

УДК 576.311.347 : 591.047

БИОХИМИЯ

Т. Ю. ЛИПСКАЯ, Ю. В. СВИТКИН, А. Д. ВИНОГРАДОВ

О ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ДЛЯ КРЕАТИНА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 18 VI 1971)

В лаборатории Клингенберга ⁽¹⁾ было показано, что скелетные мышцы содержат два изозима креатинкиназы: в гиалоплазме и в митохондриях. Было предположено ⁽¹⁾, что в скелетных мышцах система креатин — креатинфосфат может участвовать в переносе богатого энергией фосфата через внутреннюю мембрану митохондрий. Однако локализация креатинкиназы в митохондриях мышц не известна. Для решения вопроса об участии системы креатин — креатинфосфат в переносе энергии через внутреннюю мембрану митохондрий мы исследовали пассивную проницаемость митохондрий скелетных мышц крысы для креатина.

Выделение митохондрий из скелетных мышц проводили по Чепелу и Перри в модификации, принятой в нашей лаборатории ⁽²⁾. Обломки клеток, ядра и миофибриллы удаляли центрифугированием при 600 *g* в течение 7 мин. Надосадочную жидкость центрифугировали 5 мин. при 2000 *g* и митохондрии осаждали из супернатанта при 9000 *g* в течение 10 мин. Осадок митохондрий дважды ополаскивали небольшим объемом среды выделения и суспендировали в среде выделения (для полярографических опытов) или в 0,2 *M* сахарозе, содержащей 0,05 *M* гистидин (рН 6,5) или трис-НСl-буфера (рН 7,2—8,4) (для измерения набухания).

Митохондрии печени крысы выделяли по Шнайдеру и Хогебуму в модификации, принятой в нашей лаборатории ⁽³⁾. Пассивную проницаемость митохондрий исследовали методом, описанным Килиландом ⁽⁴⁾. Оптическую плотность суспензии митохондрий при 520 мμ регистрировали при помощи спектрофотометра СФ-4, связанного с записывающим устройством. Проба (общий объем 3 мл) имела следующий состав: 0,0067 *M* гистидиновый (рН 6,5) или трис-НСl (рН 7,2—8,4) буфер, 0,0067 *M* сахароза, 0,065 ос *M* исследуемое вещество, $1 \cdot 10^{-6}$ *M* ротенон (в случае митохондрий печени концентрация ротенона была $3 \cdot 10^{-6}$ *M*) и 1,5 мг белка митохондрий. Белок определяли с биуретовым реактивом ⁽⁵⁾.

Окислительное фосфорилирование измеряли при комнатной температуре полярографически с вращающимся платиновым электродом ⁽⁶⁾. Проба объемом 2 мл имела следующий состав: 0,1 *M* KCl, 0,0025 *M* MgCl₂, 0,02 *M* сукцинат калия, $2,5 \cdot 10^{-7}$ *M* ротенон, 0,016 *M* креатин (там, где указано). 0,01 *M* фосфат калия и 0,02 *M* трис-НСl, рН 7,2 или 7,8, 2 мг белка митохондрий. АДФ добавляли в аэробную суспензию митохондрий до конечной концентрации $1,5 \cdot 10^{-4}$ мол/л. Содержание креатина в осадках митохондрий определяли колориметрически с α-нафтолом и диацетилем ⁽⁷⁾.

На рис. 1А представлены результаты изучения осмотического поведения суспензии митохондрий скелетных мышц в растворах KCl (непроницающая соль), (NH₄)₂HPO₄ (проницающая соль) и креатина. Видно, что изменение рН от 6,5 до 8,4 мало влияет на проницаемость митохондрий для KCl и (NH₄)₂HPO₄. Проницаемость же для креатина в этих условиях сильно меняется, резко возрастающая при защелачивании среды.

Поскольку креатинкиназная система — специфический компонент мышечной ткани, можно было думать, что проницаемость для креатина является специфическим свойством митохондрий скелетных мышц. Для того

чтобы проверить это предположение, мы провели аналогичные опыты с митохондриями, выделенными из печени. Результаты этих опытов представлены на рис. 1Б. Оказалось, что защелачивание среды инкубации практически не влияет на проницаемость мембраны митохондрий печени для креатина.

