

УДК 570.8.095.17

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

И. В. ЛЕВАНДОВСКИЙ, В. В. ЛЯХОВИЧ, А. В. ПАНОВ,
Т. М. ОКСМАН, действительный член АМН СССР В. В. КОВАНОВ

ВЛИЯНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ТОКСИНА НА МЕМБРАНЫ

Нарушение проницаемости сопутствует длительной ишемии (^{2, 4}). В частности, при восстановлении кровообращения в длительно ишемизированной конечности возникает отек, степень которого находится в прямой зависимости от времени предшествующей ишемии органа. При этом из ишемизированной конечности после ее перфузии было выделено белковое вещество с молекулярным весом 12 000 водородных единиц, обладающее выраженным токсическим действием, названное ишемическим токсином (¹). Отсюда следует предположить, что возникновение отека, а следовательно нарушение проницаемости клеточных мембран, может явиться результатом непосредственного действия ишемического токсина (ИТ) на мембранные структуры митохондрий. При этом учитывали, что внутренняя мембрана митохондрий слабо проницаема к ионам H^+ и OH^- , моновалентным катионам и ряду анионов, что позволяет изучать пассивный транспорт веществ в этих органеллах. Кроме того, обладая способностью к активному перемещению ионов за счет использования энергии окисления субстратов или гидролиза АТФ, митохондрии являются удобной моделью и для изучения действия ИТ на активный перенос ионов.

Митохондрии выделялись в сахарозной среде дифференциальным центрифугированием. Кинетика изменения объема изучалась на спектрометре «Hitachi» при длине волны 520 мкм. Поглощение O_2 измерялось на полярографе LP-60 с помощью стационарного платинового электрода. Кинетика движения H^+ -ионов определялась с помощью рН-метра, соединенного с потенциометром EZ-2. Электропроводность искусственной липидной мембраны, сформированной из фосфатидилэтаноламина по способу (⁶), измерялась путем сравнения напряжения на эталонном сопротивлении и сопротивлении мембраны. Контролем являлись опыты с добавлением нетоксичной фракции перфузата с тем же молекулярным весом.

В первой серии экспериментов (рис. 1) эффект ИТ исследовался на митохондриях, инкубированных в среде NH_4NO_3 . Согласно (³), набухание митохондрий в этих средах можно вызвать разобщителями окислительно-го фосфорилирования, транспортирующими H^+ -ионы в матриксное пространство. Появление во внутреннем пространстве катиона NH_4^+ вызывало движение проникающего аниона NO_3^- и H_2O и, следовательно, увеличение объема (рис. 1а). Последующее введение в среду инкубации АТФ приводило к противоположному направленному перемещению ионов и сокращению митохондрий. При добавлении к интактным препаратам 0,8 мкг ИТ происходило быстрое набухание митохондрий. В отличие от предшествующего опыта, обработанные ИТ митохондрии теряли осмотические свойства, что свидетельствовало о появлении проводимости не только к H^+ -ионам, но и неспецифической проводимости к различным компонентам среды. Ни АТФ, ни субстраты окисления не способны были вызвать процесс сокращения митохондрий. Однако предварительная обработка последних ротеноном препятствовала развитию набухания. Тем не менее последующее добавление разобщителя приводило к такому же увеличе-

нию объема, как и у интактных препаратов. При обработке ИТ митохондрий, находящихся в среде KNO_3 , так же быстро увеличивался их объем (рис. 2), и при этом нарушались осмотические свойства при добавлении раствора KCl. Скорость набухания увеличивалась при возрастании концентрации ИТ (0,3; 0,4; 0,8 $\mu\text{г}$). Ротенон, как и в предыдущих экспериментах, блокировал повреждающий эффект ИТ, но не препятствовал развитию высокоамплитудного набухания, вызванного активным поглощением.

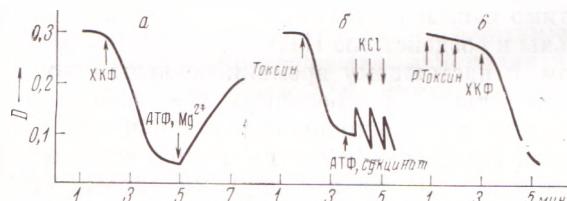


Рис. 1. Влияние ишемического токсина на изменение митохондриального объема. Среда: NH_4NO_3 100 mM, три- HCl 5 mM, pH 7,4, XKF (хлоркарбонилициандифенилгидразон) $3 \cdot 10^{-7}$ M, токсин 0,8 $\mu\text{г}$, АТФ, Mg^{2+} 5 mM, KCl 50 осмотических ммол. ротенон 2 $\mu\text{г}$ на 1 мг белка, митохондрии 2 мг белка в кювете. а – набухание и сокращение митохондрий, б – митохондрий после воздействия ишемического токсина, в – влияние ротенона (P), ишемического токсина и разобщителя XKF

