



JIGAR MITOXONDRIYALARI $Ca(2+)$ BOG'LIQ MEGAPORASIGA NOORGANIK FOSFAT IONLARINING TASIRI

Ergashev N. A., Isaqulova S.N

Biologiya fanlari nomzodi dotsent

<https://doi.org/10.5281/zenodo.7196706>

ARTICLE INFO

Received: 25th September 2022

Accepted: 27th September 2022

Online: 30th September 2022

KEY WORDS

mitoxondriya, fosfat, oqsil, kation, fiziologik, fosfat, signal.

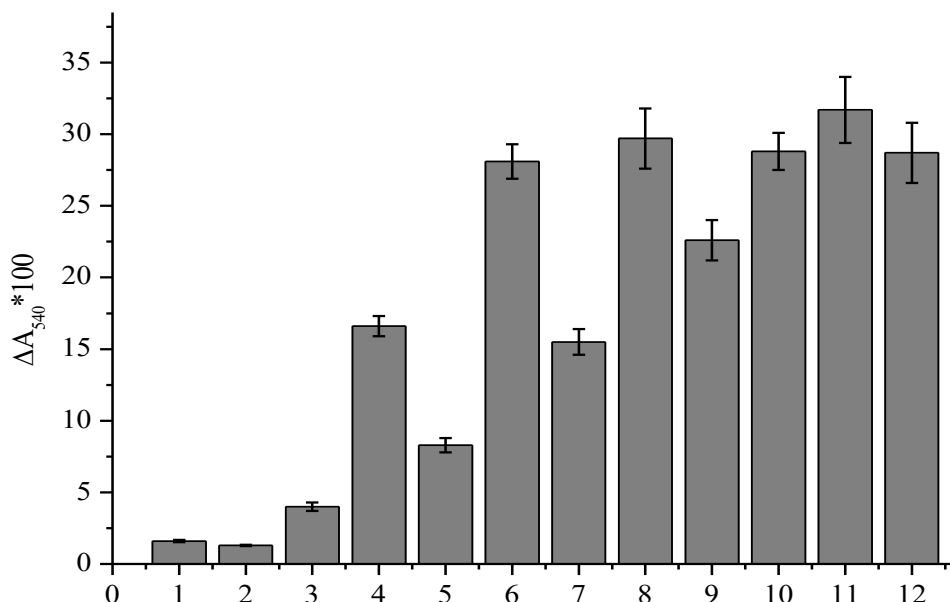
ABSTRACT

Ushbu maqola mitoxondriyalarda hosil bo'ladigan energiya, nafas zanjiri substratlaridan ajralgan elektronni tashilishi natijasida hosil bo'lgan elektr potentsiali hisobiga mitoxondriyalar matriksiga adenozindifosfat (ADF) ning kirib kelishi va uni fosforlanishi oqibatida mitoxondriyalar matriksida $Ca(2+)$ miqdori bu ionni ADF, adenozintrifosfat (ATF), noorganik fosfat va oqsillarning kation buferlari bilan o'zaro bog'lanishi bilan ma'lum darajada ortishini kuzatish kabi jihatlari yoritilgan.

Kirish: Mitoxondriyalar funksional holatining fiziologik boshqarilishi, asosan mitoxondriyalar ichki membranasida joylashgan megaporasi ishtirok etib $Sa(2+)$ -uniportyorning reversiyasi uchun yetarli bo'lmagan membrana potentsialining kichik o'zgarishlari fonida, hujayra muhiti bilan mitoxondriyalar matriksi o'rtasida $Sa(2+)$ -ionlari almashinuvida ishtirok etadi (Akopova, 2008). Ma'lumki, mitoxondriyalardagi megaporaning funksional holatida noorganik fosfat ionlarning o'rne muhimligi ko'rsatilgan bo'lib, noorganik fosfat ionlarning tashilishini mitoxondrial megapora tarkibiy komponenti deb hisoblanayotgan fosfat tashuvchi ta'minlashi ko'rsatilgan (Halestrap, 2009). Shu bois tadqiqotlarimizda kalamush jigar mitoxondriyalari megaporasi funksional holatida in vitro sharoitda $Ca(2+)$ ionlarining 10 mikroM konsentratsiyasi ishtirokida noorganik

