

УДК 576.895.132 : 591.12 : 577.121

**ДЕЙСТВИЕ ГОМОГЕНАТОВ РАЗНЫХ ФАЗ РАЗВИТИЯ
НЕМАТОДЫ *PROTOSTRONGYLUS RUFESCENS* (LEUCKART, 1895)
НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ И БИСЛОЙНЫЕ
ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ**

© А. Э. Кучбоев, И. Казаков, М. И. Асраров, Д. Т. Исакова,
Д. А. Азимов, В. И. Голованов

Институт зоологии
ул. А. Ниязова, 1, Ташкент, Узбекистан, 700095
Поступила 02.02.2006

В статье приводятся результаты изучения действия гомогенатов разных фаз развития нематоды *Protostrongylus rufescens* на митохондриальные и бислойные липидные мембраны. Показано, что гомогенат нематод *P. rufescens* эффективно влияет на энергетику клетки, ингибируя дыхание митохондрий в метаболическом состоянии V₃, разобщает окислительное фосфорилирование и действует на функции митохондрий на уровне циклоспорин А-чувствительной поры, приводя ее в высокопроницаемое состояние. Кроме того, гомогенат нематод при концентрации 1 мкг/мл эффективно увеличивает интегральную проводимость бислойных липидных мембран (БЛМ). Увеличение этой проводимости, по всей вероятности, связано с формированием одиночных ионных каналов. Каналы, индуцированные гомогенатом нематод в БЛМ, имеют катионную селективность. Масштаб этих нарушений предлагается рассматривать как метаболический критерий для оценки взаимоотношений в системе «паразит—хозяин».

Нематоды *Protostrongylus rufescens* (сем. Protostrongylidae Leiper, 1926) адаптировались к обитанию в респираторной системе и широко представлены у полорогих животных. В качестве облигатных промежуточных хозяев этих нематод отмечены наземные моллюски *Xeropicta candaharica* (Кулмаматов и др., 1994).

Ранее нами (Азимов и др., 1995; Kazakov et al., 2004) было высказано предположение, что в процессе жизнедеятельности нематод в кровь поступают некоторые продукты метаболизма гельминтов, или гельминтотоксины, которые отрицательно влияют на функции органов и систем.

Попадая в организм животных, токсины или метаболиты гельминтов в больших дозах или по мере их накопления в органах и тканях в первую очередь взаимодействуют с мембранными структурами, изменяя их проницаемость и активность мембраносвязанных процессов. В связи с этим становится актуальным изучение конкретных механизмов влияния гельминтотоксинов на функции биомембран. Бислойные липидные мембраны (БЛМ) и мембраны митохондрий можно рассматривать в качестве наиболее вероят-

ной и чувствительной системы для изучения токсических эффектов различных веществ.

Выделяемые в процессе жизнедеятельности нематод вещества или продукты их распада в организме хозяина вызывают патологический эффект, иногда с летальным исходом хозяина. Тем не менее работы, посвященные изучению механизма действия продуктов жизнедеятельности гельминтов на организм хозяина на уровне митохондриальных и бислойных липидных мембран, отсутствуют.

В связи с этим нами изучено действие гомогенатов нематоды *P. rufescens* и мышцы ноги моллюсков *X. candaharica*, зараженных личинками протостронгил, на функции мембран митохондрий и на проницаемость БЛМ, а также состояние сыворотки крови зараженных протостронгилидами овец.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В экспериментах использованы свежие нематоды *P. rufescens* из легких овец, экспериментально зараженных личинками в лабораторных условиях. Головную часть нематоды растирали в ступке в небольшом объеме дистиллированной воды, центрифугировали 5 мин при 1000 g. Надосадочную жидкость лиофилизовали. Препарат в высушенном виде хранили при температуре 4 °С. Как показали эксперименты, активность препарата в этих условиях сохраняется в течение длительного времени. Гомогенат мышцы ноги моллюсков *X. candaharica*, зараженных личинками протостронгилид, был подготовлен аналогичным способом.

Митохондрии выделяли из печени белых крыс методом дифференциального центрифугирования (Schneider, 1948). Среда выделения содержала 250 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ трис-НСI, рН 7.4.

Влияние различных доз гомогенатов нематод на проницаемость мембран митохондрий печени крыс оценивали по кинетике набухания митохондрий с помощью измерения оптической плотности при 540 нм на фотометре ЛМФ-69. Среда инкубации содержала сахарозу 250 мМ, 10 мМ трис-НСI, 1 мМ ЭГТА, рН 7.4.