ем ионов Ca^{2+} и фосфата (рис. 2e). Исследование кинетики H^+ -ионов при транспорте Ca^{2+} в митохондриях показало, что, в отличие от контрольных препаратов, митохондрии, обработанные ИТ, более быстро и при меньших концентрациях Ca^{2+} увеличиваются в объеме. Введение контрольной фракции не вызывало набухания митохондрий (рис. 2e).

Полученные данные позволяют считать, что ИТ способен модифицировать свойства внутренней митохондриальной мембранны, увеличивая ее проницаемость к ионам H^+ , а также K и Cl. Это сопровождается увеличением объема митохондрий и, согласно представлениям хемиосмотической теории сопряжения (5), должно приводить к снижению дыхательного контроля и синтеза АТФ. Действительно, при полярографическом исследовании оказалось, что добавление ИТ к интактным митохондриям,

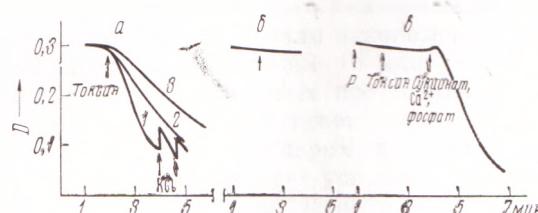


Рис. 2. Набухание митохондрий в среде, содержащей KNO_3 . Среда: KNO_3 100 mM, три- HCl 5 mM, Ca^{2+} 150 μM , фосфат 5 mM, сукцинат 5 mM. а – влияние различных доз ишемического токсина (1 – 0,8 $\mu\text{г}$, 2 – 0,4 $\mu\text{г}$, 3 – 0,3 $\mu\text{г}$), б – действие контрольной фракции, в – действие ротенона (P), Ca^{2+} , сукцинат и фосфат

окисляющим сукцинат, приводило к увеличению скорости дыхания в отрегулированном состоянии и отсутствию ответов на добавку АДФ. Эти факты подтверждают высказанное положение и дают основание для заключения о том, что эффект ИТ зависит от его первичного действия на мембрану митохондрий, снижения исходно высокого электрического сопротивления, повышения проницаемости к ионам среды и развивающееся вследствие этого разобщения.

Результаты опытов, в которых изучалось влияние ИТ на сопротивление фосфатидилэтаноламиновой мембраны, показали, что эффект ИТ на проницаемость митохондриальных мембран реализуется не через его первичное взаимодействие с фосфолипидным компонентом, так как электрические характеристики фосфолипидных мембран не изменялись. По-видимому, ИТ взаимодействует с белковым компонентом мембран митохондрий, локализованным в области I комплекса и способным связываться с ротеноном. Это подтверждается тем, что митохондрии, обработанные ротеноном, необратимо связывающимся, как известно, в области I комплекса, нечувствительны к воздействию ИТ.

Таким образом, к настоящему времени реальным может быть предположение о взаимодействии ИТ с белковым компонентом I комплекса, вызывающем увеличение их проницаемости и снижение способности к аккумуляции энергии. По аналогии с этим феноменом можно ожидать, что ИТ способен взаимодействовать и с другими типами биомембран, обладающими подходящими рецепторными группами, и вызывать увеличение их проницаемости.

Лаборатория по пересадке органов и тканей
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
2 VIII 1973

Институт клинической и
экспериментальной медицины
Сибирского филиала
Академии медицинских наук СССР
Новосибирск

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. М. Оксман, М. В. Далин, В. В. Кованов, ДАН, 199, № 4, 980 (1971).
² Л. М. Сабурова, Белковое и электролитное равновесие при реplantации конечности, Кандидатская диссертация, М., 1967. ³ G. R. Viergeley, C. D. Stoner, Biochemistry, № 9, 708 (1970). ⁴ O. Eiken, Surgical Forum, 14, 204 (1963).
⁵ P. Mitchell, Nature, 191, 144 (1961). ⁶ P. Muller, D. O. Rudin, Biochim. Biophys. Res. Commun., 26, № 4, 398 (1967).