fosfat ionining turli konsentratsiyalarini o'rgandik (3.1-rasm). Haqiqatdan ham mitoxondrial megaporaning inkubasion muhiti tarkibida noorganik fosfat ionlari mavjud bo'lmasa, $Ca(2+)$ ionlarining mitoxondriyalarni yuqori amplitudali bo'kishini chaqirmasligini guvohi bo'ldik. Bu tajribadan ko'rinadiki, haqiqatdan ham $Ca(2+)$ ionlari va noorganik fosfat ionlari mitoxondriyalarda oksidativ stress chaqirishda bir-birini quvvatlovchi omillar bo'lib hisoblanar ekan. Bundan tashqari, mitoxondrial megaporani molekulyar jihatdan o'rganishda muhim ko'rsatkichlardan biri bo'lib hisoblanishi mumkin. Tajriba natijalaridan ko'rinib turibdiki (3.1-rasm), haqiqatdan ham inkubasion muhitga mitoxondriyalarni kiritilishi ularning bo'kishini keltirib chiqarmadi va shu bilan birga mitoxondrial megaporani ochilishini chaqiruvchi $Ca(2+)$ (10 mikroM) ionlarining kiritilishi

ham inkubasion muhitda noorganik fosfat ionlari mavjud



1.1-Rasm. Mitoxondriyalar bo'kishiga 10 mikroM Ca(2+)ionlari ishtirokida noorganik fosfatning turli konsentrasiyalari va kempferolning 50 mikroM konsentrasiyasi qo'shilgandagi reaksiyasi berilgan. Bunda 1-mitoxondriyalarning o'z reaksiyasi; 2-noorganik fosfat bo'lmagan inkubasion muhitda 10 mikroM Ca(2+)ionlarining reaksiyasi; 3-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari bilan 1 mM noorganik fosfat reaksiyasi; 4-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari va 1 mM noorganik fosfat bo'lgan sharoitda 50 mikroM kempferolning ta'siri; 5-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari bilan 2 mM noorganik fosfat reaksiyasi; 6- inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari va 2 mM noorganik fosfat bo'lgan sharoitda 50 mikroM kempferolning ta'siri; 7-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari bilan 3 mM noorganik fosfat reaksiyasi; 8-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari va 3 mM noorganik fosfat bo'lgan sharoitda 50 mikroM

kempferolning ta'siri; 9-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari bilan 4 mM noorganik fosfat reaksiyasi; 10-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari va 4 mM noorganik fosfat bo'lgan sharoitda 50 mikroM kempferolning ta'siri; 11-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari bilan 5 mM noorganik fosfat reaksiyasi; 12-inkubasion muhitda Ca(2+)ionlari va 5 mM noorganik fosfat bo'lgan sharoitda 50 mikroM kempferolning ta'siri. bo'lmagan sharoitda deyarli mitoxondriyalarni bo'kishini keltirib chiqarmadi. Lekin mitoxondriyalar inkubasion muhitiga 1 mM noorganik fosfat ionlarini kiritish oqibatida 10 mikroM Ca(2+)ionlari ishtirokida mitoxondriyalar bo'kishini 3 barobarga ortdi (1.1-rasm, 3), lekin xuddi shu sharoitda 50 mikroM kempferol flavonoidi mitoxondrial megaporaga prooksidant ta'sir ko'rsatib (1.1-rasm, 4), mitoxondriyalar bo'kishini yanada tezlashtirdi va inkubasion muhitda noorganik fosfat yo'q holatdagi