Скорость окисления субстратов митохондрий измеряли при помощи полярографа с использованием платинового электрода типа Кларка. Скорость дыхания в метаболическом состоянии V_4 (состояние покоя) и V_3 (дыхание, активированное добавлением АДФ), а также величины дыхательного контроля (ДК) и АДФ/О определяли по методу Чанса (Франк и др., 1973), исходя из того что количество кислорода в 1 мл среды инкубации при 26 °С составляет 500 нг-атом кислорода.

Бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали методом, описанным Мюллером и др. (Mueller 1963). Основная часть работы проводилась с мембранами из общих фосфолипидов бычьего мозга, выделенных по методу Хара и Радина (Hara, Radin, 1978). Токи через одиночные каналы измерялись в режиме фиксации мембранного потенциала электрометрическим вольтметром В7-30 с входным сопротивлением 10^{12} ом. Вольтметр В7-30 рассчитан на работу с обратной связью и имеет коэффициент усиления порядка 10^3 . Ток от мембраны отводился с помощью хлорсеребряных электродов с агаровыми мостиками, заполненными 3 М КСI. Запись мембранного тока и потенциала производилась при помощи потенциометра КСП-4. Для регистрации тока через одиночные каналы использовали мембраны, полученные на ячейке с малым диаметром ($d = 0.3$ мм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Приведенные опыты показали, что в контроле, т. е. в сахарозной среде, митохондрии не набухают. Однако добавление в инкубационную среду гомогената гельминтов в концентрации 150 мкг/мл вызывало набухание митохондрий печени крыс, что указывает на переход мембран митохондрий в высокопроницаемое состояние (permeability transition pore — РТР).

В экспериментах эффект гомогената зависел от концентрации добавляемой дозы, т. е. с увеличением концентрации гомогената увеличивалась скорость набухания митохондрий. При концентрации 150 мкг/мл гомогената митохондрии начинали набухать, что указывает на начало открытия поры. С увеличением концентрации гомогената до 500 мкг/мл скорость набухания митохондрий увеличивалась в 10 раз по сравнению с контролем. Таким образом, эти опыты показывают, что гомогенат гельминтов эффективно влияет на состояние ЦсА-чувствительной поры митохондрий, приводя ее в высокопроницаемое состояние.

В настоящее время предполагают, что ведущая роль в функционировании животных клеток и регуляции многих метаболических процессов, а также в развитии различных патологических процессов принадлежит циклоспорин А-чувствительной поре митохондрий (Halestrap, 1989; Pfeiffer, 1989). Открытое состояние ЦсА-чувствительной поры приводит к резкому увеличению проницаемости внутренней митохондриальной мембраны (Gunter, Pfeiffer, 1990), мембранной деполяризации, разобщению окислительного фосфорилирования, выходу внутримитохондриальных ионов и метаболических интермедиатов, а также высокоамплитудному митохондриальному набуханию (Halestrap, Davidson, 1990). Эти изменения могут способствовать развитию патологических процессов в тканях, органах и организме в целом.

Как отмечено выше, открытое состояние поры приводит к резкому увеличению проницаемости внутренней мембраны митохондрий, разобщению окислительного фосфорилирования и набуханию митохондрий.

В связи с этим в следующих опытах мы изучили действие гомогената нематод на энергетический метаболизм клетки, т. е. на дыхание и окислительное фосфорилирование изолированных митохондрий. Полярнографическое изучение влияния гомогената нематод на функции митохондрий показало, что добавление гомогената в инкубационную среду в концентрации 75 мкг/мл практически не изменяет параметры дыхания и окислительного фосфорилирования (см. таблицу). Гомогенат проявляет свою активность начиная с концентрации 150 мкг/мл. При этой концентрации наблюдается уменьшение дыхания в состоянии V_3 на 5.5 % и увеличение в состоянии V_4 на 14 % по сравнению с контролем. При этом наблюдалось незначительное уменьшение коэффициента АДФ/О, величина дыхательного контроля была чуть ниже уровня контроля.

Увеличение концентрации гомогената до 300 мкг/мл в инкубационной среде приводит к дальнейшему уменьшению дыхания в состоянии V_3 (на 43 %) и увеличению в состоянии V_4 (на 50 %) по сравнению с контролем. При этом наблюдается разобщение окислительного фосфорилирования, коэффициент АДФ/О равен 1.50.

