

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ**ФИЗИОЛОГИЯ****ДЕЙСТВИЕ ОРОКСИЛИНА А НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС****Комилов Эсохон Джураевич**

мл. науч. сотрудник, Институт биофизики и биохимии при НУУз,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: esohon83@mail.ru

Эргашев Нурали Аъзамович

ст. науч. сотрудник, зав. лаб. молекулярной биофизики, Институт биофизики и биохимии при НУУз,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: enurali2018@gmail.com

Асраров Музаффар Исламович

д-р биол. наук, профессор, Институт биофизики и биохимии при НУУз,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: Asrarov54@mail.ru

Гайибов Улугбек Гаппаржанович

мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: gayibov.ulugbek@gmail.com

Абдулхакова Гулназира Вахобжановна

учитель биологии, Академический лицей Ташкентской Медицинской Академии,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: nazira.2713@mail.ru

Эшбакова Комила

ст. науч. сотрудник, Институт химии растительных веществ АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент

**ACTION OF OROXYLIN A TO MEMBRANE PERMEABILITY
OF RAT LIVER MITOCHONDRIA****Esohon Komilov**

Junior researcher, Institute of Biophysics and biochemistry, Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent

Nurali Ergashev

Senior researcher, Head of molecular biophysics laboratory,
Institute of Biophysics and biochemistry, Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent

Muzaffar Asrarov

professor, DcS, Institute of Biophysics and biochemistry, Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent.

Ulugbek Gayibov

Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences, Republic of Uzbekistan, Uzbekistan, Tashkent

Gulnazira Abdulkhakova

Teacher of biology, Academician lyceum of Tashkent Medical Academy, Uzbekistan, Tashkent

Komila Eshbakova

Senior researcher, Institute of chemistry of plant substances Academy of Sciences of Uzbekistan, Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

Изучено действие флавона ороксиллина А на пассивную проницаемость митохондриальных мембран для некоторых катионов, а также состояние мегапоры органелл в опытах *in vitro*. Показано, что флавоноид дозозависимо увеличивает и индуцирует пассивную проницаемость мембран митохондрий для изученных катионов, преимущественно для Ca^{2+} и H^+ . По (эффективности индукции) степени индуцирования пассивной проницаемости мембран митохондрий в присутствии 50 мкМ ороксиллин А неследов катионы располагались по уменьшению эффекта в ряду: $\text{Ca}^{2+} : \text{H}^+ : \text{Na}^+ : \text{K}^+ = 1,00 : 0,92 : 0,76 : 0,30$.

ABSTRACT

The effects of flavone oroxylin A on passive permeability of the mitochondrial inner membrane to different cations and the condition of mitochondrial megapore *in vitro* were investigated. It has been demonstrated that oroxylin A interacts with the membranes of mitochondria and induces passive membrane cations permeability mainly to Ca^{2+} and H^+ . In general, the induced change of mitochondrial inner membrane permeability to cations with oroxylin A (50 μM) may be represented by the following relation: $\text{Ca}^{2+} : \text{H}^+ : \text{Na}^+ : \text{K}^+ = 1,00 : 0,92 : 0,76 : 0,30$.

Ключевые слова: Ороксиллин А, митохондрии, пассивная проницаемость.

Keywords: Oroxylin A, mitochondria, passive permeability.

В настоящее время не вызывает сомнений важная роль в регуляции большинства физиологических и биохимических процессов, локализованных в митохондриях животных тканей белковых наноструктур, связанных с внутриклеточным метаболизмом, гомеостазом ионов, продукцией активных форм кислорода (ROS) и перекисным окислением липидов. [5, с. S413-S426; 6, с. 6306]. При некоторых патологических состояниях выявляются функциональные нарушения этих структур, участвующих в регуляции проницаемости мембран митохондрий и по результатам ряда исследований [9, с. 1072; 11, с. 727] их можно корректировать растительными соединениями. В связи с этим в настоящее время актуальным и рассматривают исследования, направленные на выяснение механизма действия таких соединений на организм на молекулярном, мембранном и клеточном уровнях с целью обнаружения потенциальных флавонов. Флавоны обладают весьма широким спектром действия на биологические объекты, демонстрируя антиоксидантные, цитопротекторные, гепатозащитные, антигипоксические, мембранотропные и т.п. эффекты [1, с. 38-43; 2, с. 41; 3, с. 228; 4, с. 660-663; 7, с. 398; 10, с. 179]. В проявлении некоторых физиологических эффектов флавонов на клетку известную роль может сыграть их способность влиять на проницаемость мембран митохондрий для различных ионов.

Цель настоящей работы - изучение действия флавона ороксиллина А на пассивную проницаемость внутренних мембран митохондрий для одно- и двухвалентных.

Ороксиллин А выделяли из растения *Scutellaria guttata*, его химическая структура представлена на рис.1.

