



ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ ЯДА КОБРЫ НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ БЕШЕНСТВА (НА ПРИМЕРЕ СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ)

Инобат Широнова

Гулистанский государственный университет

<https://doi.org/10.5281/zenodo.10814386>

ARTICLE INFO

Received: 10th March 2024

Accepted: 11th March 2024

Published: 13th March 2024

KEYWORDS

кобра, над.н, с-3-б-ий, оксид,
митохондрии, яд.

ABSTRACT

в статье изучено влияние низкомолекулярных пептидов из яда среднеазиатской кобры на активность митохондрий печени серны. Проведенная в этом направлении работа была изучена и проанализированы полученные результаты. Маломолекулярные пептиды (S-3-B-IV-бета-фракция) яда среднеазиатской очковой змеи замедляют окисление сукцината в митохондриях. В частности, значительное замедление окисления фосфорилирования (V3) приводит к резкому снижению скорости дыхания и АДФ/Ос. Прежде всего, этот пептид незначительно ускоряет активность сукцинооксидазы, практически не влияет на цитохром s-зависимую сукцинооксидазу и НАД.Н-оксидазу

Известно, что помимо фосфолипазы A2, цитотоксинов и нейротоксинов, располагающихся во фракции С-2, в яде кобры присутствуют и другие компоненты с молекулярным весом ниже 3000-4000 (1,2). Они также действуют разобщающе на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий (3). Следует отметить, что выход фракций С-3 при гельфильтрации яда среднеазиатской кобры всего лишь 1% (1,2). Ясно, что в общем механизме действия яда на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий вклад низкомолекулярных пептидов невелик. Несмотря на это, они могут представлять существенный интерес как инструмент для изучения структуры и функции биологических мембран, в частности мембран митохондрии, благодаря достаточно выраженному эффекту и небольшим размерам что позволит определить их структуру и провести направленные модификации функционально значимых групп.

Вызывало интерес сравнительное исследование мембраноактивных свойств низкомолекулярных пептидов яда кобры в отношении их действия на окислительное фосфорилирование и активности полиферментных систем митохондрий.

Низкомолекулярные пептиды яда кобры выделили по методу (1,2). Митохондрии печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования (4). Скорость

потребления кислорода в различных метаболических состояниях митохондрий, величину дыхательного контроля по Чансу (ДКч) и коэффициент АДФ/0, активность полиферментных систем мембран митохондрий измеряли полярографически (5). Содержание белка определяли по методу Лоури.

Влияние низкомолекулярных пептидов яда кобры на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий. Значительные изменения функционального состояния митохондрий при непосредственном влиянии фракции С-3 в зависимости от его концентрации наблюдались начиная с 1.8 мкг. на 1 мг белка митохондрий (табл.1). При этом фракция С-3 вызывает торможение дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях. Особенно значительное подавление дыхания митохондрий в состоянии 3 на (41,3%) приводило к снижению величины ДКч на 25.6%. Однако коэффициент АДФ/0 не отличается от контроля. С увеличением концентрации пептидов ингибирование переноса электронов от сукцината до молекулярного кислорода по дыхательной цепи митохондрий усиливается. При этом уменьшение дыхания митохондрий особенно заметно протекает в состоянии 3. Так, если в присутствии 4,8 мкг пептидов на 1 мг белка митохондрий, дыхание митохондрий в состоянии 3 уменьшается на 75,5%, то в состоянии 2, 4 и в присутствии разобщителя – на 50, 20 и 25% соответственно от контроля. При этом величины ДКч и коэффициент АДФ/0 теряется полностью. Таким образом, низкомолекулярные пептиды яда среднеазатской кобры способны блокировать в первую очередь АТФ-синтетазной, а затем дыхательной функции митохондрий.

Полученные результаты показывают, что фракция С-3, как фракция С-2 яда кобры подавляла дыхание митохондрий в метаболическом состоянии 3, величину ДКч и коэффициент АДФ/0. Действие фракций С-2 и С-3 на энергетический обмен митохондрий в фосфорилирующем состоянии совпадает с действием цельного яда, однако по признакам активации или ингибирования дыхания митохондрий в метаболических состояниях 2 и 4 не совпадает с действием цельного яда. Ранее нами было показано (6), что цельный яд кобры в низких концентрациях повышает дыхание митохондрий в состоянии V_4 и уменьшает в состоянии V_3 . В отличие от цельного яда фракция С-2 дозозависимо повышает дыхание митохондрий в этих состояниях, а фракция С-3, напротив, является ингибитором дыхания митохондрий в метаболическом состоянии 4 и особенно в состоянии 2. В этом соотношении наши результаты не согласуются с данными Р. Саттыева (3). Он показал, что уменьшение окислительного фосфорилирования митохондрий под действием фракции С-3 происходит совместно с повышением дыхания в состоянии 4.

