«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 2, 1983

УДК 577.23:577.352.36

ЗАВИСИМОСТЬ ТРАНСПОРТА K^+ И Ca^{2+}-АККУМУЛИРУЮЩЕЙ ЕМКОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ОТ Mg^{2+}

А. В. ГЮЛЬХАНДАНЯН, Т. Д. КАРАПЕТЯН

Выявлено ингибирование индуцированного ДНФ, фосфатом и Fe^{3+} выхода ионов калия из митохондрий печени крысы ионами магния. Mg^{2+} уменьшает также скорость входа K^+ в митохондрии в присутствии валиномицина, увеличивает максимальную Ca^{2+}-аккумулирующую емкость митохондрий и вызывает торможение переноса электронов по дыхательной цепи. Предполагается, что Mg^{2+} может модифицировать структуру внутренней митохондриальной мембраны.

Ключевые слова: митохондрии печени, транспорт ионов, перенос электронов.

К числу необходимых ионов в клетке относятся ионы магния, оказывающие сильное влияние на процессы окислительного фосфорилирования и транспорт ионов в митохондриях. В ряде работ был изучен эффект Mg^{2+} на энергозависимое поглощение Ca^{2+} митохондриями сердца и печени [6, 9, 10, 12, 17, 18]. Было показано, что Mg^{2+} ингибирует транспорт Ca^{2+} в митохондрии сердца [6, 10, 12], а также задерживает выток ионов кальция [12]. В то же время, судя по данным, полученным в работе Жакобуса и др. [10], он практически не влияет на способность митохондрий печени крысы забирать Ca^{2+} из среды. Известно также, что Mg^{2+} конкурентно ингибирует вход ионов калия в митохондрии как в присутствии переносчика K^+ валиномицина [13], так и без него [7, 11] и вызванный набуханием выход K^+ [8].

В настоящей работе исследована зависимость скорости выхода K^+ из митохондрий печени крысы от концентрации добавленного Mg^{2+}, влияние его на вход ионов калия и на максимальную Ca^{2+}—аккумулирующую емкость митохондрий, а также на скорость переноса электронов по дыхательной цепи.

Материал и методика. Митохондрии печени крысы выделяли стандартным методом дифференциального центрифугирования [16] в 0,3 М сахарозе и 0,01 М трис-HCl, pH 7,5; промывали и суспендировали в той же среде. Концентрации ионов в суспензии митохондрий определяли H^+-, K^+- и Ca^{2+}-селективными электродами [5] и регистрировали с помощью pH-метра, подключенного к самописцу. В случае необходимости электроды совмещались в одной ячейке. Скорость дыхания митохондрий определяли полярографически [3]; количество митохондриального белка—методом Лоури [14].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлена типичная запись влияния ионов магния на кинетику выхода K^+ из митохондрий. Выход ионов калия индуцировался или разобщителем окислительного фосфорилирования, снижающим разность потенциалов на мембране,—2,4-динитрофенолом (ДНФ), или индуктором калиевой проницаемости митохондрий фосфатом [4] совместно с ионами железа—веществом, вы-

зывающим перекисное окисление липидов [1] (рис. 1А и 1Б соответственно). Видно, что в обоих случаях добавление Mg^{2+} в значительной мере снижает скорость выхода ионов калия. Mg^{2+} в миллимолярных концентрациях задерживает выход K^+, активированный фосфатом (6 мМ) или ионами железа (2 мМ) в отдельности.

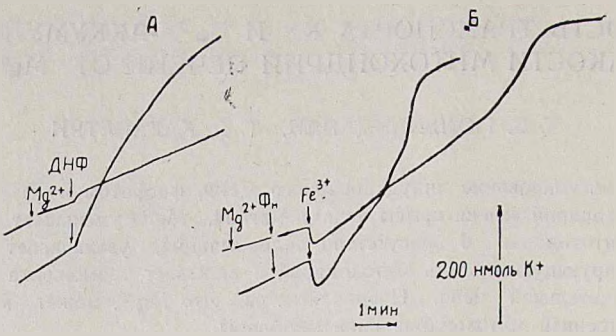

Рис. 1. Уменьшение скорости выхода K^+ из митохондрий под действием Mg^{2+}. Среда инкубации: 0,3 М сахароза, 5 мМ трис-HCl, pH 7,5. Митохондриальный белок—3,4 мг/мл. В случае «А» добавлено 4 мМ $MgCl_2$, $7{,}5 \cdot 10^{-4}$ М ДНФ, в случае «Б» добавлено 4 мМ $MgCl_2$, 6 мМ трис-фосфата, 1,5 мМ $FeCl_3$.