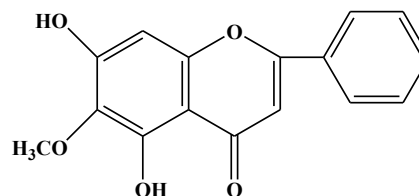


Рисунок 1. Структурная формула ороксиллина А (5,7-дигидрокси-6-метоксифлавонон)

Митохондрии из печени белых беспородных крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования [13, с. 619-635]. Животное декапитировали, извлекали печень и помещали ее в стакан с ледяной средой выделения (СВ), содержащей 250 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-хлорида, рН 7,4. После определения массы печень продавливали через механический пресс и гомогенизировали в тефлоновом гомогенизаторе в 6-кратном объеме СВ. Сначала центрифугировали при 450 г в течение 7 мин. при $0 \pm 2^\circ\text{C}$ на центрифуге ЦЛР-1 с ротором углового типа, отделяли ядра и клеточные фрагменты. Потом супернатант центрифугировали при 4000 г в течение 15 мин. при $0 \pm 2^\circ\text{C}$. Осадок суспендировали в СВ без ЭДТА в соотношении 10:1. В течение эксперимента суспензия митохондрий хранилась в ледяной бане.

Содержание белка митохондрий определяли по методу Лоури в модификации Петерсона [12, с. 346-356].

Пассивную проницаемость внутренней мембраны митохондрий для различных ионов оценивали фотометрическим методом, регистрируя изменения оптической плотности суспензии митохондрий во времени при 540 нм. Кинетику проницаемости деэнергизованных митохондрий для ионов H^+ , K^+ , Na^+ и Ca^{2+} измеряли в изоосмотических растворах нитратов соответствующих катионов [7, с. 398-411].

Полученные данные обрабатывались использованием пакета программ Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США). Величину $P < 0,05$ рассматривали в качестве критерия показателя достоверности различий.

При изучении действия ороксилена А на пассивную проницаемость мембран митохондрий для H^+ было показано дозозависимое увеличение скорости набухания деэнергизованных митохондрий (рис.2). Так, уже в концентрации 10 мкМ ороксилена А достоверно повышает скорость набухания митохондрий в 1.4, а при увеличении концентрации в 2 раза в 1.7 раза по сравнению с контролем. Достоверное увеличение скорости набухания митохондрий наблюдается и при действии ороксилена А в более высоких концентрациях 30, 40 и 50 мкМ, которые соответственно в 2.2, 2.5 и 3.2 раз больше, чем в контроле (рис.2).

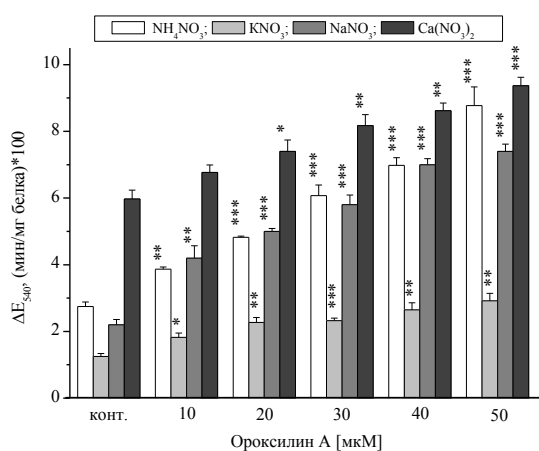


Рисунок 2. Влияние ороксилена А на пассивную проницаемость мембран митохондрий для различных катионов. Достоверными считали различия при * - $P < 0,05$. ** - $P < 0,01$. * - $P < 0,001$.**

Эксперименты по оценке протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий проводили в изоосмотическом растворе нитрата аммония. Известно [8, с. 5404-5411], что митохондриальная мембрана относительно проницаема для ионов NO_3^- и NH_3^+ , но не для H^+ и NH_4^+ . В ходе реакции $-NH_3^+ + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^-$ внутри митохондрий накапливаются ионы OH^- и именно защелачивание матрикса митохондрий препятствует их набуханию в среде NH_4NO_3 . Добавление в инкубационную среду в этих условиях вещества с протонофорной активностью

приводит к переносу H^+ через внутреннюю мембрану митохондрий, и, как следствие набуханию митохондрий.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что ороксилена А, дозозависимо увеличивающий проницаемость мембран митохондрий для ионов H^+ , обладает протонофорной активностью.

Влияние ороксилена А на пассивную проницаемость мембран митохондрий для одновалентных катионов (Na^+ и K^+) изучали в изоосмотических растворах их азотнокислых солей. Известно, что внутренняя мембрана деэнергизованных Мх печени здоровых крыс более проницаема для катиона Na^+ , т.е. $Na^+ \rightarrow K^+$. Аналогичные данные получены нами (Рис 2, контроль), при этом изученные катионы располагались в ряд: $Ca > H > Na > K$, а численное соотношение (ΔE 540/мин на мг белка) имело вид (величина ΔE 540 для Ca^{2+} принята за 1): 1,00 : 0,46 : 0,37 : 0,21.