Как видно из таблицы, в этих экспериментах коэффициенты дыхательного контроля (ДК) и АДФ/О при действии гомогената нематод также понижаются. Полное разобщение окислительного фосфорилирования наблюдается при концентрации гомогената 500 мкг/мл в инкубационной среде.

Влияние гомогената нематоды *Protostrongylus rufescens*
на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий
Effect of nematode homogenate of *Protostrongylus rufescens*
of the respiration and oxidizing phosphorylation in mitochondria

Условия опыта	Дыхание (нг-атом О/мин мг белка)		ДК	АДФ/О
	V ₃	V ₄		
Контроль	74.5 ± 2.2	20.3 ± 1.3	3.67 ± 0.02	1.95 ± 0.07
Гомогенат, 75 мкг/мл	73.4 ± 2.0	20.7 ± 1.0	3.54 ± 0.03	1.95 ± 0.09
Гомогенат, 150 мкг/мл	70.4 ± 2.4	23.2 ± 1.2	3.03 ± 0.04	1.82 ± 0.06
Гомогенат, 200 мкг/мл	63.6 ± 2.7	26.5 ± 1.6	2.41 ± 0.03	1.66 ± 0.06
Гомогенат, 300 мкг/мл	55.7 ± 2.5	30.5 ± 1.4	1.82 ± 0.03	1.50 ± 0.04
Гомогенат, 400 мкг/мл	42.5 ± 2.4	35.6 ± 1.7	1.19 ± 0.04	1.61 ± 0.05
Гомогенат, 500 мкг/мл	27.0 ± 2.6	27.0 ± 1.4	1.00	—

Примечание. Среда инкубации: сахароза — 125 мМ, КСl — 60 мМ, КН₂РO₄ — 2.5 мМ, сукцинат — 5 мМ, трис-НСl — 5 мМ, рН — 7.4; добавки АДФ до конечной концентрации 0.2 мМ. Концентрация белка 3 мг/мл; приведены средние значения пяти экспериментов.

Таким образом, можно сделать вывод, что гомогенат нематоды *P. rufescens* эффективно влияет на энергетику клетки, ингибируя дыхание митохондрий в метаболическом состоянии V₃, и разобщает окислительное фосфорилирование.

В опытах на БЛМ показано, что введение 1 мкг/мл гомогената нематоды *P. rufescens* в один из отсеков экспериментальной ячейки приводило к повышению проводимости БЛМ. Дальнейшее увеличение количества гомогената сопровождалось разрушением мембраны и уменьшением среднего времени жизни мембраны, т. е. мембрана дестабилизировалась и разрушалась.

Анализ гистограммы амплитудного распределения яд-индуцированных каналов показывает, что в БЛМ наиболее вероятны каналы с проводимостью 80 ± 10 пС (в среде, содержащей 100 мМ КСl и 5 мМ трис-НСl, рН = 7.5).

С помощью техники регистрации одиночных каналов обнаружено увеличение проводимости БЛМ, а модифицирование гомогенатом обусловлено образованием каналов проводимости (рис. 1).

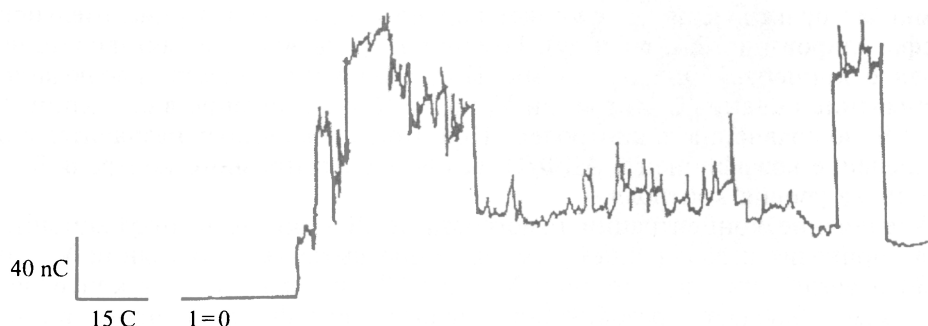


Рис. 1. Записи тока через каналы, образуемые гомогенатом нематоды *Protostrongylus rufescens*. Среда: 5 мМ трис-НСl, рН — 7.5, 100 мМ КСl. Концентрация гомогената 5 мкг/мл. Потенциал на мембране 100 мВ.

