

На правах рукописи

Марчик

Марчик Евгений Игоревич

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ
РАЗОБЩАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2011

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биоэнергетики
ФГБОУ ВПО «Марийский государственный университет»
(г. Йошкар-Ола)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Самарцев Виктор Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Корягин Александр Сергеевич

кандидат биологических наук

Амерханов Зариф Гарриевич

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН (г. Пущино)

Защита состоится «__» _____ 2011 года в __ часов на
заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при
Нижегородском государственном университете им. Н.И.
Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр.
Гагарина, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Нижегородского государственного университета им. Н.И.
Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр.
Гагарина, д. 23.

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук



С.В. Копылова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Длинноцепочечные свободные жирные кислоты играют важную роль в окислительном метаболизме не только как субстраты окисления, но и как натуральные разобщители окислительного фосфорилирования (Skulachev, 1998; Мохова и Хайлова 2005; Di Paola and Lorusso 2006). В отсутствие ионов кальция жирные кислоты в митохондриях животных индуцируют разобщение окислительного фосфорилирования по протонофорному механизму. Важной физиологической функцией этого, так называемого «мягкого», разобщения у млекопитающих является продукция тепла для поддержания необходимой температуры тела, а также снижение в митохондриях генерации токсичных активных форм кислорода (Skulachev, 1998; Мохова и Хайлова 2005; Di Paola and Lorusso 2006). В митохондриях печени в протонофорном разобщающем действии жирных кислот принимают участие белки-переносчики метаболитов внутренней мембраны митохондрий: осуществляющие обменный транспорт ADP на ATP (ADP/ATP антипортер) и глутамата на аспаргат (аспартат/глутаматный антипортер), а также переносчик фосфата (Skulachev, 1998; Самарцев и др., 2003; Мохова и Хайлова 2005; Di Paola and Lorusso 2006).

Если протонофорное разобщающее действие жирных кислот в митохондриях имеет важное физиологическое значение, то этот процесс должен регулироваться в широких пределах. Представляет большой интерес изучение механизмов регуляции разобщающего действия жирных кислот при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров.

Известно, что степень участия ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров в разобщающем действии жирных кислот может существенно меняться. Показано, что при pH 7,0 в разобщении в большей степени участвует аспартат/глутаматный антипортер, а при pH 7,8 – ADP/ATP антипортер (Samartsev et al., 1997b). Было предположено, что жирные кислоты в анионной форме лучше доступны для ADP/ATP антипортера, а в нейтральной форме – для аспартат/глутаматного антипортера (Самарцев и др., 2001). Однако другие данные не согласуются с этой гипотезой. Так было установлено, что доля участия этих анионных переносчиков в разобщении зависит также

от длины цепи жирных кислот: при применении относительно короткоцепочечных каприновой или лауриновой кислот, в разобщении в большей степени участвует аспартат/глутаматный антипортер, чем ADP/ATP антипортер, а при применении длинноцепочечной пальмитиновой кислоты – ADP/ATP антипортер, чем аспартат/глутаматный антипортер (Самарцев и др., 1999).

Предельные жирные кислоты, имеющие различное количество атомов углерода в молекуле, сильно отличаются друг от друга по растворимости в липидах (Smith and Tanford, 1973; Sallee, 1974). Поэтому при одной и той же применяемой концентрации количество длинноцепочечных жирных кислот в гидрофобной области внутренней мембраны митохондрий будет больше, чем короткоцепочечных. Можно предположить, что степень участия ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров в разобщении будет зависеть от количества анионов жирных кислот в гидрофобной области внутренней мембраны, а не от соотношения их анионных и нейтральных форм, как предполагалось ранее (Самарцев и др., 2001). Представляет интерес исследовать действие жирных кислот не только как разобщителей окислительного фосфорилирования, но и как регуляторов этого процесса.

Согласно гипотезе В.П. Скулачева, которая в настоящее время является общепринятой, процесс разобщающего действия жирных кислот при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров можно рассматривать как состоящий из двух стадий: 1) зависимый от $\Delta\Psi$ перенос аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный; 2) зависимый от ΔpH перенос протонов жирными кислотами в противоположном направлении (Skulachev, 1998; Мохова и Хайлова, 2005). Из этого следует, что превращение ΔpH в $\Delta\Psi$ могло бы оказывать существенное влияние на разобщающее действие жирных кислот при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров, т.е. являться одним из факторов регуляции. Известно, что превращение ΔpH в $\Delta\Psi$ может быть вызвано транспортом анионов фосфата в матрикс митохондрий совместно с протоном (Nicholls, 1974; Dzбек and Korzeniewski, 2008), а также с помощью K^+/H^+ -антипортера нигерицина (Скулачев, 1989; Bernardi, 1999; Selivanov et al., 2008).

Цель работы: изучение механизмов регуляции разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени крыс при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выяснить, каким образом степень участия ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров в разобщающем действии пальмитиновой и лауриновой кислот в митохондриях печени зависит от концентрации этих разобщителей.
2. Сравнить действие различных предельных жирных кислот, отличающихся по растворимости в липидах, как индукторов и регуляторов разобщения окислительного фосфорилирования при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров в митохондриях печени.
3. Исследовать влияние превращения ΔpH в $\Delta \Psi$ на внутренней мембране митохондрий печени, индуцированного неорганическим фосфатом и нигерицином, на разобщающее действие пальмитиновой кислоты при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров.
4. Сравнить эффекты неорганического фосфата на разобщающую активность жирных кислот в митохондриях печени с действием лиганда переносчика фосфата мерсалила непроникающего через внутреннюю мембрану митохондрий.

