

Академик АН УзССР Я. Х. ТУРАКУЛОВ, М. Х. ГАЙНУТДИНОВ,
Р. С. САЛИХОВ, З. З. ГИЗАТУЛЛИНА, И. И. ЛАВИНА

ДЕЙСТВИЕ АМФ И «ФАКТОРА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИЙ» НА ТРАНСПОРТ ИОНОВ Ca^{2+} В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

Хорошо известно, что накопление большого количества ионов Ca^{2+} в митохондриях может происходить только в присутствии адениннуклеотидов, причем действие адениннуклеотидов на транспорт Ca^{2+} в присутствии субстратов окисления не ингибируется олигомицином ⁽¹⁾. Известно, что АДФ и АТФ транспортируются в митохондрии вместе с ионами Ca^{2+} и входят в состав гранул трикальцийфосфата в матриксе митохондрий ⁽²⁾. Поэтому их действие можно объяснить увеличением отложения нерастворимых солей кальция в матриксе митохондрий.

В последние годы показано, что действие адениннуклеотидов на транспорт Ca^{2+} не ограничивается их влиянием на образование гранул

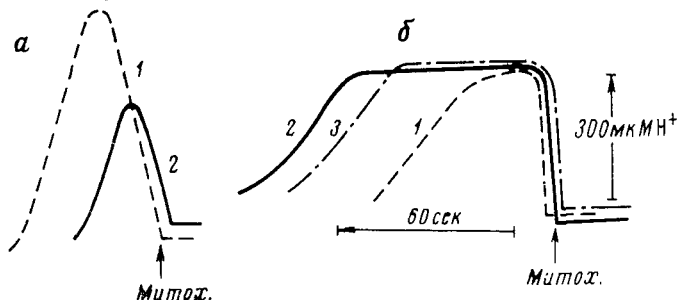


Рис. 1. Влияние АМФ на транспорт Ca^{2+} в митохондриях печени. Среда инкубации (с.п.) содержала: 0,1 М КСl; 0,01 М трис, рН 6,65; 0,5 мМ MgCl_2 ; 1 мМ фосфат, 5 мМ сукцинат; ротенон 0,5 мкг/мл. а — к с.п., содержащей 0,6 мМ CaCl_2 и 10^{-4} М АМФ. добавляли митохондрии (4,0 мг белка на 1 мл); б — с.п. содержала 0,3 мМ CaCl_2 . Митохондрии 4,5 мг белка на 1 мл, АМФ 10^{-5} М, ГМФ 0,4 мМ. 1 — контроль, 2 — добавлен АМФ, 3 — добавлен ГМФ

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Так, АДФ способен активизировать накопление Ca^{2+} в митохондриях печени и сердца в присутствии ингибиторов транслоказы нуклеотидов, атрактилозида и бонгкреата ⁽³⁾. Оказалось, что энзиматические системы, в которые переводят эндогенный АДФ и АТФ (фосфоэнолпируват + пируваткиназа либо фосфокреатин + креатинкиназа), ингибируют транспорт Ca^{2+} в митохондриях печени и сердца, хотя добавление глюкозы и гексокиназы не оказывает влияния на транспорт Ca^{2+} ⁽⁴⁾. Эти эксперименты позволили Ле-Бланку и др. постулировать, что именно АДФ специфически лимитирует поглощение ионов Ca^{2+} митохондриями ⁽⁴⁾.

Следует отметить, что упомянутые выше энзиматические системы параллельно снижению АДФ вызывают снижение эндогенного АМФ в результате аденилаткиназной реакции. Кроме того, добавление АМФ-деаминазы также ингибировало транспорт ионов Ca^{2+} в митохондриях печени ⁽⁴⁾. Тем не менее данных о влиянии АМФ на транспорт ионов Ca^{2+} в митохондриях печени в литературе нет.

Митохондрии печени крысы выделяли методом Шнейдера ⁽⁵⁾.

В митохондриях печени как поглощение, так и выход ионов Ca^{2+} из митохондрий в присутствии фосфата происходит стехиометрически в обмен на ионы H^+ . На этом основан рН-метрический метод изучения кинетики транспорта Ca^{2+} через митохондриальную мембрану. На рис. 1а показано, что при добавлении митохондрий к среде инкубации, содержащей CaCl_2 , происходит выход ионов H^+ из митохондрий в обмен на транспортируемые ионы Ca^{2+} , который сменяется связыванием ионов H^+ и «самопроизвольным» выходом ионов Ca^{2+} , когда оказывается исчерпанной «кальциевая емкость» митохондрий. В присутствии АМФ резко увеличивается максимальное количество ионов Ca^{2+} , которое может быть связано митохондриями. Когда количество ионов Ca^{2+} в среде инкубации не превышало «кальциевую емкость» митохондрий, добавление АМФ приводило к сильному увеличению промежутка времени, в течение которого митохондрии способны поддерживать градиенты ионов Ca^{2+} и H^+ на мембране (рис. 1б). Известно, что митохондрии не способны к окислительному фосфорилированию, когда ионы Ca^{2+} находятся в среде инкубации ⁽⁶⁾, поэтому увеличение «кальциевой емкости» митохондрий АМФ нельзя объяснить увеличением концентрации АТФ в результате окислительного фосфорилирования. Кроме того, эффекты АМФ не ингибируются олигомицином.