Fig. 1. Records of the electric current through the channels forming by the effect of the homogenate of *Protostrongylus rufescens*.

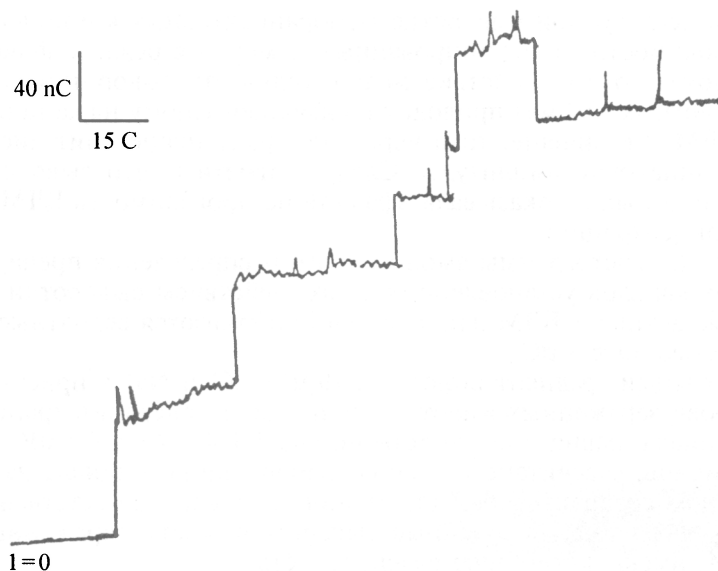


Рис. 2. Записи тока через каналы, образуемые гомогенатом мышцы моллюсков *Xeropicta candaharica* (инвазированных личинками протостронгилид).

Обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. Records of the electric current through the channels forming by the effect of the homogenate of the muscle tissue extracted from the mollusk *Xeropicta candaharica* infected by the Protostrongylidae larvae.

Десятикратный градиент концентрации ионов Na^+ и K^+ ($1 \text{ mM} \div 10 \text{ mM}$) в присутствии гомогената приводил к генерации трансмембранного потенциала, равного 40 ± 3 и $48 \pm 2 \text{ мВ}$.

Знак потенциала «минус» со стороны раствора с высокой концентрацией электролита. Число переноса катионов, рассчитанное на основе потенциала, возникающего на БЛМ при десятикратном градиенте концентрации ионов Na^+ и K^+ , равно 0.85 и 0.92 соответственно.

Все эти данные указывают на то, что бислойные липидные мембраны, модифицированные гомогенатом нематод, обладают преимущественно катионной избирательностью.

В опытах на БЛМ показано, что добавка 10 мкг/мл гомогената мышцы ноги моллюсков *X. candaharica*, инвазированных личинками протостронгилид, в отсек экспериментальной ячейки приводила к повышению проводимости БЛМ (рис. 2).

Дальнейшее увеличение количества гомогената сопровождалось разрушением мембраны и уменьшением среднего времени жизни мембраны, т. е. мембрана дестабилизировалась и разрушалась.

Кроме того, было исследовано действие сыворотки крови зараженных протостронгилидами овец.

Установлено, что добавка 10 мкг/мл сыворотки крови зараженных животных в среду, содержащую 100 мМ KCl , 5 мМ трис- HCl , pH 7.5, увеличивала проводимость БЛМ. Дальнейшее повышение содержания сыворотки сопровождалось уменьшением средней продолжительности жизни мембран, т. е. мембрана дестабилизировалась и разрушалась. Одна из причин такой лабильности и последующей деструкции, по всей вероятности, связана с

наличием в исследуемой сыворотке мембраноактивных компонентов. Изучение проводимости модифицированных мембран в режиме фиксации потенциала показало, что действие малых количеств сыворотки крови зараженных животных (0.2 мл) приводит к скачкообразному нарастанию проводимости БЛМ. Увеличение тока через мембрану происходит дискретными скачками одинаковой амплитуды. Следует отметить, что сыворотка крови здоровых животных не оказывала эффекта на проводимость БЛМ даже при больших концентрациях.

При анализе гистограммы амплитудного распределения препарата индуцированных каналов установлено, что под действием сыворотки крови зараженных животных в БЛМ наиболее часто образуются вероятные каналы с проводимостью 40 ± 8 пС.