Научная новизна работы. Впервые установлено, что свободные длинноцепочечные жирные кислоты в митохондриях печени являются не только индукторами разобщения окислительного фосфорилирования, но и регуляторами этого процесса при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров. Показано, что эффективность жирных кислот как регуляторов разобщения существенно уменьшается по мере снижения гидрофобности их молекул в ряду: пальмитиновая, миристиновая, лауриновая, каприновая и каприловая кислоты. При этих условиях эффективность тех же жирных кислот как разобщителей окислительного фосфорилирования по мере снижения гидрофобности их молекул уменьшается в меньшей степени. Впервые установлено, что одним из факторов регуляции разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров

является транспорт ионов, вызывающий превращение ΔpH в $\Delta\Psi$ на внутренней мембране.

Научно-практическое значение работы. Полученные при выполнении диссертации научные результаты имеют фундаментальное биологическое значение. Они расширяют и углубляют представления о механизмах регуляции энергетических функций митохондрий при участии свободных жирных кислот. Результаты проведенных исследований могут быть использованы в фундаментальных исследованиях в области биохимии, биофизики, биоэнергетики, а также в области экспериментальной медицины. Новые знания, полученные при выполнении диссертации, в перспективе могут быть использованы для разработки методов и средств управления термогенезом и гибелью клеток за счет изменения пассивной утечки протонов через внутреннюю мембрану митохондрий и связанной с этим генерации активных форм кислорода.

Основные научные положения, выносимые на защиту.

1. Свободные длинноцепочечные жирные кислоты являются регуляторами индуцированного ими разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях печени при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров.
2. Разобщающая активность свободных жирных кислот при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров регулируется в митохондриях печени посредством транспорта ионов, вызывающего превращение ΔpH в $\Delta\Psi$ на внутренней мембране.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены на международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2009 г); на первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010 г); на 15-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2011 г); на международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2011 г); на I Всероссийской интернет-конференции «Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2010 г); на тринадцатой постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной

научной конференции с международным участием «Глобализация. Глобалистика. Потенциалы и перспективы России в глобальном мире» (Йошкар-Ола 2010 г); на Всероссийской конференции «Актуальные проблемы экологии, биологии и химии» (Йошкар-Ола 2010 г).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 2 статьи в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, и 7 тезисов докладов региональных, всероссийских и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 128 страницах, включая список литературы, иллюстрационный материал включает 27 рисунков и 16 таблиц.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была проведена на митохондриях печени белых беспородных крыс-самцов в возрасте 9 – 12 месяцев с массой тела 220 – 260 г. Содержание, кормление и забой животных соответствовали необходимым требованиям (Западнюк и др., 1983), а также международным правилам «Guide for the Care and Use of Animals» и правилам утвержденным в системе Министерства высшего и среднего образования СССР (Приказ № 742 от 13 ноября 1984 г.).

Митохондрии выделяли из печени животных методом дифференциального центрифугирования (Маркова и др., 1999). Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ ЭГТА и 5 мМ MOPS-КОН, pH 7,4. Белок определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали БСА. Дыхание митохондрий регистрировали при температуре 25°C с помощью кислородного электрода Кларка и полярографа LP-9. В некоторых опытах использовали в качестве рабочего электрода открытый кислородный электрод, в качестве электрода сравнения – хлорсеребряный электрод (Кондрашова и др., 1973). Концентрация белка митохондрий в кислородной ячейке ~1,1 – 1,2 мг/мл. Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозу, 5 мМ янтарную кислоту, 3 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ЭГТА, 10 мМ Mops-КОН (pH 7,4).

$\Delta\Psi$ оценивали по распределению $T\Phi\Phi^+$, концентрацию которого регистрировали $T\Phi\Phi^+$ -чувствительным электродом (Kamo et al., 1979) при 25°C при постоянной аэрации в открытой ячейке объемом 2 мл. В этих экспериментах в среду инкубации дополнительно добавляли 1,6 мкМ $T\Phi\Phi^+$ и после внесения митохондрий – 20 нМ нигерицин. Величину $\Delta\Psi$ рассчитывали с учетом неэнергозависимого связывания $T\Phi\Phi^+$ с митохондриями по уравнению Нернста (Kamo et al., 1979). Объем матрикса был взят как 1 мкл/ мг белка (Brown and Brand, 1988). Способность карбоксиатрактилата или глутамата увеличивать $\Delta\Psi$ (ресопрягающий эффект) выражали в процентах и определяли как отношение величины увеличения $\Delta\Psi$, вызванное одним из этих ресопрягающих агентов, к величине уменьшения $\Delta\Psi$, вызванное пальмитиновой кислотой.

Для количественной оценки разобщающей активности жирных кислот, использовали величину стимуляции дыхания этой жирной кислотой (J_U), определяемую как разность между скоростью дыхания митохондрий (нмоль O_2 / мин на 1 мг белка) после и до добавления жирной кислоты (Самарцев и др., 2004). Величину J_U рассматривали как состоящую из трех частей – чувствительную к карбоксиатрактилату (J_A), чувствительную к глутамату (J_G) и нечувствительную ни к одному из этих реагентов (Самарцев и др., 2004). В настоящей работе использовали также суммарную величину чувствительной к карбоксиатрактилату и чувствительной к глутамату составляющих разобщения (J_{AG}), которая характеризует одновременное участие в разобщении ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров. Величину J_A определяли как разность между скоростью дыхания митохондрий (нмоль O_2 / мин на 1 мг белка) в присутствии жирной кислоты до и после добавления карбоксиатрактилата, а величину J_G – как разность между скоростью дыхания митохондрий (нмоль O_2 / мин на 1 мг белка) в присутствии жирной кислоты и карбоксиатрактилата до и после добавления глутамата. Составляющую разобщающей активности, чувствительную к карбоксиатрактилату и глутамату (J_{AG}), определяли как сумму величин J_A и J_G . Использовали также величину удельной разобщающей активности (V_U) и ее составляющие: чувствительную к карбоксиатрактилату (V_A), чувствительную к глутамату (V_G) и нечувствительную ни к одному

из этих реагентов (V_{Ins}) (Самарцев и др., 2004). Использовали также суммарную величину чувствительной к карбоксиатрактилату и чувствительной к глутамату составляющих разобщения (V_{CG}). Величины V_U , V_A , V_G и V_{AG} определяли как частное от деления величин J_U , J_A , J_G и J_{AG} соответственно на концентрацию жирной кислоты.