В таблице 1 приведены результаты изучения действия пептидов фракции С-3-Б-IV-бета яда кобры на различные параметры функционального состояния митохондрий печени. Данный пептид в концентрации 0,8 мкг/мг белка митохондрии подавляет скорость окисления сукцината в состояниях 2, 3 и 4 и в присутствии разобщителя на 22,3; 34,7; 20,0 и 11,2% соответственно от контрольного уровня. Это приводит к уменьшению величины ДКч на 19,1%. Однако коэффициент АДФ/0 почти не меняется. Повышение действующей концентрации данного пептида приводит к дальнейшему понижению скорости потребления кислорода митохондриями в различных метаболических состояниях, в том числе и коэффициента АДФ/0. Так в присутствии 1,3 мкг/мг пептида

дыхание митохондрий в состояниях 2, 3, 4 и в присутствии динитрофенола уменьшается на 44,5; 58,7; 38,9 и 17,7% соответственно. При этом величина ДКч и АДФ/0 уменьшается на 32,5 и 19,6%. С увеличением дозы пептида ингибирование дыхания и окислительного фосфорилирования значительно усиливается. В присутствии пептида в дозе 4,8 мкг/мг белка дыхание митохондрий 2, 3, 4 и ДНФ снижается на 58,4; 81,9; 39,0; 35,8% соответственно, а величины ДКч и АДФ/0 исчезает полностью.

Влияние фракций С-3 и С-3-Б-IV-бета яда кобры на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс ($M \pm m$ $n=6-8$)

Концентрация мкг/мг белка митохондрий	Скорость дыхания, нг/атом кислорода/мин на мг белка митохондрий				ДК (Y3;Y4)	АДФ/0
	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y _{днф}		
Фракции С-3						
0	24±2	114±3	34±2	180±4	3,36±0,09	1,85±0,06
0,6	31±3	99±4	33±3	186±5	3,00±0,10	1,84±0,07
1,2	27±2	78±3	30±2	167±4	2,60±0,08	1,80±0,06
1,8	24±2	67±3	27±2	160±3	2,50±0,08	1,65±0,06
2,4	21±2	51±3	24±2	156±3	2,13±0,07	1,50±0,05
3,0	20±1	45±2	24±1	149±2	1,87±0,06	1,30±0,05
3,6	20±1	39±1	25±1	140±1	1,58±0,05	1,15±0,04
4,2	18±1	33±1	27±1	138±1	1,22±0,05	1,06±0,04
4,8	17±1	28±1	27±1	135±1	ингибирование Y ₃	
С-3-Б-IV-бета						
0	36±3	121±4	36±3	187±5	3,36±0,10	1,84±0,07
0,8	28±2	79±2	29±2	168±4	2,72±0,08	1,79±0,06
1,3	20±2	50±2	22±2	154±3	2,27±0,07	1,48±0,05
2,0	11±1	38±2	22±1	138±3	1,73±0,06	1,14±0,04
2,5	15±1	22±2	22±2	120±3	ингибирование Y ₃	

Примечание: Для измерения потребления кислорода митохондрий печени крыс использовали среду инкубации следующего состава: 0,23 М, трис-НСI- буфер 10Мм, К Н₂РO₄ 5 Мм? РН 7,4, сукцинат 10 Мм (рН 7,4). Реакцию начинали добавлением суспензии митохондрий (3-4 мг.мл). Концентрация АДФ-200 мкМ, 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ)- 5×10^{-5} М.

Таким образом пептид С-3-Б-IV-бета яда кобры в первую очередь влияет на АТФ-синтезирующую, а затем и дыхательную функцию митохондрий. По эффективности действия на параметры сопряжения митохондрий пептид С-3-Б-IV-бета оказался в 3 раза активнее по сравнению с аналогичным количеством фракции С-3 и в 3 раза – цельного яда (6). В последнее время определённое внимание уделяется анализу дыхания митохондрий в состоянии покоя (состояние 4) (7, 8). При его исследовании обнаружено,

что ингибиторы дыхательной цепи (антимидин, калий цианид и др.), подавляя дыхание в метаболическом состоянии 4, одновременно снижают и мембранный потенциал. Согласно указанным исследованиям, такое снижение вызвано постоянной утечкой протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Этот факт заслуживает в том смысле, что для мембран характерна проницаемость, которая рассеивает часть энергии дыхания в виде тепла. Следует отметить, что этот феномен ещё недостаточно исследован и пока не ясен его механизм, обуславливающий такую утечку протонов.

