure. 2011. Vol. 19 (11). P. 1543–1548.

16. Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity // Biochimica et Biophysica Acta. 2008. Vol. 1777, Iss. 10. P. 1249–1262.

ІНТЕНСИВНІСТЬ ТКАНИННОГО ДИХАННЯ ТА ОКИСНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ В МІТОХОНДРІЯХ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ФТОРИДУ НАТРІЮ

Проф. І. Ю. Багмут, доц. І. Л. Колісник, доц. А. В. Тіткова

На статевозрілих щурах популяції Вістар ($N = 24$), яким щодня внутрішньошлунково вводилися водні розчини фториду натрію із розрахунку 20 мг/кг маси тварин, з урахуванням 200 мг/кг LD_{50} , тривалістю субтоксичного надходження малих доз — 1,5 місяця вивчалися патофізіологічні механізми фторидної інтоксикації. Метаболічний стан мітохондрій після визначення швидкості споживання кисню у безакцепторному середовищі (V_4), швидкості споживання кисню в присутності акцептора (V_3), швидкості споживання кисню після виснаження АДФ, що додається в присутності роз'єднувача 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) (V_{4p}) було суттєво знижено. Розрахунок відношення АДФ/ O_2 аналогічний за своїм значенням із коефіцієнтом фосфорилування P/O який характеризує спряженість процесів окиснення і фосфорилування в дихальному ланцюзі також виразно й істотно знижений; дихальний коефіцієнт (ДК) — відношення швидкості поглинання кисню в стані V_3 до швидкості поглинання в стані V_4 (до введення АДФ) і активність АТФ-гідролітичних реакцій як відношення V_4/V_{4p} що характеризує швидкість регенерації АДФ після його фосфорилування був знижений. Вимірювання АТФ-азної активності (Ca^{2+} - і Mg^{2+} -залежної АТФ-ази), яка розраховувалася в мкмольх фосфату / 1 мг білка за 1 год показало зниження показників. Фторид натрію в субтоксичній дозі 20 мг/кг маси тварини ($1/10 LD_{50}$) інгібує і роз'єднує процеси тканинного дихання й окисного фосфорилування, що розкриває механізм фторидної (малими дозами) експериментальної хронічної інтоксикації.

Ключові слова: фторид натрію, мітохондрії, гепатоцити, щури популяції Вістар.