mitoxondriyalarning 10 mikroM $\text{Ca}(2+)$ ionlari qo'shilgandagi holatiga nisbatan 13 barobarga, 1 mM noorganik fosfat qo'shilgandagiga nisbatan 4 barobardan ortiq oshirgani ma'lum bo'ldi. Keyingi tajribalarda 10 mikroM $\text{Ca}(2+)$ ionlari bor sharoitda 2 mM noorganik fosfat ionlari ta'sirida mitoxondriyalarning bo'kishi 1 mM noorganik fosfat qo'shilgandagiga nisbatan 2 barobarga ortishi aniqlandi (3.1-rasm, 5). Kempferol ishtirokida esa mitoxondriyalarning bo'kishi $\text{Ca}(2+)$ (10 mikroM) va noorganik fosfat (2 mM) ionlari ishtirokida flavonoid qo'shilmagandagiga nisbatan 3.5 barobarga yaqin ortganini guvohi bo'ldik (3.1-rasm, 6). Keyingi bosqichda esa 10 mikroM $\text{Ca}(2+)$ ionlari bor sharoitda 3 mM noorganik fosfat ionlari ta'sirida mitoxondriyalarning bo'kishi 2 mM noorganik fosfat ishtirokida mitoxondriyalarning bo'kishidan 2 barobarga yaqin ortganini ko'rib turibmiz (1.1-rasm, 7). Keyingi olib borilgan tajribalarda 50 mikroM kempferol flavonoidi ishtirokida 10 mikroM $\text{Ca}(2+)$ va 3 mM noorganik fosfat ionlari bo'lgan sharoitda flavonoid qo'shilmagandagiga nisbatan 2 barobarga mitoxondriyalarning bo'kishi ortganligini ko'rib turibmiz. Tajribalarni davom ettirgan holda 10 mikroM $\text{Ca}(2+)$ ionlari va 4 mM noorganik fosfat ionlari ishtirokida jigar mitoxondriyalarning bo'kishi 3 mM noorganik fosfat qo'shilganiga nisbatan 45,8 foizga ortishi aniqlandi (1.1-rasm, 9). Kempferol (50 mikroM) bilan davom ettirilgan tajribalarda 10 mikroM $\text{Ca}(2+)$ va 4 mM noorganik fosfat ionlari bo'lgan sharoitda mitoxondriyalarning bo'kishi flavonoid qo'shilmagandagi holatga nisbatan 27,4 foizga ortishi aniqlandi (1.1-rasm, 10). Keyingi tajribalarda 10 mikroM

$\text{Ca}(2+)$ ionlari va 5 mM noorganik fosfat ionlari ishtirokida jigar mitoxondriyalarning bo'kishi 4 mM noorganik fosfat qo'shilganiga nisbatan 40,3 foizga ortganligi ma'lum bo'ldi (1.1-rasm, 11). Kempferol (50 mikroM) bilan olib borilgan oxirgi tajribada 10 mikroM $\text{Ca}(2+)$ va 5 mM noorganik fosfat ionlari bo'lgan sharoitda mitoxondriyalarning bo'kishi flavonoid qo'shilmagandagi holatga nisbatan 8,4 foizga kamayishiga olib keldi (1.1-rasm, 12).

Olingan natijalarni tahlil qiladigan bo'lsak, ko'rinib turibdiki $\text{Ca}(2+)$ ionlari noorganik fosfat ionlari bo'lmagan sharoitda mitoxondrial megaporaning yuqori amplitudali konformasion ochiq holatga o'tishini ta'minlab bera olmas ekan va in vitro tajribalarda mitoxondrial megaporaning funksional holatda o'rganilishini ta'minlash uchun hamda fiziologik va patologik ochiq holatga o'tishida inkubasion muhitda ma'lum miqdorda noorganik fosfat ionlarining bo'lishi shart ekan. 1.1-rasmning 6, 8, 10, 11 va 12 tajriba natijalaridan ko'rinib turibdiki, ushbu holatlarda mitoxondrial megaporaning konformasion ochiq holatga o'tishi yuqori plata darajasiga erishar ekan. Bu borada 50 mikroM kempferol flavonoidining qo'llanilishi va uning prooksidant ta'siri bilan mitoxondrial megaporaning plata holatigacha ochilishini tezlashtirib berar ekan.

Megapora bu $\text{Sa}(2+)$ -uniportyor orqali mitoxondriyalarda ortiqcha miqdor $\text{Ca}(2+)$ ni akkumulyasiyasiga mitoxondrial kompensator javobdir. Bundan tashqari, siklofillin D $\text{Ca}(2+)$ ta'sirida stressga uchragan mitoxondriyalarda $\text{Sa}(2+)$ -uniportyor modulyasiyalashi mumkinligi ko'rsatilgan. YOvvoiy tip sichqonlarda ishemik adaptasiyalanish mitoxondriyalari



KFSH larini generasiyalashi ko'rsatilgan bo'lsa-da, siklofillin D yetishmaydigan sichqonlarda esa bunday natija kuzatilmasligi qayd etilgan. YOvvoi tip sichqonlar kardiomyositlarida ishemik adaptasiyalanish ma'lum darajada Akt (serin/treonin kinaza) fosforlanishini induksiya qiladi hamda bu holat SsA va N-2-merkaptopropionilglisin (KFSH larini o'ziga singdiruvchi) tomonidan oldi olinishi aniqlangan. In vivo tadqiqotlarda ham in vitro tadqiqotlarda olingan ishemik adaptasiyalanish natijalari olingan. SHunday qilib, megapora komponenti siklofillin D mitoxondriyalarda KFSH larini generasiyalanishi va Akt bilan Erk1/2 (ekstrahujayraviiy signal-boshqaruvchi kinaza) fosforlanishi zarur bo'lib, ishemik adaptasiyalanish ning asosiy signal bosqichlaridan ekanligi ko'rsatilgan (Hausenloy et al., 2010). Mitoxondriyalar matriksi metalloproteinazalarini ingibirlanishi Akt/Erk/siklofillin D/mitoxondrial megapora signal yo'lidan mustaqil ravishda kardioprotektor ta'sir ko'rsatib, mitoxondrial megapora ochilishini ingibirlanishidan keyingi holatga qo'shimcha bo'lib, yurakni ishemiya-reperfuziya holatida zararlanishdan himoyalovchi parallel yo'l ekanligi ko'rsatib berilgan.