Таким образом, низкомолекулярный пептид С-3-Б-IV-бета яда кобры, как олигомицин, специфический ингибитор, подавляющий фосфорилирование, сопряжённое с электрическим транспортом. Отсюда можно предположить, что пептид С-3-Б-IV-бета проявляет способность уменьшить протонную проводимость мембран. По данным М.Н.Кондрашовой (7), дыхание митохондрий в состоянии 4 можно рассматривать как более отвечающее физиологическим условиям, чем состояние активного дыхания (V_3).

Влияние низкомолекулярных пептидов яда кобры на активность полуферментных систем мембран митохондрий. В таблице 2 показано действие пептидов яда кобры на активность полиферментных систем мембран митохондрий печени в зависимости от концентрации этих соединений в среде инкубации.

Примечание: часть митохондрий замораживали и после оттаивания измеряли НАД.Н-оксидазные, сукцинатоксидазные и цитохром с-оксидазные активности, добавляя в ячейку полирографии объёмом 1 мл 3 мкмоль НАД.Н, 10 мкмоль сукцината, 20 мкмоль аскорбата и 100 мкг цитохрома с. НАД.Н-оксидазную активность определяли также в присутствии 2 мкг ротенона. Ротенон не влияет на внешний путь окисления НАД.Н, но полностью тормозит перенос электронов от НАД.Н по дыхательной цепи митохондрий на молекулярный кислород.

Для измерения активности полиферментных систем мембран митохондрий использовали среду следующего состава: сахароза 0,66 М, трис-НСI-буфер 50мМ, гистидин 5мМ, рН 7,4. Все ферментативные активности выражали в нанограммах кислорода, потребляющего за 1 минуту при 25 °С в расчёте на 1мг белка митохондрий. Видно, что пептиды в первую очередь ингибируют активность сукцинатоксидазы, а затем НАД.Н-оксидазной системы дыхательной цепи митохондрий. Ингибирование активности оксида зависит от дозы пептидов. Так, если в присутствии 40мкг пептидов на 1мг белка митохондрий активность сукцинатоксидазы уменьшается на 60%, то НАД.Н-оксидазная система дыхательной цепи ингибируется всего лишь на 27%. В то же время пептиды дозозависимо повышают активность ротенончувствительной НАД.Н-оксидазы и почти не влияют на активность цитохром с-оксидазной системы дыхательной цепи митохондрий.

Пептид С-3-Б-IV-бета ингибирует сукцинатоксидазную систему дыхательной цепи митохондрий (таб.3). Повышение концентрации пептида ускоряет ингибирование активности фермента. Введение в суспензию митохондрий пептида в дозе 2,5; 5,0; 10 и 20 мкг/мг белка приводит к ингибированию активности сукцинатоксидазы на 18; 23; 30 и 40% соответственно.

Оригинальные данные получены при определении НАД.Н-оксидазной активности. Анализ соотношения скорости окисления по ротенончувствительному и –

нечувствительному пути показал, что пептид С-3-Б-IV-бета подавляет скорость окисления НАД.Н по дыхательной цепи и активирует примерно в такой же степени внешний путь переноса электронов (через цитохром В₅). Повышение концентрации пептида ускоряет отклонение этих оксидаз от уровня контроля. Так, добавление в суспензию митохондрий пептида в дозе 5, 10 и 20 мкг/мг белка приводит к повышению активности ротеноннечувствительной НАД.Н-оксидазы на 19; 24 и 28%, в то же время активность НАД.Н-оксидазной системы дыхательной цепи уменьшается на 14; 18 и 25% соответственно.

Пептид С-3-Б-IV-бета не влияет на активность цитохром с-оксидазной системы дыхательной цепи митохондрий.

Таким образом, в присутствии пептида С-3-Б-IV-бета подвергается инактивации не только сукцинатоксидазная система, но также снижается активность митохондрий. Ингибирование активности сукцинатоксидазы по сравнению с НАД.Н-оксидазной протекает с гораздо более высокой скоростью. Пептид активирует ротеноннечувствительную НАД.Н-оксидазу, но не влияет на активность цитохром с-оксидазы. Эти различия могут быть связаны с двумя причинами: 1) различной доступностью пептидов к активному центру ферментов сукцинатдегидрогеназы, НАД.Н-дегидрогеназы и цитохром с-оксидазы; 2) различные переносчики электронов по дыхательной цепи в разной степени чувствительны к пептидам яда кобры.

