



Биолог. журн. Армении, 1 (64), 2012

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ТКАНЕЙ МОЗГА И ПЕЧЕНИ ЭНДЕМИЧЕСКИХ РЫБ ОЗ. СЕВАН

А.А. СИМОНЯН¹, А.С. МАРГАРЯН¹, Н.Д. СИМОНЯН²,
Р.Б. БАДАЛЯН¹, К.О. ОВНЯНЯН³

¹Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА,

²Национальный парк “Севан”,

³Институт молекулярной биологии НАН РА
anahit78.78@mail.ru

Изучали функциональную гетерогенность митохондрий тканей мозга и печени двух видов эндемических рыб оз. Севан – храмули и усача. Было показано, что полученные путем дифференциального центрифугирования печеночные и мозговые митохондриальные субфракции этих рыб функционально гетерогенны в отношении каталитической активности как Mg^{2+} -зависимой, так и общей АТФ-фосфогидролазы, и эти сдвиги подвержены определенным сезонным изменениям.

Субфракции митохондрий – АТФаза – оз. Севан – храмуля – усач

Հետազոտվել է Սևանա լճի երկու տեսակի էնդեմիկ ձկների՝ կողակի և բեղլուի ուղեղի և լյարդի միտոքոնդրիումների ենթաֆրակցիաների ֆունկցիոնալ հետերոգենությունը: Ցույց է տրվել, որ տարբերական (դիֆերենցիալ) ցենտրիֆուգման եղանակով այդ ձկների ուղեղից և լյարդից անջատված միտոքոնդրիումների ֆրակցիաները ֆունկցիոնալ հետերոգեն են ինչպես Mg^{2+} -կախյալ, այնպես էլ ընդհանուր ԱԵՖ-ֆոսֆոհիդրոլազայի ակտիվության տեսանկյունից և այդ տեղաշարժերը ենթարկվում են սեզոնային որոշակի փոփոխությունների:

Միտոքոնդրիումների ենթաֆրակցիաներ – ԱԵՖազա – Սևանա լիճ – կողակ – բեղլու

The functional heterogeneity of brain and liver mitochondria in two endemic fishes of Lake Sevan - khramulya and barbel were studied. It was shown that mitochondrial subfractions of brain and liver of these fishes obtained by differential centrifugation are functionally heterogeneous with respect to the catalytic activities of both the Mg^{2+} -dependent, and the general ATP-phosphohydrolase. These changes are subject to certain seasonal variations.

Mitochondrial subfractions – ATPase – Lake Sevan– khramulya – barbel of lake Sevan

Митохондриальную фракцию, изолированную из тканевого гомогената методом дифференциального центрифугирования, нельзя считать гомогенной. Благодаря широкому применению электронной микроскопии за последнее десятилетие достигнуты большие успехи в области морфологических и структурных особенностей ми-тохондрий различных тканей животных. Изучение структуры и метаболических про-

явлений митохондрий является особенно важным ввиду того, что эти клеточные органоиды представляют собой наиболее яркий пример структурно-функционального единства.

По нашим прежним данным, суммарная митохондриальная фракция мозга и печени птиц представляет гетерогенную массу, включая различные субфракции, которые отличаются друг от друга скоростью седиментации, дыхательной активностью, сопряженным окислительным фосфорилированием, а также АТФ-фосфогидролазной активностью [3-5]. Корреляция между структурой митохондрий, дыханием и окислительным фосфорилированием была продемонстрирована и на фракциях митохондрий из других тканей животных [2, 7, 10-12].

На основании приведенных данных и исходя из того, что в доступной нам научной литературе не нашли сведения по изучению функциональной гетерогенности митохондрий тканей рыб, в представленной работе мы поставили цель провести сравнительное исследование для выявления функциональной гетерогенности выделенных дифференциальным центрифугированием различных субфракций митохондрий тканей двух эндемических видов рыб оз. Севан - севанской храмули (*Varicorhinus capota sevangi* (Fil.)) и севанского усача (*Barbus goetschaicus Kessler*). Были исследованы сдвиги активности общей и Mg^{2+} -зависимой АТФ-фосфогидролаз в различных субфракциях митохондрий, выделенных из тканей мозга и печени рыб. Для сравнения опыты провели в весенний (май-июнь, во время нереста) и осенний (октябрь-ноябрь) сезоны года.