Десятикратный градиент ионов ($1 : 10$ мМ) K^+ и Na^+ в присутствии сыворотки крови зараженных животных приводит к генерации трансмембранного потенциала, равного соответственно 43 ± 0.4 и 44 ± 0.7 мВ. Число переноса катионов, рассчитано на основе измерения потенциала на БЛМ при десятикратном градиенте по данному ионам, равно соответственно 0.86 и 0.87, т. е. каналы, индуцированные сывороткой крови зараженных животных в БЛМ, имеют катионную селективность.

На основании проведенных исследований установлено, что в гомогенате нематод и сыворотке крови зараженных животных имеются мембраноактивные компоненты, которые способны образовывать в БЛМ одиночные ионные каналы.

Полученные экспериментальные данные расширяют традиционные представления о механизме действия «гельминтотоксинов» на функции митохондрий и БЛМ и в целом на энергетический метаболизм клетки и на организм животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках международного гранта Р-114 между УНТЦ (Украина), Институтом зоологии АН РУз (Узбекистан) и Министерства сельского хозяйства Служба сельскохозяйственных исследований (США). Выражаем благодарность партнерам за повседневную помощь в проведении исследований в течение 2003—2004 гг.

Список литературы

- Азимов Д. А., Расулов Р., Казаков И. К., Голованов В. И. Действие экстракта гельминтов на бислойные липидные мембраны // *Организм и среда*. Ташкент: Фан, 1995. С. 146—147.
- Кулмаматов Э. Н., Исакова Д. Т., Азимов Д. А. Гельминты позвоночных горных экосистем Узбекистана. Ташкент: Фан, 1994. 152 с.
- Франк Г. М., Кондрашова М. Н., Мохова Е. Н., Ротенберг Ю. С. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом М.: Наука, 1973. 224 с.
- Halestrap A. P. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role of control of mitochondria metabolism // *Biochem. and Biophys. Acta: Bioenergetics*. 1989. Vol. 973. P. 355—382.
- Halestrap A. P., Davidson A. M. Inhibition of Ca^{2+} -induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporine is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase // *Biochem. Journ.* 1990. Vol. 268. P. 153—160.

- Hara A., Radin N. S. Lipid extraction of tissues with a lowtoxicity silvent // Journ. Anal. Bioch. 1978. Vol. 9, N 1. P. 420—426.
- Gunter T. E., Pfeiffer D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium // Am Journ. Physiol. 1990. Vol. 258. P. 755—786.
- Kazakov I. K., Abubakirova M. E., Kuchbaev A., Azimov D. A. The effect of helminth extract on the bilayer lipid membranes // EMOP-IX European Multicolloquium of Parasitology (Valencia, July 18—23 2004) Valencia. 2004. P. 534.
- Mueller O., Rudin D. O., Tien h. t., Wescott W. C. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution // Journ. Phys. Chem. 1963. Vol. 67. P. 534—535.
- Pfeifer D. R. Release of mitochondrial matrix proteins through a Ca^{2+} requiring, cyclosporin-sensitive pathway // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. Vol. 161, N 2. P. 619—625.
- Schneider W. Isolation of mitochondria from rat liver // Journ. Biol. Chem. 1948. Vol. 176, N 1. P. 250—253.

THE EFFECT OF THE HOMOGENATES
FROM DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES
OF THE NEMATODE *PROTOSTRONGYLUS RUFESCENS* (LEUCKART, 1895)
ON MITOCHONDRIAL AND LIPID BILAYER MEMBRANES

A. E. Kuchboev, I. Kazakov, M. I. Asrarov, D. T. Isakova,
D. A. Azimov, V. I. Golovanov

Key words: *Protostrongylus rufescens*, Nematoda, *Xeropicta candaharica*, homogenate, mitochondria, lipid bilayer membrane.

SUMMARY

The effect of the homogenates from different developmental stages of the nematode *Protostrongylus rufescens* on mitochondrial and lipid bilayer membranes has been studied. The homogenate of *P. rufescens* affects efficiently the cell energy by the inhibition of the mitochondrial respiration in the metabolic state V_3 , uncouples oxidative phosphorylation and affects the functions of mitochondria at the level of cyclosporine A-sensitive pore by making it highly permeable. Moreover, the nematode homogenate at the concentration of 1 mg/ml increases efficiently the integral permeability of lipid bilayer membranes. An increase in this permeability is connected apparently with the formation of single ion channels. The channels of lipid bilayer membranes induced by the nematode homogenate show cation selectivity.