Так, при внесении в среду инкубации с $NaNO_3$ 10 мкМ флавона скорость набухания митохондрий возрастает в 1,9 раза, а в присутствии 20, 30, 40 и 50 мкМ – в 2,3, 2,6, 3,2 и 3,4 раза, соответственно, в сравнении с контролем (рис.2). Аналогичные эксперименты с KNO_3 содержащей СИ показали, что эффект флавона на K^+ -проницаемость мембран намного менее, выражен чем его действие на проницаемость для ионов H^+ . Таким образом, ороксилена А, наряду с протонофорной активностью также увеличивает и пассивную проницаемость мембран митохондрий для ионов K^+ (рис.2). Также дозозависимым образом увеличивал скорость набухания митохондрий. В изоосмотической среде с $Ca(NO_3)_2$, ороксилена А что свидетельствует о увеличении проницаемости мембран органелл для ионов Ca^{2+} в присутствии исследуемого флавона (рис.2).

Суммируя приведенные выше данные, отметим, что 50 мкМ индуцированное ороксилена А изменение проницаемости внутренней мембраны митохондрий для изученных катионов можно представить следующим отношением (проницаемость для Ca^{2+} принята за 1): $Ca^{2+} : H^+ : Na^+ : K^+ = 1,00 : 0,92 : 0,76 : 0,30$. Полученные данные свидетельствуют об увеличении в присутствии ороксилена А проницаемости мембран преимущественно для ионов Ca^{2+} и в меньшей степени – для H^+ .

Таким образом, ороксилена А взаимодействует с мембраной митохондрий и увеличивает её пассивную проницаемость для катионов, преимущественно для Ca^{2+} и H^+ . Возможно, одна или несколько молекул флавона связывают определенный катион и переносят его по концентрационному градиенту в матрикс митохондрий, либо, встраиваясь в мембрану митохондрий, молекулы флавона образуют неспецифический ион-проводящий канал, о чем свидетельствует сохранения ряда проводимости, полученного в контроле, в присутствии всех исследованных концентраций ороксилена А.

Ороксилена А дозозависимо увеличивает пассивную проницаемость мембран митохондрий для катионов Ca^{2+} и H^+ и в меньшей степени – Na^+ и

K⁺. Выявленная способность ороксилена А модулировать проницаемость мембран митохондрий может

играть определенную роль в механизме действия изучаемого флавонола на организм.

Список литературы:

1. Асраров М.И., Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Позилов М.К., Эшбакова К.А., Тошматов З.А., Ташбекова М.Х. К механизму действия флавонола лютеолина на функции митохондрий печени крыс // *Вопр. биол. мед. и фарм. химии.* – 2015. - №12. – С. 38-43.
2. Доркина Е.Г. Изучение гепатопротекторного действия природных флавоноидных соединений // *Эксп. и клин. фарм.* – 2004. – Т.67(6). – С. 41–44.
3. Комилов Э.Ж., Позилов М.К., Эргашев Н.А., Эшбакова К.А., Ташбекова М.Х., Асраров М.И. Действие флавоноида лютеолина на функциональные параметры митохондрий печени и поджелудочной железы крыс при экспериментальном диабете // *Инф. иммун. и фарм.* – 2015. - №4. – С. 228-233.
4. Никитина Н.А., Собенин И.А., Мясоедова В.А. и др. Антиатерогенный эффект флавоноидов винограда в модели *ex vivo* // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* – 2006. – Т. 141. - № 6. – С. 660-663.
5. Adam-Vizi, V., and Starkov, A.A. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts // *J. Alzheimers Dis.* – 2010. – Vol. 20(suppl. 2). – P. S413-S426.
6. Bolisetty, S., and Jaimes, E.A. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 6306-6344.
7. Brierley G.P. Passive permeability and energy-linked ion movements in isolated heart mitochondria // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1974. – Vol. 227. – P. 398-411.
8. Brierley, G.P., Jurkowitz, M., Scott, K.M., and Merola, A.J. Ion transport by heart mitochondria: XX. factors affecting passive osmotic swelling of isolated mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 1970. – Vol. 245. – P. 5404-5411.
9. Jiao, Y.-H., Zhang, Q., Pan, L.-L., Chen, X.-Y., Lei, K.-L., Zhao, J., Jiang, F.-L., and Liu, Y. Rat liver mitochondrial dysfunction induced by an organic arsenical compound 4-(2-nitrobenzaliminy) phenyl arsenoxide // *J. Memb. Biol.* – 2015. – Vol. 248. – P. 1071-1078.
10. Kinoshita T., Lepp Z., Kawai Y. et al. An integrated database of flavonoids // *Biofactors.* – 2006. – V. 26(3). – P. 179-188.
11. Lai, L., Jin, J.-C., Xu, Z.-Q., Ge, Y.-S., Jiang, F.-L., and Liu, Y. Spectroscopic and microscopic studies on the mechanism of mitochondrial toxicity induced by CdTe QDs modified with different ligands // *J. Memb. Biol.* – 2015. – Vol. 248. – P. 727-740.
12. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // *Analyt. biochem.* – 1977. – Vol. 83(2). – P. 346-356.
13. Schneider WC, Hageboom GH, Pallade GE. Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material // *J. Biol. Chem.* – 1948. – V. 172(2). – P. 619-635.