Материал и методика. Рыбы были выловлены в акватории озера. Для опытов использовали половозрелых особей храмули (25-26 см длины) и усача (19-21 см длины). Для получения митохондриальных субфракций мозга измельченную ткань гомогенизировали в растворе 0.25 М сахарозы – 0.02 М трис-НСl буфера, рН 7.4 (ткань: среда 1:10). Выделение ядер проводили центрифугированием при 800 g, а митохондрий (при 18000 g (время седиментации (10 мин)). Полученную суммарную митохондриальную фракцию промывали тем же раствором выделения и вновь центрифугировали. Конечный суммарный осадок назвали M_0 , суспендировали в соответствующем количестве сахара-трис-НСl буфере и использовали в опыте.

Разделение различных митохондриальных субфракций мозга из суммарной фракции проводили по следующей схеме: фракцию M_1 осаждали при 2300 g, M_2 – при 9000 g и M_3 – при 20000 g (время осаждения отдельных фракций – 5 мин). Соответствующие субфракции митохондрий суспендировали в растворе 0.25 М сахара-трис-НСl буфера (рН 7.4) и использовали в опыте.

Митохондрии печени выделяли в условиях, сходных с описанными для митохондрий мозга. При этом ядерную фракцию печени выделяли при 700 g, а митохондрии – при 9000 g, время центрифугирования – 10 мин. Митохондриальные субфракции печени разделили дифференциальным центрифугированием по следующей схеме: фракцию M_1 осаждали при 800 g, M_2 – при 2300 g, а M_3 – при 10000 g. Конечный осадок субфракций митохондрий суспендировали в среде выделения митохондрий и использовали в опыте.

Активность АТФ-фосфогидролаз в митохондриях определяли по нарастанию свободного неорганического фосфата в следующей инкубационной смеси (1 мл): 0.8 мл 0.25 М сахара-трис-НСl буфера, 0.1 мл суспензии митохондрий, соответствующей примерно 1-2 мг белка и 1 мг АТФ (производства Sigma Chem. comp.), растворенной в сахара-трис-НСl буфере и 1мМ Mg ($MgCl_2$) конечной концентрации, рН смеси – 7.4, время инкубации – 30 мин при температуре 37°C. Количество свободного H_3PO_4 определяли по Лоури и Лопес [8] в модификации Скулачева [9] и пересчитывали на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури и сотр. [6]. Количество опытов в каждом варианте – 9. Статистическую обработку полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента [1].

Результаты и обсуждение. Результаты опытов, приведенных на рис. 1, показывают, что в весеннем сезоне по сравнению с контрольными пробами (без добавления Mg), как в суммарной фракции (M_0), так и в субфракциях (M_1 - M_3) мозга севанской храмули ионы магния достоверно стимулируют АТФазную каталитическую активность. В контрольных опытах (без добавления магния) в субфракциях митохондрий активность фермента нарастает с M_1 до M_3 . При этом активность фермента в M_3 по сравнению с M_0 повышается в 2 раза. Аналогичные сдвиги в ферментативной активности АТФазы наблюдаются также при Mg^{2+} -зависимой АТФазе (рис. 1).

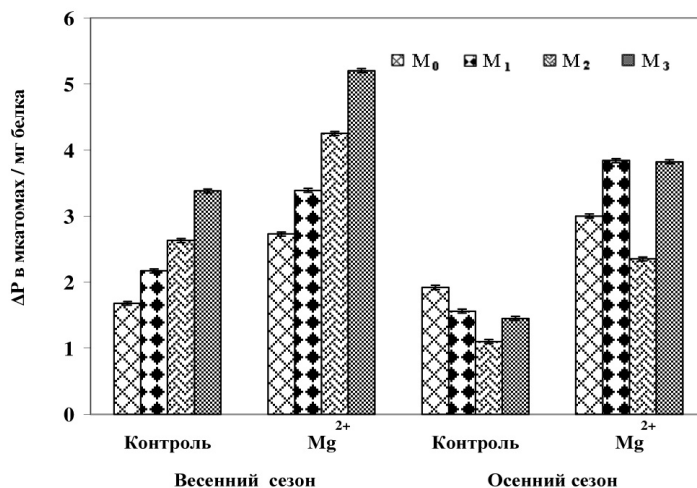


Рис. 1. АТФазная активность различных фракций митохондрий мозга севанской храмули

Иная картина активности фермента в митохондриях мозга севанской храмули выявляется в осенний сезон. Как показывают приведенные на рис. 1 данные, по сравнению с контролем в исследованных митохондриальных фракциях мозга храмули АТФазная активность достоверно низкая в осенний период. Относительно высокая активность Mg^{2+} -зависимой АТФазы по сравнению с контролем отмечается во фракциях M_1 и M_3 в то время как в M_2 активность фермента заметно подавлена.