Полученные экспериментальные данные были обработаны методом вариационной статистики с использованием t -критерия Стьюдента, применяя пакет прикладных программ “Statistica” и “Excel”. Результаты представлены в виде средних значений средняя квадратичная ошибка среднего значения. Для оценки достоверности различий использовали уровень вероятности $P < 0,05$.

В работе использовали MOPS, Tris, жирные кислоты (пальмитиновую, миристиновую, лауриновую, каприновую и каприловую), олигомицин, янтарную кислоту, глутамат калия, аспарат калия, карбоксиатрактилат, нигерицин, мерсалил, очищенный от жирных кислот БСА (“Sigma”, США); ротенон, ЭГТА (“Serva”, Германия); хлорид тетрафенилфосфония, 2,4-динитрофенол, сахарозу и KCl (“Fluka” Германия), KOH, MgCl₂ (“Merck”, Германия). Использовали растворы жирных кислот в дважды перегнанном этаноле.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование зависимости степени участия в разобщении ADP/АТФ- и аспарат/глутаматного антипортеров от концентрации пальмитиновой и лауриновой кислот.

Известно, что подавление разобщающего действия жирных кислот карбоксиатрактилатом свидетельствует об участии в разобщении ADP/АТФ антипортера, а глутаматом (аспаратом или диэтилпирокарбонатом) – аспарат/глутаматного антипортера (Skulachev, 1998; Мохова и Хайлова, 2005; Andreyev 1989; Samartsev et al., 1997a; 1997b). Для количественной оценки степени участия ADP/АТФ- и аспарат/глутаматного антипортеров в разобщающем действии жирных применялись величины ресопрягающих эффектов карбоксиатрактилата и глутамата (или аспартата) соответственно (Samartsev et al., 1997b; Самарцев и др.,

1999). Установлено, что при повышении концентрации пальмитата с 15 до 35 мкМ ресопрягающий эффект карбоксиатрактилата увеличивается, в то время как ресопрягающий эффект глутамата уменьшается (таблица 1).

Таблица 1. Ресопрягающие эффекты карбоксиатрактилата (Катр), глутамата (Глу), их суммарный ресопрягающий эффект (Катр + Глу) и отношение этих величин (Катр/Глу) при разобщающем действии пальмитиновой кислоты (стимуляция дыхания) в концентрации 15 и 35 мкМ в митохондриях печени.

Концентрация пальмитиновой кислоты (мкМ)	Ресопрягающий эффект, %			Катр/Глу
	Катр	Глу	Катр + Глу	
15	33,2 ± 0,5	44,0 ± 1,2	77,3 ± 1,7	0,755 ± 0,017
35	43,3 ± 0,9*	27,4 ± 1,0*	70,7 ± 1,2*	1,580 ± 0,039*

Примечание. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

* Различия между эффектами пальмитиновой кислоты в концентрации 15 и 35 мкМ статистически достоверны, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Добавление пальмитиновой кислоты к митохондриям приводит к снижению $\Delta\Psi$ в большей степени при концентрации 35 мкМ, чем при концентрации 15 мкМ. Добавление карбоксиатрактилата и глутамата приводит к повышению $\Delta\Psi$ (ресопрягающий эффект), что хорошо согласуется с известными данными (Samartsev et al., 1997a). При концентрации пальмитиновой кислоты 15 мкМ глутамат действует эффективнее карбоксиатрактилата, а при повышении концентрации этого разобщителя до 35 мкМ – карбоксиатрактилат эффективнее глутамата. Ресопрягающие эффекты карбоксиатрактилата и глутамата могут быть определены по степени повышения сниженного пальмитиновой кислотой $\Delta\Psi$. Установлено, что при повышении концентрации пальмитата с 15 до 35 мкМ ресопрягающий эффект карбоксиатрактилата увеличивается, в то время как ресопрягающий эффект глутамата уменьшается.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при повышении концентрации пальмитиновой кислоты с 15 до 35 мкМ увеличивается степень участия в разобщении ADP/ATP-

антипортера и соответственно уменьшается степень участия в разобщении аспартат/глутаматного антипортера. Эти данные получены двумя независимыми методами оценки разобщающего действия жирных кислот. Во всех последующих экспериментах разобщающее действие жирных кислот оценивалось по величине стимуляции дыхания митохондрий.

В следующих экспериментах сравнивалось разобщающее действие двух жирных кислот – пальмитиновой, являющейся одной из наиболее распространенных природных жирных кислот (Wojtczak, and Schönfeld, 1993), и лауриновой. Зависимость разобщающей активности пальмитиновой кислоты (J_U) от ее концентрации в пределах от 0 до 35 мкМ близка к линейной (рис. 1, прямая 1). Зависимость разобщающей активности лауриновой кислоты (J_U) от ее концентрации в пределах от 0 до 60 мкМ также близка к линейной (рис. 1, прямая 2). По условию определения разобщающей активности (см. раздел «Методы исследования»), в отсутствие добавляемых жирных кислот эта величина равна 0. Из представленных на рис. 1 данных также следует, что тангенс угла наклона прямой при разобщении пальмитиновой кислотой на 30% превышает аналогичную величину при разобщении лауриновой кислотой. В связи с тем, что в данном случае тангенс угла наклона прямой можно рассматривать как удельную разобщающую активность жирной кислоты (V_U) (Самарцев и др., 2004), эти данные свидетельствуют о том, что разобщающая активность пальмитата на 30% превышает разобщающую активность лаурата.