Kalamush izolyasiyalangan yuragida rozuvastatin sezilarli darajada miokard infaktining o'lchamini kichraytirgan va yurak funksiyasini 5 va 10 nmol/l miqdorda yaxshilashi kuzatilgan. Bu modda superoksiddesmutaza (SOD) faolligini oshirib, malondialdegid (MDA) va KFSH lari miqdorini kamaytirgan. Moddaning bunday ta'siri PI3K-Akt (PI3K-Fosfoinozitol-3-kinaza) bilan GSK-3 β (Glikogen sintaza kinaza-3 β) fosforlanishini ortishi hisobiga yuz bergan bo'lib, bunda oksidativ

stressning oldi olinib, mitoxondrial megapora ochilishi ingibirlangan. Mitoxondrial megapora ochilishi natijasida miositlarda Ca(2+) ionlari miqdorini oshirish hisobiga, ATF-ga bog'liq giperkontrakturani induksiya qiladi kuzatilgan. Bu o'ziga xos holat nekrozning asosiy determinantlaridan bo'lgan reperfuziyaning birinchi minutlarida giperkontraktura bilan megapora ochilishi o'rtasidagi qarama-qarshi tuyulgan gipotezani muvofiqlashtirishi ko'rsatilgan (Ruiz-Meana et al., 2007).

Mitoxondrial megapora komponentlari o'zaro bir-biri bilan kardiolipin orqali bog'lanib, ATF-sintasomasini hosil qilishi mumkin. Ca(2+) bilan chaqirilgan konformasion o'zgarish mitoxondrial megapora ochilishiga olib kelib, bunda oqsillararo chegaralar buzilishi mumkinligi ko'rsatilgan. Mitoxondriyalar tashqi membranasi bilan bog'langan Bcl-2 oilasiga kiruvchi va geksokinaza (GK) oqsillari megapora hosil bo'lishida ishtirok etmasada, ular mitoxondriyalar ichki va tashqi membranalari oqsillari bilan o'zaro "kontakt joylar" hosil qilgan holatda boshqarishda ishtirok etadi. Bunda ishemik adaptasiyalanish reperfuziya holatida mitoxondriyalar bilan bog'langan GK2 yo'qotilishini oldini olgan holda kontakt uchastkalarni stabilashtirib, mitoxondrial megapora ingibirlaydi. Kontakt uchastkalarining uzilishi mitoxondrial megapora Ca(2+) sezgirligini oshirib, membranaaro bo'shliqdan sitoxrom s ni chiqishini tezlashtirib, KFSH lari hosil bo'lishini oshirib, mitoxondrial megapora ochilishiga olib kelishi ko'rsatilgan (Halestrap, Richardson, 2015).

Mitoxondriyalar membrana potentsiali (MMP) nafas zanjirining - I, III va



IV komplekslari tomonidan yuzaga keladigan, oksidlanishli fosforlanish jarayonida energiya yig'ilishi bilan kechadigan mitoxondriyalarning muhim funksional holati hisoblanadi. Bu yerda MMP protonlar gradienti bilan birgalikda transmembrana potensialini hosil qiladi va mitoxondriyalar ichki membranasining matriks tomonida ADF bilan noorganik fosfatdan ATF-sintaza ishtirokida ATF sintezlanadi. Tadqiqot ob'ekti va predmeti. Tadqiqotning ob'ekti sifatida kalamush jigari mitoxondriyalari, mitoxondriyalardagi kalsiyga bog'liq siklosporin A-sezgir megapora, ATF bog'liq kaliy kanal, fosfat-ionlar, magniy-ionlari, kversetin va kempferol flavonoidlari olingan.