Действие пептида С-3-Б-IV-бета яда кобры на активацию полиферментных систем дыхательной цепи митохондрий цитохром с. Предполагалось, что уменьшение активности сукцинатоксидазной и НАД.Н-оксидазной систем дыхательной цепи в присутствии пептидов яда кобры может быть выбыванием цитохрома с из внутренней мембраны митохондрий. Если это так, то после добавления в суспензии митохондрий избыточного количества цитохрома с активность полиферментных систем дыхательной цепи должна восстановиться до уровня контроля (таб 3). В связи с этим нами было исследовано влияние цитохрома с на активность этих систем мембран митохондрий, подвергнутых действию пептидов. Пептиды С-3-Б-IV-бета не влияют на «включения» экзогенного цитохрома с в дыхательной цепи митохондрий. Таким образом, ингибирование активности сукцинатоксидазной и НАД.Н-оксидажной систем дыхательной цепи митохондрий в присутствии пептидов яда кобры не связано с выбыванием из внутренней мембраны митохондрий цитохрома с.

Литература:

1. Туракулов Я.Х., Сахибов Д.Н., Сорокин В.М., Юкельсон Л.Я. Разделение яда среднеазиатской кобры фильтрацией в геле серадексе и определение биологической активности полученных фракций. Биохимия 1960 Т.34 №6. С 1119-1122.
2. Туракулов Я.Х., Сорокин В.М., Нишонходжаева С.А., Юкельсон Л.Я. Токсины яда среднеазиатской кобры. Биохимия 1971. Т.36. №6 С. 1282-1287.
3. Shirinova, I. A., Dzhuraeva, M. M., Almatov, K. T., & Mirakhmedov, A. K. (1992). The effect of ionizing radiation on the phospholipid content of fetal and maternal liver mitochondria at different stages of pregnancy. Radiobiologiya, 32(5), 690-695.

4. Inobat, S., & Mukhammadjon, M. (2022). IN THE BLOOD AND LIVER OF RATS POISONED BY SPECTACLED SNAKE VENOM. *Galaxy International Interdisciplinary Research Journal*, 10(6), 41-42.
5. Shirinova, I. A. (2020). Effect of Antihypoxants on the Energy Metabolism of Mitochondria in Some Rat Organs. *Solid State Technology*, 63(4), 125-131.
6. Ermatova, S. M., & Shirinova, I. A. (2020). CLARIFICATION TOLERANT MONEY ACTIVITY IN DIFFERENT GROUPS OF HYPOMETABOLISM AGENTS. *Theoretical & Applied Science*, (6), 488-491.
7. Shirinova, I. A., Niyazmetov, B. A., & Almatov, K. T. (2017). RESEARCH OF BENZONAL'S PROTECTIVE EFFECT ON THE BACKGROUND OF COBRA VENOM (NAJA NAJA OXIANA ECHWALD) EFFECT ON THE MITOCHONDRIAL PHOSPHOLIPID CONTENT. *European Journal of Biomedical*, 4(04), 136-9.
8. Shirinova, I. A. (2016). THE EFFECT OF ASIAN COBRA VENOM ON THE CONTENT OF RAT HEART AND LIVER MITOCHONDRIAL PHOSPHOLIPIDS AND THE PROTECTIVE EFFECT OF BENZONAL. *Science and Society*, (3-2), 18-24.
9. Anvarovna, S. I. (2016). Influence of catacyn and benzonalum on Ca²⁺-accumulation capacity of mitochondrion of a liver of the rats poisoning with toxic of a cobra naja naja pxina Echwald. *European science review*, (7-8), 156-158.
10. Shirinova, I. A., ShSh, N., Klemesheva, L. S., & Almatov, K. T. (2005). The effect of Asian cobra venom on the content of rat heart and liver mitochondrial phospholipids and the protective effect of benzonal. *Biomeditsinskaia Khimiia*, 51(5), 513-518.
11. Anvarovna, S. I. (2016). Influence of catacyn and benzonalum on Ca²⁺-accumulation capacity of mitochondrion of a liver of the rats poisoning with toxic of a cobra naja naja pxina Echwald. *European science review*, (7-8), 156-158.
12. Saidov, J., Nazarqulov, A., & Danaboyev, N. Z. (2024). ELEKTRON DIDAKTIK VOSITALAR YORDAMIDA BILIMLARNI SINASH MUAMMOLARI. *Центральноазиатский журнал междисциплинарных исследований и исследований в области управления*, 1(2), 143-147.
13. Saidov, J., Irsaliyev, F., Elmurodova, G., & Rustamova, M. (2024). TALABALARNING MA'LUMOTLAR BAZASINI YARATISH BO 'YICHA BILIMLARINI BAHOLASH MEZONLARI. *Центральноазиатский журнал междисциплинарных исследований и исследований в области управления*, 1(2), 131-134.
14. Saidov, J., Irsaliyev, F., Temirxolova, B., & Ismoilova, C. (2024). TALABALARNING BILIM OLISHGA BO 'LGAN QIZIQISHLARINI OSHIRISH MUAMMOLARI. *Центральноазиатский журнал междисциплинарных исследований и исследований в области управления*, 1(2), 134-137.