Имеет место линейная зависимость величины составляющей разобщающей активности, чувствительной к карбоксиатрактилату и глутамату (J_{AG}), от концентрации пальмитиновой и лауриновой кислот (рис. 2). В этом случае тангенс угла наклона прямой можно рассматривать как составляющую удельной разобщающей активности жирной кислоты, чувствительную к карбоксиатрактилату и глутамату (V_{AG}). Пересечение экспериментальных прямых с осью ординат происходит в отличной от 0 точке. Это можно объяснить тем, что в разобщении принимают участие эндогенные жирные кислоты, действие которых карбоксиатрактилат и глутамат также подавляют. Чувствительная к карбоксиатрактилату и глутамату разобщающая

активность эндогенных жирных кислот, определенная в этой точке, имеет значение $1,0 \pm 0,2$ нмоль O_2 /мин на 1 мг белка ($n = 4$).

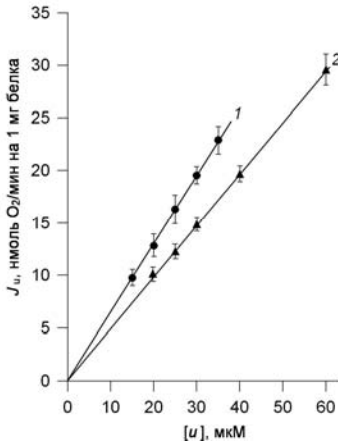


Рис. 1. Зависимость разобщающей активности (J_U) пальмитиновой (1) и лауриновой (2) кислот в митохондриях печени от концентраций ($[u]$) этих разобщителей. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

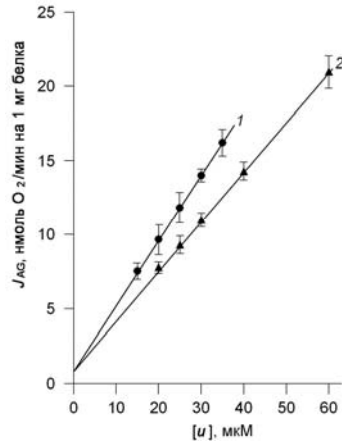


Рис. 2. Зависимость составляющей разобщающей активности чувствительной к карбоксиатрилату и глутамату (J_{AG}) пальмитиновой (1) и лауриновой (2) кислот в митохондриях печени от концентраций ($[u]$) этих разобщителей. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

Концентрацию эндогенных жирных кислот можно выразить как концентрацию пальмитиновой или лауриновой кислот ($[u_0]$). Значения этих величин можно вычислить путем деления величины разобщающей активности эндогенных жирных кислот на тангенс угла наклона экспериментально полученных прямых (рис. 2). Значение величины u_0 при разобщении пальмитиновой кислотой составляет $2,30 \pm 0,31$ мкМ ($n = 4$), а при разобщении лауриновой кислотой – $2,97 \pm 0,43$ мкМ ($n = 4$). Это различие обусловлено тем, что пальмитиновая кислота эффективнее лауриновой кислоты как разобщитель.

Для корректного определения ресопрягающих эффектов карбоксиатрактилата и глутамата при всех концентрациях жирных кислот к значениям величины J_U необходимо прибавить значение разобщающей активности эндогенных жирных кислот (J_{0U}). Это значение, определяемое по формуле $J_{0U} = V_U [u_0]$, составляет $1,5 \pm 0,1$ и $1,5 \pm 0,2$ нмоль O_2 / мин на 1 мг белка ($n = 4$) при разобщении пальмитиновой и лауриновой кислотами соответственно.

Как видно из рис. 3, при увеличении концентрации пальмитиновой кислоты ресопрягающий эффект карбоксиатрактилата повышается, а ресопрягающий эффект глутамата на ту же величину снижается. Аналогичные данные были получены при замене пальмитиновой кислоты лауриновой. Следовательно, при увеличении концентрации пальмитиновой или лауриновой кислот увеличивается степень участия в разобщении ADP/АТР-антипортера и в той же степени уменьшается доля участия в разобщении аспартат/глутаматного антипортера. В то время как степень участия в разобщении нечувствительной к карбоксиатрактилату и глутамату структуры (или структур) не зависит от концентрации жирных кислот (рис. 3).

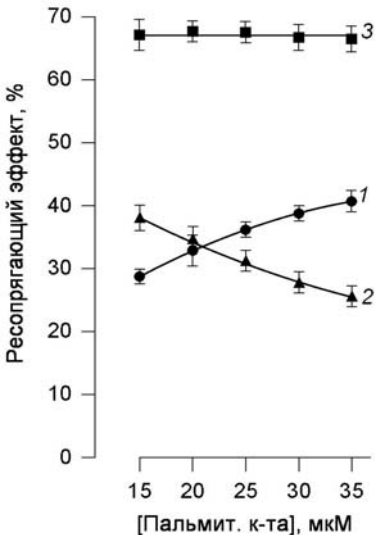


Рис. 3. Сравнение ресопрягающих эффектов карбоксиатрактилата (1), глутамата (2) и их суммарного ресопрягающего эффекта (3) при разобщающем действии в митохондриях печени пальмитиновой кислоты в различных концентрациях. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

Полученные данные можно рассматривать как свидетельство того, что жирные кислоты являются не только индукторами разобщения окислительного фосфорилирования, но и регуляторами

этого процесса при участии ADP/АТФ- и аспарат/глутаматного антипортеров.