Tadqiqotning predmeti fosfat-ionlarining va magniy-ionlarining konsentrasiyaga bog'liq ta'siri va ushbu holatlarda kversetin va kempferol flavonoidlarini ta'sir samarasi

Mitoxondriyalarni ajratish

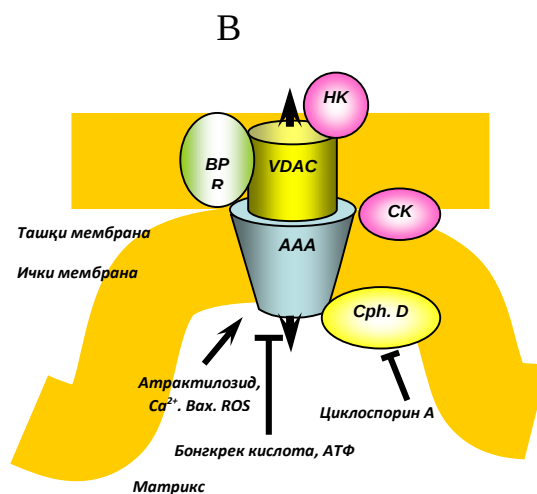
Kalamush jigari mitoxondriyalari SHneyder usuli bo'yicha (Schneider, Hogeboom, 1951) differensial syentrifugalash metodi yordamida ajratildi. Hayvon dekapitasiya qilingandan so'ng, qorin bo'shlig'i ochilib, jigar ajratib olindi va stakandagi muzlatilgan ajratish muhitiga solindi. Ajratish muhiti tarkibi quyidagicha: 250 mM saxaroza, 10 mM tris-xlorid, 1 mM EDTA, rN 7,4. Kalamush dekapitasiya qilingandan keyin, jigarni ajratib olib, ajratish muhitiga solindi va tarozida uning massasi o'lchandi. Jigar to'qimasi teshiklari diametri 1 mm bo'lgan mikropressdan o'tkazilib, maydalandi. Maydalangan jigar to'qimasi shishali gomogenezatorda 1:6 nisbatda ajratish muhiti qo'shib, teflonli pestik yordamida gomogenezasiya qilindi. Hosil bo'lgan gomogenat RS-6 syentrifuga

probirkasida syentrifugalandi. Syentrifuga kamerasi harorati 0-2°S ni tashkil qildi va syentrifugalash jarayoni 2 bosqichda olib borildi. Birinchi bosqichda, syentrifugalashda minutiga 1500 aylanish tezligida 7-8 minut davom etdi. Bu vaqtda to'qima parchalanmagan qismlari va hujayralar cho'kmaga tushadi. Cho'kma usti supernatanti boshqa toza probirkaga olinib, ikkinchi marta syentrifuga qilish uchun rotorga joylashtirildi. Ikkinchi bosqichda syentrifugalash minutiga 6000 aylanish tezligida 15 minut davomida amalga oshirildi. So'ngra probirka rotordan olinib probirka tubiga cho'kkan mitoxondriyalar supernatantdan ajratildi. Probirka devorlaridagi suyuqlik qoldiqlari va yog' bo'laklari filtr qog'oz yordamida tozalandi. Ajratish muhitidan tozalangan mitoxondriyalarni pipetka yordamida maxsus idishga olindi. Tajribalar o'tkazish uchun mitoxondriyalar 10:1 nisbat hajmda EDTAsiz ajratish muhitida suyultirildi va muz solingan idishda saqlandi.

Mitoxondriyalardagi megapora holatini o'rganish

Mitoxondriyalarning bo'kish kinetikasi (mitoxondriya oqsili 0,3-0,4 mg/ml ni tashkil qildi) 3 ml yacheykalarda 540 nm to'lqin uzunligida optik zichlikning o'zgarishi bo'yicha aniqlandi (He, Lemasters, 2003). Mitoxondriya megakanalini o'rganish uchun inkubasion muhit tarkibi: KSI - 125 mM, KN2R04 - 1 mM, suksinat - 5 mM, Ca²⁺-EGTA-bufer 20 - mkM, Hepes - 20 mM, tris-HCl - 20 mM, rotenon - 2 mkM, oligomisin - 1 mkg/ml, rN 7,2. Kaliy fosfatning (KN2R04) turli konsentrasiyalarining ta'siri (1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM va 5 mM) holatda kalsiyga bog'liq siklosporin a - sezgir poraning faoliyati o'rganildi va xuddi shu sharoitda

kversetin va kempferol
antioksidantlarining ta'siri tadqiq etildi.