В общих чертах аналогичная картина сдвигов каталитической активности АТФазы выявлена как в суммарной, так и в отдельных субфракциях митохондрий, выделенных из печени севанской храмули в осенний и весенний сезоны года (рис. 2).

Результаты исследования сдвигов активности АТФазы в митохондриях ткани мозга севанского усача приведены на рис. 3. Как видно из этих данных, в весенний период низкая активность фермента, по сравнению с суммарной фракцией, наблюдается в митохондриях фракции M_1 . Mg^{2+} -АТФазная активность во фракциях M_2 и M_3 превалирует по сравнению с суммарной фракцией митохондрий (34 % и 48 % соответственно).

По сравнению с весенним сезоном, в осеннем получены более низкие показатели активности Mg^{2+} -зависимой АТФазы. При этом субфракции митохондрий мозга M_2 и M_3 проявляют более высокую активность по сравнению с M_1 .

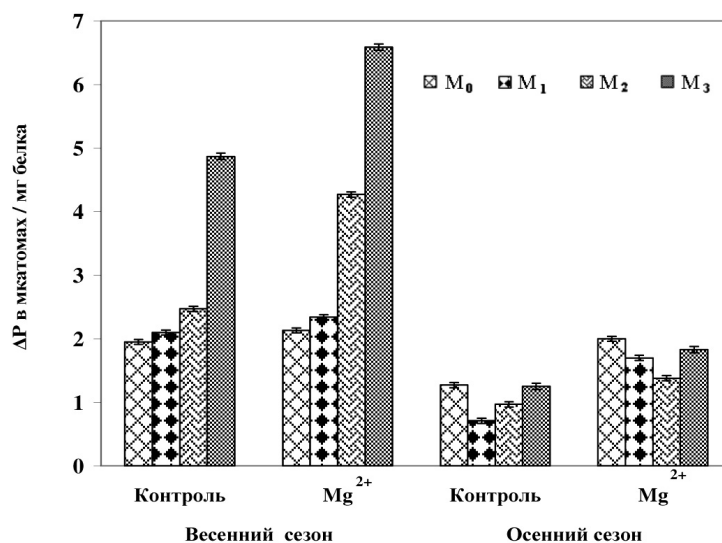


Рис. 2. АТФазная активность различных фракций митохондрий печени севанской храмули

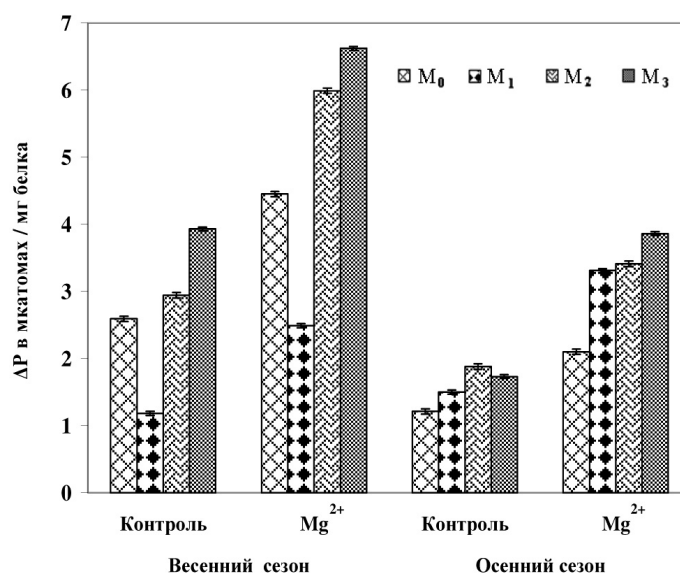


Рис. 3. АТФазная активность различных фракций митохондрий мозга севанского усача

Иная картина активности фермента наблюдается в митохондриальных фракциях печени севанского усача (рис. 4). В весеннем сезоне высокой АТФазной активностью как в контрольных пробах, так и при добавлении ионов Mg наделены митохондриальные фракции печени M₁ и M₂. По сравнению с этими фракциями в M₃ ферментативная активность заметно подавлена. Аналогичная картина в активности фермента в различных субфракциях печени усача наблюдается и в осеннем сезоне.