Для сравнения эффективности действия пальмитиновой и лауриновой кислот как регуляторов разобщения была исследована зависимость величины отношения ресопрягающих эффектов карбоксиатрактилата и глутамата (это равнозначно отношению величин J_A и J_G) от концентраций этих жирных кислот. Как видно из рис. 4, имеет место линейная зависимость величины (J_A/J_G) от концентраций пальмитиновой и лауриновой кислот. Эта зависимость может быть описана эмпирическим уравнением: $J_A/J_G = K_e[u_0] + K_e[u]$. Здесь $[u]$ – концентрация жирной кислоты; $[u_0]$ – концентрация эндогенных жирных кислот, действующих как регуляторы разобщения и выраженных как концентрация пальмитиновой или лауриновой кислот; K_e – коэффициент пропорциональности, показывающий степень эффективности жирной кислоты как регулятора разобщения (коэффициент эффективности).

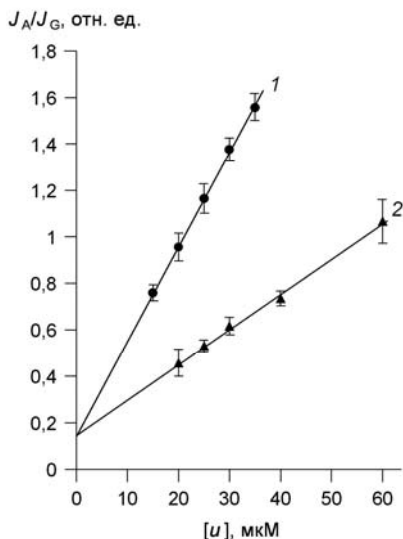


Рис. 4. Зависимость величины отношения ресопрягающих эффектов карбоксиатрактилата и глутамата (J_A/J_G) при разобщении пальмитиновой (1) и лауриновой (2) кислотами в митохондриях печени от концентрации ($[u]$) этих разобщителей. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

Жирные кислоты, являясь амфифильными соединениями, способны увеличивать плотность отрицательных зарядов на поверхности мембран митохондрий (Wojtczak and Schönfeld, 1993).

Можно предположить, что регуляторный эффект жирных кислот обусловлен действием их отрицательно заряженных карбоксильных групп на ADP/АТФ- и аспартат/глутаматный антипортеры. Как уже отмечалось выше участие этих переносчиков в разобщении заключается в переносе аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный (Skulachev, 1998; Мохова и Хайлова, 2005). По-видимому, анионы жирных кислот активируют этот процесс при участии ADP/АТФ антипортера и ингибируют – при участии аспартат/глутаматного антипортера.

3.2. Сравнение действия различных предельных жирных кислот как индукторов и регуляторов разобщения окислительного фосфорилирования при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров в митохондриях печени.

Были сравнены эффекты предельных жирных кислот: пальмитиновой, миристиновой, лауриновой, каприновой и каприловой с числом атомов углерода в молекуле 16, 14, 12, 10 и 8 соответственно. Концентрации этих жирных кислот подбирали таким образом, в которых они стимулировали дыхание митохондрий приблизительно в равной степени. Стимуляция дыхания всеми этими жирными кислотами эффективно подавляется карбоксиатрактилатом и глутаматом. Во всех случаях последующее добавление протонофорного разобщителя ДНФ приводит к дальнейшей стимуляции дыхания митохондрий приблизительно в равной степени.

Как видно из таблицы 2 в ряду предельных жирных кислот по мере уменьшения их гидрофобности коэффициент эффективности значительно уменьшается. Для количественной оценки протонофорной разобщающей активности жирной кислоты могут быть использованы величина удельной разобщающей активности (V_U) и ее составляющая чувствительная к карбоксиатрактилату и чувствительная к глутамату (V_{AG}) (Самарцев и др., 2004). Эти величины также уменьшаются по мере снижения гидрофобности их молекул. Исключение составляет миристиновая кислота разобщающая активность которой не ниже активности более гидрофобной пальмитиновой кислоты (таблица 2).

Степень снижения этих величин можно сравнить, выразив их в относительных единицах. Как видно из таблицы 2 по мере

уменьшения гидрофобности жирных кислот коэффициент эффективности снижается в большей степени, чем величины разобшающей активности.

Таблица 2. Сравнение величин коэффициента эффективности (K_e), удельной разобшающей активности (V_U) и ее составляющей чувствительной к карбоксиатрактилату и глутамату (V_{AG}) при действии предельных жирных кислот: пальмитиновой (C16), миристиновой (C14), лауриновой (C12), каприновой (C10) и каприловой (C8) на митохондрии печени.

Жирные кислоты	K_e		V_U		V_{AG}	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%
C16	40 ± 3	100 ± 7	648 ± 29	100 ± 4	483 ± 40	100 ± 8
C14	34 ± 3	85 ± 7	755 ± 49	117 ± 8	565 ± 34	117 ± 7
C12	15 ± 2	37 ± 5	501 ± 14	77 ± 2	365 ± 14	76 ± 3
C10	2,3 ± 0,3	5,7 ± 0,7	105 ± 7	16 ± 1	76,2 ± 4,9	16 ± 1
C8	0,28 ± 0,02	0,70 ± 0,05	18,0 ± 0,7	2,8 ± 0,1	12,9 ± 0,6	2,7 ± 0,1

Примечание. Абсолютные значения величин (Абс) K_e – мМ^{-1} , V_U и V_{AG} – нмоль $\text{O}_2/\text{мин}$ на 1 $\mu\text{М}$ жирной кислоты. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что эффективность жирных кислот как регуляторов разобшения существенно уменьшается по мере снижения гидрофобности их молекул в ряду: пальмитиновая, миристиновая, лауриновая, каприновая и каприловая кислоты. Можно полагать, что молекулы различных жирных кислот, находясь в гидрофобной области мембраны, одинаково эффективны как регуляторы разобшения. Поэтому различие в регуляторных эффектах связано только с лучшей растворимостью в липидах более гидрофобных жирных кислот по сравнению с менее гидрофобными. Эффективность жирных кислот как разобшителей окислительного фосфорилирования также уменьшается по мере снижения гидрофобности их молекул. В том случае если молекулы различных жирных кислот, находясь в гидрофобной области мембраны, одинаково эффективны как регуляторы разобшения их разобшающая активность будет отличаться. Наиболее высокой