В условиях нашего эксперимента эффекты, сходные с действием АМФ, оказывал ГМФ, но даже в концентрации 400 мкмол/л действие ГМФ было слабее, чем эффект добавления $2 \cdot 10^{-5}$ М АМФ (рис. 1б).

Эффект АМФ ощутимо проявляется при очень низких концентрациях (10^{-5} М) и практически достигает максимума при концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М. Ранее нами было показано, что низкомолекулярный «фактор», который выходит из митохондрий при набухании, индуцированном тироксином или ионами Ca^{2+} , оказывает влияние на транспорт ионов Ca^{2+} в intactных митохондриях аналогично АМФ ⁽⁷⁾. Было выдвинуто предположение о том, что этот «фактор» обеспечивает взаимодействие между «поврежденными» и intactными митохондриями в условиях повреждения клетки. Известно, что содержание АМФ увеличивается в митохондриях в условиях «высокоамплитудного» набухания и АМФ выходит из митохондрий в результате увеличения неспецифической проницаемости мембраны ⁽⁸⁾. Исходя из приведенных выше данных, можно предположить, что феномен «взаимодействия» набухших и intactных митохондрий помимо ф.в.м. (фактор «взаимодействия» митохондрий) определяется АМФ из набухших митохондрий. Поэтому представляет определенный интерес исследование совместного действия АМФ и ф.в.м.

Ф.в.м. выделяли по методике, описанной ранее ⁽⁷⁾, с некоторыми модификациями. Надосадочную жидкость центрифугирования митохондрий, преинкубированных с $6 \cdot 10^{-5}$ М тироксином, подвергали нагреванию в течение 10 мин. при 90°, повторному центрифугированию, концентрировали на

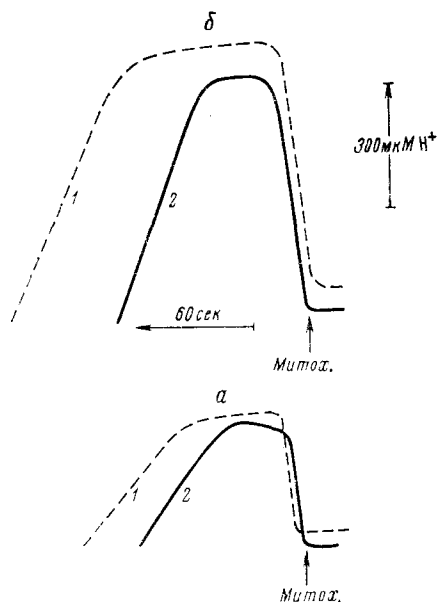


Рис. 2. Влияние ф.в.м. на транспорт Ca^{2+} в митохондриях. Сл. та же, что и на рис. 1. а — 0,3 мМ CaCl_2 , митохондрии 4,5 мг белка на 1 мл; б — 0,6 мМ CaCl_2 , $1,5 \cdot 10^{-4}$ М АМФ, митохондрии 4,5 мг белка на 1 мл, ф.в.м. 0,1 мкг белка на 1 мл. 1 — добавлен фактор, 2 — без фактора

ротормом испарителе и наносили на колонку с сефадексом G-25 (95×2,5 см), которую элюировали дистиллированной водой. Низкомолекулярный «желтый» по цвету «пик» собирали, доводили pH до 8,7 и наносили на колонку ДЭАЭ-целлюлозы (15×300 мм), которую уравнивали и элюировали 0,005 М трис, pH 8,7. Фракция, содержащая активность, смывалась с колонки 100 мл 0,005 М трис, pH 7,0.

На рис. 2а показано, что в присутствии ф.в.м. увеличивается способность митохондрий поддерживать градиенты ионов Ca^{2+} и H^{+} на мембране. Этот эффект особенно четко проявляется в присутствии 150 мкмол/л АМФ (рис. 2б). Из этого эксперимента следует, что АМФ и ф.в.м. не заменяют друг друга в действии на транспорт Ca^{2+} . Можно предположить,

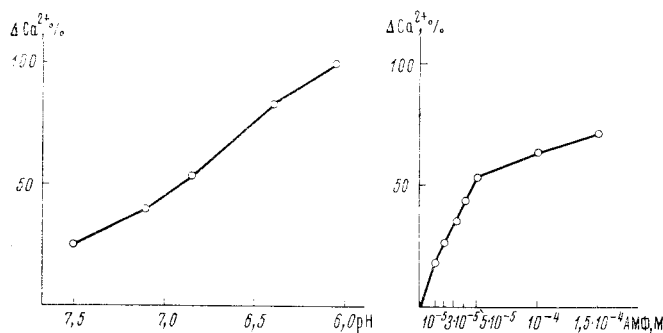


Рис. 3. Зависимость увеличения «кальцевой емкости» митохондрий в присутствии АМФ от pH с.п. и концентрации АМФ. С.п. та же, что и на рис. 1а

что для проявления максимального эффекта ф.в.м. на митохондрии необходим АМФ. По-видимому, в отсутствие экзогенного АМФ действие ф.в.м. определяется концентрацией эндогенного АМФ.