Известно, что сукцинат, который в большой степени восстанавливает дыхательную цепь митохондрий, ингибирует выток ионов калия [4]. В наших опытах вызванная ДНФ или фосфатом скорость выхода K^+ уменьшалась под действием 4 мМ Mg^{2+} даже в большей степени, чем при добавлении 4 мМ сукцината. Однако действие сукцината на выход K^+, индуцированного фосфатом совместно с Fe^{3+}, был гораздо более выраженным, чем действие Mg^{2+}.

Отметим, что ионы магния влияют на скорость выхода K^+ как до добавления веществ, вызывающих его выток, так и после добавок.

На рис. 2 показана зависимость скорости выхода K^+ из митохондрий, вызванного действием ДНФ, от концентрации добавленного Mg^{2+}. Скорость выхода K^+ определялась как величина, равная отношению количества ионов калия, вышедших из митохондрий в течение двух первых минут (концентрация K^+ при этом изменяется более или менее линейно), деленному на соответствующий отрезок времени и на количество белка в пробе. Из рис. 2 видно, что уже при концентрациях 0,1 мМ ионы магния ингибируют вызванный ДНФ выток K^+ из митохондрий. При концентрациях порядка 1—2 мМ скорость выхода уменьшается почти в три раза. Дальнейшее увеличение концентрации Mg^{2+} приводит лишь к незначительному изменению скорости выхода K^+.

В опытах, описанных в работе [13], вход K^+ в митохондрии в присутствии переносчика ионов калия валиномицина измерялся опосредованно: либо по скорости выделения протонов в среду, либо по скорости набухания митохондрий в присутствии проникающих анионов. В наших условиях прямые измерения изменения концентрации K^+ в среде с помощью K^+—селективного электрода также показали влияние Mg^{2+} на индуцированный валиномицином вход K^+ в митохондрии. Так, напри-

мер, 4 мМ Mg^{2+} уменьшали скорость входа K^+, по данным нескольких опытов, по сравнению с контролем в среднем на 20% (как энерге-

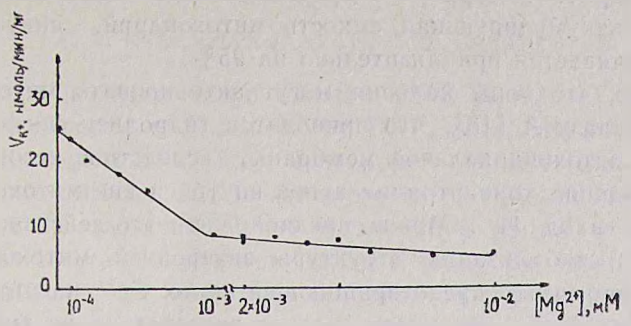

Рис. 2. Зависимость скорости выхода K^+ из митохондрий от концентрации Mg^{2+}. Среда инкубации та же. Митохондриальный белок—3,4 мг/мл. В каждом случае добавлено $7{,}5\cdot10^{-4}$ М ДНФ.

тический субстрат в среде присутствовал сукцинат—4 мМ, было добавлено 0,2 мкг/мг белка валиномицина, концентрация K^+ в среде—4 мМ).