активностью будет обладать самая короткоцепочечная каприловой кислоты. По мере увеличения длины ацильной цепи активность жирных кислот будет экспоненциально уменьшаться. Хорошо известно, что разобщающее действие жирных кислот связано с их перемещением с одного монослоя внутренней мембраны на другой (Skulachev, 1998; Мохова и Хайлова, 2005). Короткоцепочечные жирные кислоты по сравнению с длинноцепочечными обладают более высокой подвижностью в гидрофобной области мембраны (Hamilton, 1998). Следовательно, при одном и том же количестве молекул в гидрофобной области мембраны разобщающая активность короткоцепочечных жирных кислот выше, чем длинноцепочечных.

На рис. 5 приведена гипотетическая схема, объясняющая действие жирных кислот как индукторов и регуляторов разобщения окислительного фосфорилирования при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров. Предполагается, что эти переносчики могут существовать в двух состояниях: активном, т.е. участвующем в переносе аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя внутренней мембраны на наружный монослой, и неактивном. Взаимодействие аниона жирной кислоты с регуляторным центром ADP/АТФ антипортера переводит его из неактивного состояния в активное. В то время как взаимодействие аниона жирной кислоты с регуляторным центром аспартат/глутаматного антипортера переводит его из неактивного состояния в активное.

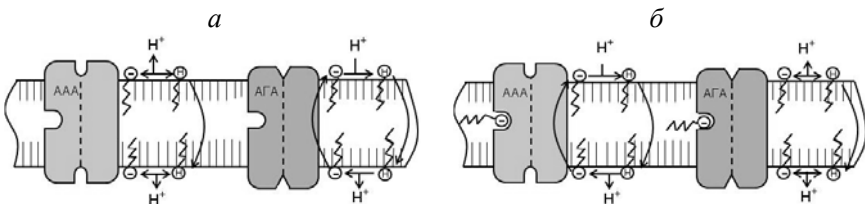


Рис. 5. Гипотетическая схема действия жирных кислот как индукторов и регуляторов разобщения окислительного фосфорилирования при участии ADP/АТФ антипортера (AAA) и аспартат/глутаматного антипортера (АГА). На рисунке *а* анионы жирных кислот не взаимодействуют с регуляторными центрами переносчиков; на рисунке *б* – взаимодействуют.

3.3. Влияние неорганического фосфата и нигерицина на разобщающее действие пальмитиновой кислоты при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров в митохондриях печени.

Хорошо известно, что анионы фосфата, транспортируясь в матрикс энергизованных митохондрий совместно с протоном, вызывают превращение ΔpH в $\Delta\Psi$ на внутренней мембране без изменения разности электрохимических потенциалов ионов водорода (Nicholls, 1974; Boss et al., 2003; Dzbek and Korzeniewski, 2008). Превращение ΔpH в $\Delta\Psi$ на внутренней мембране может быть также вызван с помощью K^+/H^+ -антипортера нигерицина (Скулачев, 1989; Bernardi, 1999; Selivanov et al., 2008). Процесс разобщающего действия жирных кислот при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров можно рассматривать как состоящий из двух стадий: 1) зависимый от $\Delta\Psi$ перенос аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный; 2) зависимый от ΔpH перенос протонов жирными кислотами в противоположном направлении. Из этого следует, что превращение ΔpH в $\Delta\Psi$ могло бы оказывать существенное влияние на разобщающее действие жирных кислот при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров, т.е. являться регуляторным параметром.

Неорганический фосфат и нигерицин не влияют на дыхание митохондрий в контролируемом состоянии, но частично ингибируют дыхание в присутствии пальмитиновой кислоты. Как в отсутствие, так и в присутствии неорганического фосфата или нигерицина добавление после пальмитиновой кислоты карбоксиатрактилата и аспартата приводит к ингибированию дыхания. Внесение после аспартата протонофорного разобщителя ДНФ приводит к стимуляции дыхания в равной степени как в отсутствие, так и в присутствии неорганического фосфата или нигерицина. Это свидетельствует о том, что неорганический фосфат и нигерицин не оказывают влияния на транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий.

На рис. 6 приведены результаты исследования влияния фосфата на удельную разобщающую активность пальмитиновой кислоты (V_U) и на ее составляющие: чувствительную к карбоксиатрактилату (V_A) и чувствительную к аспартату (V_G). Как

видно из рис. 6, неорганический фосфат существенно снижает V_U (на 34%). Величину V_A неорганический фосфат снижает на 49%, а величину V_G – на 47% (рис. 6). При аналогичных условиях нигерицин снижает V_U на 30%, V_A на 55%, а V_G на 51%.

Таким образом, проведенные исследования показали, что добавление к митохондриям печени неорганического фосфата или нигерицина вызывает существенное ингибирование разобщающей активности пальмитиновой кислоты при участии ADP/АТФ- и аспаратат/глутаматного антипортеров. В связи с тем, что транспорт ионов фосфата в матрикс митохондрий, а также индукция нигерицином транспорта ионов калия из матрикса в межмембранное пространство в обмен на транспорт протонов в противоположном направлении вызывает превращение ΔpH в $\Delta\Psi$, полученные данные можно рассматривать как свидетельство того, что одним из факторов регуляции разобщающего действия жирных кислот при участии ADP/АТФ- и аспаратат/глутаматного антипортеров является транспорт ионов вызывающий превращение ΔpH в $\Delta\Psi$ на внутренней мембране.