Полученные результаты могут служить указанием на существование во внутренней мембране митохондрий скелетных мышц специфического

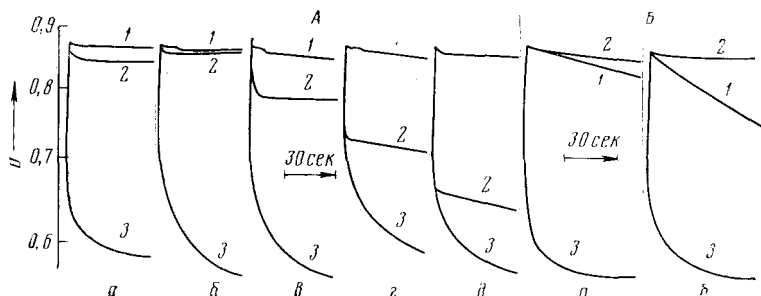


Рис. 1. Набухание митохондрий скелетных мышц (А) и печени (Б) в изотонических растворах. 1 — KCl, 2 — креатин, 3 — $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{HPO}_4$; pH для А: а — 6,5, б — 7,2, в — 7,5, г — 7,8, д — 8,4; pH — для Б: а — 6,5, б — 8,5

переносчика для креатина и на отсутствие такого переносчика в мембране митохондрий печени.

При исследованных значениях pH креатин присутствует в растворе в виде амфиона, анкиона и катиона. Преобладающей формой является амфион, однако нельзя исключить возможности проникновения через мембрану митохондрий анионной формы. Концентрация катионной формы креатина ничтожна. Повышение проницаемости мембраны митохондрий для креатина при щелочных значениях pH можно объяснить либо активацией переносчика при $\text{pH} \geq 7,5$, либо возрастанием концентрации проникающей формы, если ею служит анион креатина. Одновременная активация переносчика в последнем случае также не исключена. Примененный нами метод регистрации изменений объема митохондрий не позволяет провести кинетический анализ, необходимый для того, чтобы сделать выбор между всеми перечисленными возможностями. Однако полученные результаты показывают, что при щелочных значениях pH внутренняя мембрана митохондрий скелетных мышц становится проницаемой для креатина.

Результаты прямого определения содержания креатина в митохондриях скелетных мышц представлены ниже:

Число промываний осадка митохондрий	0	1	2
Содержание креатина, нмол. на 1 мг белка			
Скелетная мышца	40,0	9,6	5,9
Печень	—	—	0

Видно, что двукратное промывание удаляет значительную часть вещества, однако митохондрии скелетных мышц все еще содержат количество связанного креатина, соизмеримое с содержанием в них адениловых нуклеотидов. Дважды промытые митохондрии печени не содержат креатина.

Таким образом, с одной стороны, *in vitro* можно создать условия, в которых креатин свободно проникает через внутреннюю мембрану митохондрий скелетных мышц, а с другой — интактные митохондрии, выделенные из этой ткани, содержат довольно значительные количества креатина. В связи с этим можно было предполагать, что в условиях *in vitro* добавленный креатин может участвовать в системе переноса энергии. При этом можно было ожидать, что защелачивание среды инкубации приведет к уси-

лению влияния креатина на параметры окислительного фосфорилирования.

Мы исследовали влияние креатина на окислительное фосфорилирование при двух значениях рН 7,2 и 7,8. Как видно из табл. 1, в щелочной среде добавление креатина сильнее снижает коэффициент АДФ/О, чем при рН 7,2. При значениях рН, больших 7,8, коэффициент АДФ/О в отсутствие креатина падает столь значительно, что исследование влияния креатина становится невозможным.

Полученные результаты хорошо соответствуют данным о свободной проницаемости митохондриальной мембраны для креатина при щелочных значениях рН и предположению о локализации креатинкиназы в матриксе митохондрий. Однако, поскольку оптимум прямой креатинкиназной реакции лежит при рН ~ 9 ⁽⁸⁾, не исключено, что усиление влияния креатина на окислительное фосфорилирование связано с активацией креатинкиназы.

Ясно, что механизм проницаемости мембраны митохондрий скелетных мышц для креатина и участие креатинкиназной системы в переносе энергии между митохондриями и гиалоплазмой требуют более детального изучения.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
14 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Jacobs, H. W. Heldt, M. Klingenberg, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 516 (1964). ² Т. Ю. Липская, *Биохимия*, **33**, в. 4, 867 (1968). ³ Ю. Н. Лейкин, А. Д. Виноградов, *Укр. биохим. журн.*, **43**, 1, 88 (1971). ⁴ K. W. Cleland, *Nature*, **170**, 497 (1952). ⁵ A. G. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949). ⁶ А. Д. Виноградов, Автореф. кандидатской диссертации, М., 1968. ⁷ P. Eggleston, S. R. Elsdon, N. Gough, *Biochem. J.*, **37**, 526 (1943). ⁸ L. Noda, S. Kubi, H. Lardy, *J. Biol. Chem.*, **210**, 65 (1954).

Т а б л и ц а 1

Влияние креатина на коэффициент АДФ/О
митохондрий скелетных мышц

рН среды инкубации	АДФ/О		Изменение АДФ/О, %
	контроль	+ креатин (16 мМ)	
7,2	1,6	1,1	31
7,8	1,1	0,4	64