На рис. 3 показано влияние Mg^{2+} на максимальную Ca^{2+}-аккумулирующую способность митохондрий, оцениваемую по выходу H^+ во внешнюю среду. Как видно из синхронной записи, сделанной с помощью H^+—и K^+— селективных электродов, происходит обмен Ca^{2+} на

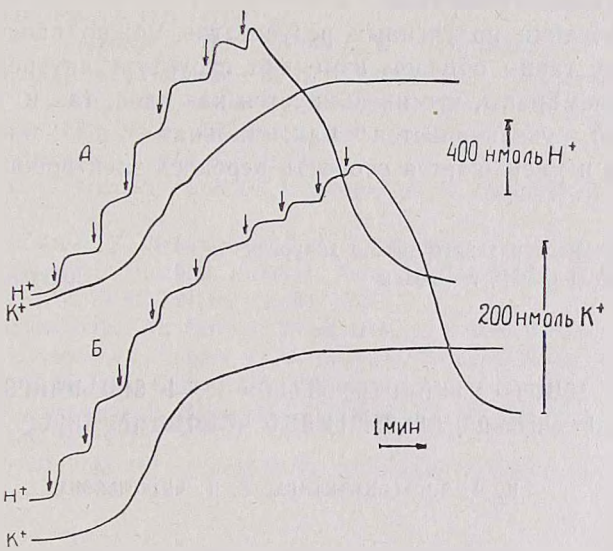

Рис. 3. Влияние Mg^{2+} на Ca^{2+}-аккумулирующую емкость митохондрий. Среда инкубации та же. Митохондриальный белок—3 мг/мл. Стрелками показаны добавки Ca^{2+} (по 150 нмоль). В случае «А» добавлено 4 мМ сукцината, в случае «Б»—4 мМ сукцината, 5 мМ $MgCl_2$.

H^+ и выходит K^+. Если в случае, представленном на рис. 3 А, в обмен на Ca^{2+} выходит 230 нмоль H^+/мг белка, то при добавлении 4 мМ Mg^{2+} (рис. 3 Б)—291 нмоль H^+/мг белка.

Аналогичные результаты были получены при использовании Ca^{2+}— селективного электрода. Без ионов магния в среде максимальная Ca^{2+}—

аккумулирующая емкость митохондрий составляла 114 нмоль Ca^{2+}/мг белка, в случае же добавления 2 мМ Mg —142 нмоль Ca^{2+} /мг белка.

Таким образом, из рис. 3 и представленных выше данных видно, что Ca^{2+} —аккумулирующая емкость митохондрий, инкубируемых с Mg^{2+}, увеличивается приблизительно на 25%.

Известно, что ионы кальция могут активировать митохондриальную фосфолипазу А [15], что приводит к гидролизу фосфолипидов и деградации митохондриальной мембраны, вследствие чего и происходит выравнивание концентрации ионов внутри и вне митохондрий: выход Ca^{2+} и вход H^+. Можно предположить, что действие Mg^{2+} заключается в стабилизации структуры внутренней митохондриальной мембраны, тем самым предотвращающей вытек Ca^{2+} из митохондрий.

Поскольку Mg^{2+} оказывает сильное воздействие на транспорт ионов, можно было предположить, что он влияет также и на перенос электронов по дыхательной цепи, тем более что в работе [2] было отмечено увеличение дыхательного контроля митохондрий в бескалиевой среде при добавлении Mg^{2+}. Наши данные показывают, что ионы магния существенным образом тормозят перенос электронов по дыхательной цепи, вызванный фосфатом и $FeCl_3$. Если фосфат- и Fe^{3+}-индуцированные скорости дыхания составляли 0,550 и 1,0 нгатО/сек/мг белка соответственно, то Mg^{2+} доводил эту скорость до 0,4 нгатО/сек/мг белка. Mg^{2+} тормозит также перенос электронов по дыхательной цепи, вызванный только фосфатом.

На основании полученных результатов можно предположить, что ионы магния таким образом изменяют структуру внутренней митохондриальной мембраны, что ингибируется как вход, так и выход K^+ из митохондрий, увеличивается максимальная Ca^{2+}-аккумулирующая способность и уменьшается скорость переноса электронов по дыхательной цепи.

Филиал Всесоюзного научного центра хирургии
АМН СССР, г. Ереван

Поступило 18.VIII 1982 г.

ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐԻ K^+-Ի ՏՐԱՆՍՊՈՐՏԻ ԵՎ Ca^{2+}-ԿԱԼԱՆՈՂ ՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ Mg^{2+}-ԻՑ

Ա. Վ. ԳՅՈՒԼԱՆԴԱՆՅԱՆ, Տ. Դ. ԿՈՐԱՊՏՅԱՆ

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ առնետի լյարդի միտոքոնդրիաներում հայտնաբերված Դնֆ-ով, ֆոսֆատով և Fe^{3+}-ով կալիումի ինդուցված իոնների դուրս մղումը նվազում է մագնեզիումի իոնների ազդեցությամբ։ Mg^{2+}-ը փոքրացնում է նաև միտոքոնդրիաների մեջ K^+-ի մուտքի արագությունը վալինոմիցինի առկայությամբ։ Մագնեզիումի իոնները մեծացնում են միտոքոնդրիաների մաքսիմալ Ca^{2+}-կլանող ունակությունը և փոքրացնում էլեկտրոնների անցման արագությունը շնչառական շղթայով։ Ենթադրվում է, որ Mg^{2+}-ը կարող է ազդել միտոքոնդրիաների ներքին մեմբրանի կառուցվածքի վրա։

THE DEPENDENCE OF K^+ TRANSPORT AND Ca^{2+}— ACCUMULATIVE ABILITY OF RAT LIVER MITOCHONDRIA ON Mg^{2+}

A. V. GYULKHANDANYAN, T. D. KARAPETYAN

Investigations have shown that the efflux of ions of K^+, found in rat liver mitochondria and induced by DNP, phosphate and Fe^{3+}, decreases under the influence of Mg^{2+} ions. Mg^{2+} decreases also the rate of K^+ influx into mitochondria in the presence of valinomycin. Magnesium ions increase the maximal Ca^{2+}— accumulative ability of mitochondria and decrease the rate of electron transport along the respiratory chain. It is supposed that Mg^{2+} may have influence on the structure of inner mitochondrial membrane.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю. А., Суслова Т. Б., Оленев В. И.* В сб.: Митохондрии. Транспорт электронов и преобразование энергии, 109, М., 1976.
2. *Кондрашова М. Н., Евтодиенко Ю. В., Кудзина Л. Ю.* В сб.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом, 93, М., 1973.
3. *Кондрашова М. Н., Николаева Л. В., Чистяков В. В., Калининченко Л. П.* В сб.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом, 50, М., 1973.
4. *Кудзина Л. Ю., Юрков И. С., Полтева Н. А., Евтодиенко Ю. В., Кондрашова М. Н.* Биохимия, *44*, 154, 1979.
5. *Матерова Е. А., Грекович А. Л., Дидина С. Е.* Электрохимия, *8*, 1829, 1972.
6. *Crompton M., Sigel E., Salzmann M., Carafoli E.* Eur J. Biochem., *69*, 429, 1976.
7. *Diwan J. J., Daze M., Richardson R., Aronson D.* Biochemistry, *18*, 2590, 1979.
8. *Garlid K. D.* J. Biol. Chem., *255*, 11273, 1980.
9. *Harris E. J.* Biochem. J., *178*, 673, 1979.
10. *Jacobus W. E., Tiozzo R., Luqli G., Lehninger A. L., Carafoli E.* J. Biol. Chem., *250*, 7863, 1975.
11. *Jung D. W., Chavez E., Brierley G. P.* Arch. Biochem. Biophys., *183*, 452, 1977.
12. *Leblanc P., Clauser H.* Biochim. Biophys. Acta, *347*, 87, 1974.
13. *Ligeti E., Fonyo A.* FEBS Letters, *79*, 33, 1977.
14. *Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randoll R. J.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.
15. *Nachbaur J., Colbeau A., Vignais P. M.* Biochim. Biophys. Acta, *274*, 426, 1972.
16. *Schneider W. C.* J. Biol. Chem., *176*, 259, 1948.
17. *Siliprandi D., Toninello A., Zoccarato F., Siliprandi N.* Biochem. Biophys. Res. Commun., *78*, 23, 1977.
18. *Zoccaratto F., Rugolo M., Siliprandi D., Siliprandi N.* Eur. J. Biochem., *114*, 195, 1981.