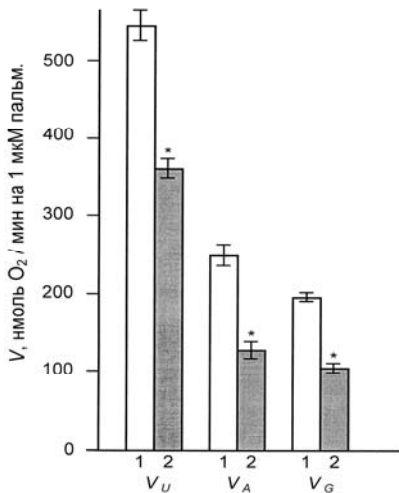


Рис. 6. Влияние неорганического фосфата на разобщающую активность пальмитиновой кислоты (V_U) и на составляющие ее части: чувствительную к карбоксиатрилату (V_A) и чувствительную к аспартату (V_G) в митохондриях печени. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «методы исследования» и в примечании к таблице 14. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

* Различия между опытом (присутствие фосфата) и контролем (его отсутствие) статистически достоверны, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

3.4. Сравнительное исследование эффектов неорганического фосфата и мерсалила на разобщающее действие пальмитиновой кислоты при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров в митохондриях печени истощенных по эндогенным субстратам окисления.

В следующих опытах были использованы митохондрии печени, предварительно инкубированные до полного истощения субстратов окисления. Это было необходимо для того, чтобы устранить возможное влияние их неконтролируемого транспорта через внутреннюю мембрану митохондрий на ΔpH и $\Delta\Psi$.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что неорганический фосфат и мерсалил модифицируют разобщающее действие пальмитиновой кислоты в митохондриях печени, истощенных по эндогенным субстратам. Эффект этих соединений заключается в снижении разобщающей активности пальмитиновой кислоты за счет составляющей разобщения, чувствительной к карбоксиатрактилату и аспартату. Этот эффект согласуется с данными, полученными ранее на интактных митохондриях печени, свидетельствующими об участии переносчика фосфата в разобщающем действии жирных кислот (Самарцев и др., 2003).

В классической ферментативной кинетике для описания ингибирования используется понятие парциальное торможение i (Уэбб, 1966). Величина парциального торможения определяется следующим образом: $i = 1 - (v_i/v)$, где v_i и v – скорости ферментативной реакции соответственно в присутствии и отсутствии ингибитора (Уэбб, 1966). Этот подход был применен нами для характеристики способности неорганического фосфата и мерсалила ингибировать разобщающую активность пальмитиновой кислоты. Как видно из рис. 7, неорганический фосфат и мерсалил в равной степени ингибируют удельную разобщающую активность пальмитиновой кислоты, в то время как ее составляющая чувствительная к карбоксиатрактилату и аспартату ингибируется неорганическим фосфатом в большей степени, чем мерсалилом.

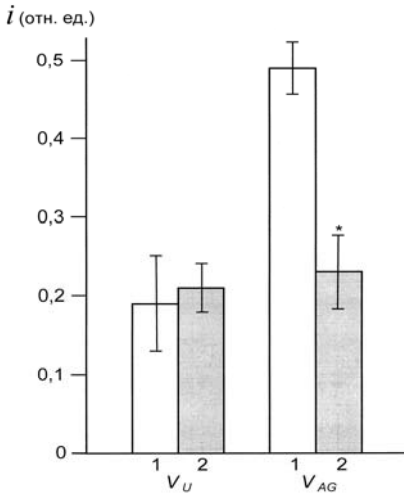


Рис. 7. Сравнение ингибирующих эффектов (i) неорганического фосфата (1) и мерсалила (2) по отношению к удельной разобщающей активности пальмитиновой кислоты (V_U) и ее составляющей чувствительной к карбоксиатрактилату и аспартату (V_{AG}). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

* Различия между опытом (присутствие фосфата) и контролем (его отсутствие) статистически достоверны, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Если способность мерсалила подавлять разобщающее действие пальмитиновой кислоты является следствием его взаимодействия с переносчиком фосфата, то аналогичное действие неорганического фосфата обусловлено как взаимодействием с этим переносчиком, так и превращением ΔpH в $\Delta\Psi$. Оба эти эффекта аддитивны.

Установлено, что в митохондриях печени, истощенных по субстратам окисления, под влиянием неорганического фосфата и мерсалила происходят характерные изменения ресопрягающих эффектов карбоксиатрактилата и аспартата: эти реагенты, при добавлении по отдельности после жирной кислоты, не подавляют ее разобщающее действие и эффективны только при их совместном добавлении. Эти данные рассматриваются как свидетельство того, что в процессе разобщающего действия жирных кислот в формировании функциональной связи между ADP/ATP- и аспартат/глутаматным антипортерами принимает участие переносчик фосфата.

На рис. 8 приведена гипотетическая схема, которая объясняет на примере нигерицина влияние на разобщающее действие жирных кислот ионных потоков, вызывающих превращение ΔpH в $\Delta\Psi$. Нигерицин переносит из матрикса в межмембранное пространство ионы калия в обмен на ионы водорода, вследствие этого в

межмембранном пространстве заряд становится более положительным, а количество ионов водорода уменьшается, что приводит к уменьшению ΔpH и одновременно к увеличению $\Delta \Psi$. Можно предположить, что в этом случае существенно замедляется осуществляемый по градиенту pH транспорт протонированной формы жирной кислоты с наружного монослоя внутренней мембраны на внутренний монослой. Одновременно с этим повышается скорость транспорта аниона жирной кислоты в противоположном направлении с последующим их накоплением на наружном монослое внутренней мембраны и выходом на наружную мембрану. Все это приводит к ингибированию разобщающей активности жирных кислот при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров.