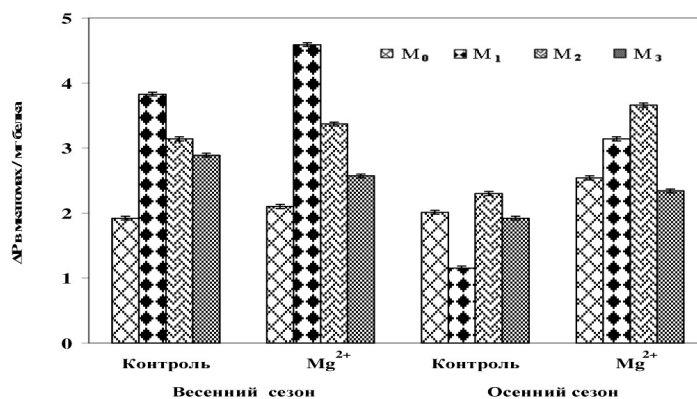


Рис. 4. АТФазная активность различных фракций митохондрий печени севанского усача

Суммируя полученные данные, можно заключить следующее: ионы Mg, по сравнению с контролем (без добавления активатора), заметно стимулируют каталитическую активность как общей, так и Mg²⁺-зависимой АТФ-фосфогидролазы в различных субфракциях митохондрий, выделенных из тканей мозга и печени севанской храмули и усача как в весеннем, так и осеннем сезонах года. При этом отмечается высокая активность фермента в весеннем сезоне по сравнению с осенним. В весеннем сезоне в мозгу храмули высокая ферментативная активность наблюдается во фракциях M₂ и M₃, в осеннем сезоне - в M₁ и M₃. Такие же сдвиги в активности фермента наблюдаются также в митохондриях печени храмули в весенний период жизни. В митохондриях мозга усача как в весеннем, так и в осеннем сезоне ферментативная активность также высока во фракциях M₂ и M₃. Одновременно из субфракций печени усача высокой активностью АТФазы наделены фракции M₁ и M₂.

Как показывают приведенные данные, полученные путем дифференциального центрифугирования, печеночные и мозговые митохондриальные фракции севанской храмули и усача функционально гетерогенны в отношении каталитической активности как Mg²⁺-зависимой, так и общей АТФ-фосфогидролазы. В то же время эти сдвиги подвергаются определенным сезонным колебаниям. Полученные результаты совпадают с нашими прежними данными [3-5] по гетерогенности различных митохондриальных субфракций, полученных дифференциальным центрифугированием из тканей млекопитающих животных и птиц, приводя к общему выводу о том, что функциональная гетерогенность различных фракций митохондрий присуща всем позвоночным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М., 1967.
2. ДеДюв Ш. Лизосомы – новый тип цитоплазматических частиц. В кн.: Структурные компоненты клетки. М., ИЛ, с. 128, 1962.
3. Симонян А.А. Особенности окислительного фосфорилирования в различных фракциях митохондрий мозга. ДАН АрмССР, 3, 167-172, 1971.
4. Симонян А.А. Функциональная гетерогенность различных фракций митохондрий печени у кур в онтогенезе. Известия с/х наук МСХ АрмССР, 3, 89-95, 1970.
5. Симонян А.А., Степанян Р.А. Функциональная гетерогенность митохондрий тканей кур в эмбриогенезе. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, 6, 231-240, 1971.

6. *Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. М.: Изд. Наука, 364 с. 1989.
7. *Diaz G., Setzu M.D., Zucca A., Isola R., Diana A., Murru R., Sogos V., Gremo F.* Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells. *J. Cell Sci.*, 112, 1077-1084, 1999.
8. *Lowry O.H., Lopez J.A.* Determination of inorganic phosphate in the presence of labelling esters. *Biol. Chem.*, 162, 421, 1946.
9. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folinphenol reagent. *Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
10. *Richter C., Schweizer M., Cossarizza A., Franceschi C.* Control of apoptosis by cellular levels of ATP. *FEBS Lett.*, 378, 107-110, 1996.
11. *Smiley S.T., Reers M., Mottola-Harshorn C., Lin M., Chen A., Smith T.W., Steele Jr. G.D., Chen L.B.* Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3671-3675, 1991.
12. *Tsujimoto Y.* Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ.*, 4, 429-434, 1997.

Поступила 19.08.2011