Mitoxondriyalardagi ATF-bog'liq kaliy kanalini o'tkazuvchanligini aniqlash

MitoKatf-kanal o'tkazuvchanligi 540 nm to'liq uzunligida optik zichligining o'zgarish dinamikasi bo'yicha aniqlandi. Muhitda mitoxondriya oqsili 0,3-0,4 mg/mlni tashkil etdi. Inkubasiya muhiti quyidagicha bo'ldi: 125 mM KCl, 10 mM Hepes, 5 mM suksinat, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM K₂HPO₄, 2,5 mM KH₂PO₄, 0,005 mM rotenon i 0,001 mM oligomisin, rN 7,4 (Vadzyuk, Kosterin, 2008).

Mitoxondriyalarda oqsil miqdorini aniqlash

Oqsilni biuret reaksiyasi (Watters, 1978) bo'yicha aniqladik. Biuret reaktivini tayyorlash uchun 750 mg mis kuporosi (CuSO₄ x 5H₂O) va 3 g natriy kaliy oksalat (NaKC₄H₄O₆ x 4H₂O) 500 ml H₂O da eritdik. Tayyorlangan eritmaga oksidlanishni to'xtatish uchun 150 ml 10% li NaON va 1 g KJ qo'shdik va 1 l hajmga keltirib polietilen idishda saqladik.

Mitoxondriyalar suspenziyasidagi oqsilni aniqlash uchun 0,1 ml preparat suspenziyasiga membranalarni buzish

uchun 0,9 ml 2 n KON va 10 mg dezoksixol kislotasini qo'shdik. Oqsil to'liq erib bo'lgandan so'ng 4 ml biuret reaktivini solib xona haroratida 30 min.ga qoldirdik. Bir vaqtning o'zida nazorat probasini (1 ml 2n KON + 10 mg dezoksixol kislota + 4 ml biuret reaktivi) tayyorladik. So'ng qalinligi 10 mm bo'lgan kyuvetalarda 540 nm da optik zichligini aniqladik. Oqsil miqdorini qoramol zardobi albumini standartlarini optik zichligi bo'yicha olingan kalibrovka egriligi bo'yicha hisobladik.

ADABIYOTLAR SHARHI

Mitoxondriyalar va ularning funksiyasi

Turli hujayralarda joylashgan mitoxondriyalar organizm uchun zarur bo'lgan bioenergetik jarayonlarni amalga oshirishda asosiy hujayra organoidi hisoblanadi va makroergik energiya manbai hisoblangan adenozintrifosfat kislotaning (ATF) sintezlanishini ta'minlaydi. Mitoxondriyalarda ushbu jarayonlarni amalga oshishi uning membranalari orqali sodir bo'ladigan ion-transport tizimlari bilan bevosita bog'langan. Hujayra mitoxondriyalarida sodir bo'ladigan bu



jarayonlar mexano-kimyoviy jarayonlar hisoblanadi. Mitoxondriyalar membranasi funksiyasi juda murakkab va turli-tumandir. Mitoxondriyalar (diametri ~0,5-1 nm, uzunligi ~2-5 nm) ikkita membranaga ega organoid hisoblanadi va Krebs sikli, elektronlarning nafas zanjiri bo'ylab tashilishi orqali metabolik jarayonlarda ishtirok etadi va ATF sintezini ta'minlaydi (Allen et al., 2004).

Xulosa:

Mitoxondriyalar membranasi joylashgan Ca^{2+} bog'liq SsA-sezgir megapora funksional holatini namoyon bo'lishida noorganik fosfat ionlari muhim

funksiyani bajarib, Ca^{2+} ionlari bilan birgalikda fosfat ionlar ham mitoxondrial megapora fiziologik va disfunktsional holatlarini boshqarishda ishtirok etishi aniqlandi. SHu bilan birga kempferol flavonoidi 50 mikromol konsentratsiyada prooksidant faolligini namoyon qildi.

Mitoxondriyalar mitoKatf-kanal faolligida magniy ionlari ham o'ziga xos funksiyani bajarib, uning faollashishini ta'minlashda muhim o'rin tutadi. Magniy ionlari miqdorini oshirilishi mitoKatf-kanal faolligini susayishiga sabab bo'ldi va bunda kempferol va kversetin flavonoidlari mitoKatf-kanal faolligiga faollashtiruvchi ta'sirini namoyon qildi.

References:

1. "Jigar mitoxondriyalari funksional parametrlarini tavsiflash" Isaqulova S.N.
2. elib.buxdu.uz
3. medlife.uz
4. www.google.com