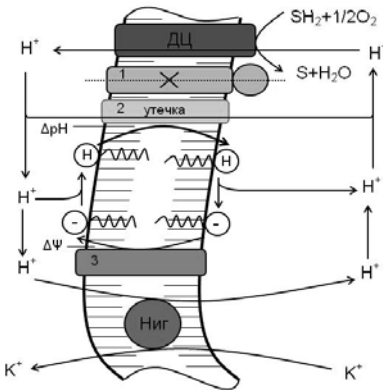


Рис. 8. Гипотетическая схема влияния на разобщающее действие жирных кислот индуцированных нигерицином (Ниг) ионных потоков. ДЦ – дыхательная цепь; 1 – АТФ-синтаза; 2 – эндогенный канал пассивной утечки протонов; 3 – один из анионных переносчиков: ADP/ATP антипортер или аспартат/глутаматный антипортер.

ВЫВОДЫ

1. В митохондриях печени под влиянием повышения концентрации пальмитиновой и лауриновой кислот увеличивается доля участия в разобщении ADP/ATP антипортера и в той же мере уменьшается доля участия в разобщении аспаргат/глутаматного антипортера. Эти данные свидетельствуют о том, что свободные длинноцепочечные жирные кислоты в митохондриях печени являются регуляторами индуцированного ими разобщения при участии вышеуказанных переносчиков.

2. Коэффициент эффективности жирных кислот, применяемый для количественной характеристики действия жирных кислот как регуляторов разобщения в митохондриях печени, уменьшатся по мере снижения гидрофобности молекул в ряду: пальмитиновая, миристиновая, лауриновая, каприновая и лаприловая кислоты. Эффективность этих же жирных кислот как индукторов разобщения по мере снижения гидрофобности молекул уменьшается в меньшей степени.

3. В митохондриях печени индуцируемое неорганическим фосфатом или нигерицином превращение ΔpH в $\Delta \Psi$ на внутренней мембране приводит к ингибированию разобщающей активности пальмитиновой кислоты при участии ADP/ATP- и аспаргат/глутаматного антипортеров. Следовательно, одним из факторов регуляции разобщающего действия жирных кислот при участии ADP/ATP- и аспаргат/глутаматного антипортеров является транспорт ионов вызывающий превращение ΔpH в $\Delta \Psi$ на внутренней мембране.

4. В митохондриях печени, истощенных по эндогенным субстратам окисления, неорганический фосфат более эффективно, чем мерсалил ингибирует разобщающую активность пальмитиновой кислоты при участии ADP/ATP- и аспаргат/глутаматного антипортеров. При этих условиях карбоксиатрилат и аспаргат будучи добавленные к митохондриям по отдельности в присутствии неорганического фосфата или мерсалила не подавляют разобщающее действие пальмитиновой кислоты.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Самарцев В.Н., **Марчик Е.И.**, Шамагулова Л.В. Свободные жирные кислоты как индукторы и регуляторы разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях печени при участии ADP/ATP- и аспарат/глутаматного антипортеров // Биохимия. 2011. Т. 76. № 2. С. 264 – 273. (Перевод: Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. No 2. P. 217 – 224.).

2. Самарцев В.Н., Кожина О.В., **Марчик Е.И.**, Шамагулова Л.В. Участие переносчика фосфата в разобщающем действии пальмитиновой кислоты в митохондриях печени в составе комплекса с ADP/ATP- и аспарат/глутаматным антипортерами // Биологические мембраны. 2011. Т. 28. № 3. С. 206 – 214. (Перевод: Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2011, V. 5, No. 2, P. 171 – 178.).

II. Статьи, тезисы докладов региональных, всероссийских и международных конференций:

1. Самарцев В.Н., Рыбакова С.Р., Кожина О.В., **Марчик Е.И.** Циклоспорин А-чувствительное разобщающее действие жирных кислот в митохондриях печени без участия ионов кальция // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пушкино, 2 – 4 июня 2009 г. Том 2. С. 624 – 627.

2. **Марчик Е.И.**, Самарцев В.Н. Особенности взаимодействия свободных предельных жирных кислот различной длины цепи с митохондриями печени крыс // Тринадцатые Вавиловские чтения. Глобализация. Глобалистика. Потенциалы и перспективы России в глобальном мире. Материалы постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной научной конференции с международным участием. Йошкар-Ола 2010 г. С. 190-191.

3. **Марчик Е.И.**, Самарцев В.Н. Регуляция свободными жирными кислотами индуцированного разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс при участии ADP/ATP- и аспарат/глутаматного антипортеров // Актуальные проблемы экологии, биологии и химии: материалы Всероссийской конференции. Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола 2010 г. С. 197-198.

4. Самарцев В.Н., Кожина О.В., **Марчик Е.И.**, Рыбакова С.Р., Шамагулова Л.В. Взаимодействие жирных кислот с митохондриями печени: механизмы и физиологическое значение // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. Сборник трудов первой международной научно-практической конференции, 23-26.11.2010 г., Санкт-Петербург, 2010, Том 1. С. 213-214.

5. Самарцев В.Н., Кожина О.В., **Марчик Е.И.**, Шамагулова Л.В. Ингибирование пальмитиновой кислотой глицерл-3-фосфат митохондрий печени при окислительном стрессе // Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии. Сборник трудов I Всероссийской Интернет-конференции. Казань, 17-22 ноября 2010 г. – Казань: Казанский университет, 2010. – С. 139-141.

6. **Марчик Е.И.**, Рыбакова С.Р., Самарцев В.Н. Транспорт ионов как фактор регуляции разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени // Биология – наука XXI века. 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 18 – 22 апреля 2011 г.). Сборник тезисов. Пущино 2011. С. 98.

7. Самарцев В.Н., **Марчик Е.И.**, Рыбакова С.Р., Чернядьева А.В. Изучение механизмов регуляции кальций-независимого разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 24 – 26 мая 2011 г. Сборник статей. Пущино, 2011. С. 715–718.