Показательно, что максимальные эффекты как АМФ, так и ф.в.м. проявляются при pH ниже 7,0. Известно, что в клетках печени неспецифически снижается pH, когда ткань попадает в неблагоприятные условия, в основном в результате усиления гликолиза⁽⁹⁾. По-видимому, именно в этих условиях имеет место «взаимодействие» между митохондриями и ф.в.м. из набухших митохондрий, совместно с АМФ оказывающее стабилизирующее действие на относительно интактные митохондрии.

Кюн и др.⁽¹⁰⁾ показали, что связанный с мембранами митохондрий Mg^{2+} необходим для поддержания структуры и функции митохондрий. Это положение находится в полном соответствии с данными об увеличении «пассивной» проницаемости мембраны при удалении Mg^{2+} , о протекторном действии ионов Mg^{2+} в условиях «высокоамплитудного» набухания митохондрий. Именно со стабилизацией комплекса мембрана — Mg^{2+} Кюн и др. связывают механизм действия ц.м.ф. (цитоплазматический метаболический фактор), влияние которого на мембрану митохондрий сходно с действием ф.в.м.⁽³⁾. Показано⁽³⁾, что для максимального появления действия ц.м.ф. необходим АДФ.

Основным различием между действием ц.м.ф. и ф.в.м. является, по-видимому, то, что их эффект проявляется в разных оптимумах pH. Эффект ц.м.ф., как правило, исследуется при pH 7,3–7,4⁽¹⁰⁾, т. е. при pH цитоплазмы интактной клетки печени, в то время как ф.в.м. действует при pH ниже 7,0. По-видимому, в норме функциональное состояние митохондрий в клетке в основном контролируется содержанием ц.м.ф. в цитоплазме, тогда как в цитоплазме «поврежденной» клетки печени, где pH значительно ниже 7,0, из набухших митохондрий выходит ф.в.м. и оказывает стабилизирующее действие на относительно интактные митохондрии.

Наши данные о действии АМФ на транспорт Ca^{2+} в митохондриях печени (рис. 3) находятся в некотором противоречии с данными ⁽¹¹⁾, где показано, что АМФ не оказывает заметного действия на транспорт ионов Ca^{2+} в митохондриях сердца ⁽¹¹⁾. Феноменология транспорта Ca^{2+} в митохондриях печени крысы сильно отличается от феноменологии транспорта Ca^{2+} в митохондриях сердца ⁽¹¹⁾. Одно из принципиальных отличий заключается, по-видимому, в отсутствии регуляции транспорта Ca^{2+} в митохондриях сердца аденозинмонофосфатом. Это доказывается как приведенными выше данными о влиянии АМФ на транспорт Ca^{2+} в митохондриях печени, так и данными ^(4, 11) о том, что АМФ и АМФ-деаминаза не изменяют параметров транспорта Ca^{2+} в митохондриях сердца, тогда как в митохондриях печени АМФ-деаминаза ингибирует поглощение ионов Ca^{2+} ⁽⁴⁾.

Институт биохимии
Академии наук УзССР
Ташкент

Поступило
22 VIII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. D. Vasington, J. V. Murphy, J. Biol. Chem., v. 237, 2670 (1962). ² E. C. Weinbach, T. von Branol, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 19, 133 (1965). ³ A. Binet, P. Volfin, Arch. Biochem. and Biophys., v. 164, 756 (1974). ⁴ P. Leblanc, M. Bourdain, H. Clauser, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 40, 754 (1970). ⁵ W. Schneider, J. Biol. Chem., v. 176, 250 (1948). ⁶ C. S. Rossi, A. L. Lehninger, J. Biol. Chem., v. 239, 3971 (1964). ⁷ Я. Х. Туракулов, М. Х. Гайнутдинов и др., ДАН, т. 220, 248 (1975). ⁸ M. Jurkowitz, K. Scott et al., Arch. Biochem. and Biophys., v. 165, 98 (1974). ⁹ L. M. Mela, L. D. Miller, Surgery, v. 72, 102 (1972). ¹⁰ E. Kun, N. Lee et al., In: Molecular Basis of Electron Transport, 1972, p. 119. ¹¹ P. Leblanc, H. Clauser, Biochim. et biophys. acta, v. 347, 87 (1974).