

## ТРАНСПОРТ ГЛИЦЕРИНА В МИТОХОНДРИИ

© 2021 г. А.И. Даль\*, Н.Л. Векшин\*\*

\*Пуцинский государственный естественно-научный институт,  
142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 3

\*\*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: aleksandrina.dal@mail.ru

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 04.09.2020 г.

Принята к публикации 06.12.2020 г.

Рассмотрен вопрос о поступлении молекул глицерина (в нефосфорилированной форме) внутрь митохондрий. С помощью спектрофлуориметрии и ИК-Фурье-спектроскопии продемонстрировано эффективное связывание глицерина с митохондриальными мембранами из печени крысы. Методами полярографии и турбидиметрии показано, что в малых концентрациях (0.1–0.4 мМ) глицерин повышает проницаемость внутренней мембраны для субстратов – НАДН и сукцината, а в больших концентрациях сильно повреждает мембраны. Глицерин в малых концентрациях усиливает потребление кислорода интактными митохондриями (в изотонической среде) на НАДН или на сукцинате, а в больших – угнетает. В гипотонической среде глицерин сразу начинает подавлять НАДН-дегидрогеназу, но не сукцинатдегидрогеназу. Полученные данные позволяют заключить, что глицерин может сам по себе напрямую транспортироваться (пассивно по градиенту) внутрь митохондрий, а не только в форме глицерофосфата. Предполагается, что глицерин, взаимодействуя с липидами и белками, формирует во внутренней мембране каналы для проникновения себя и субстратов.

*Ключевые слова:* митохондрии, глицерин, потребление кислорода, НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, дыхательная цепь

DOI: 10.31857/S0006302921020071

Общепринято, что глицерин транспортируется внутрь митохондрий в форме альфа-глицерофосфата, образующегося в цитоплазме [1]. В печени имеется фермент глицеролкиназа, катализирующий в цитозоле фосфорилирование глицерина в глицерофосфат, который проникает в митохондрии и превращается в 3-фосфоглицериновый альдегид. Внутри митохондрий имеется своя фосфоглицериндегидрогеназа, отдающая электроны и протоны в дыхательную цепь, что сопровождается синтезом двух молекул АТФ. Значительная часть глицерина, образующегося при гидролизе липидов, используется для их ресинтеза [1].

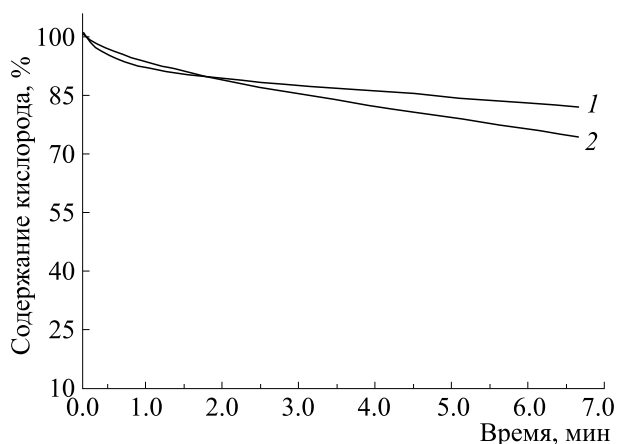
Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что некоторое количество добавленного глицерина ингибирует сукцинат-зависимое дыхание митохондрий (хотя мало влияет на шунтирующие реакции переноса электронов к искусственным акцепторам) [2]. Представляет интерес подробнее изучить способность глицерина влиять на активность дегидрогеназ дыхательной цепи. Главное – важно понять, может ли глицерин сам по себе (в нефосфорилированном виде) проникать извне

внутри митохондрий. Выяснение этих вопросов и было целью данной работы.

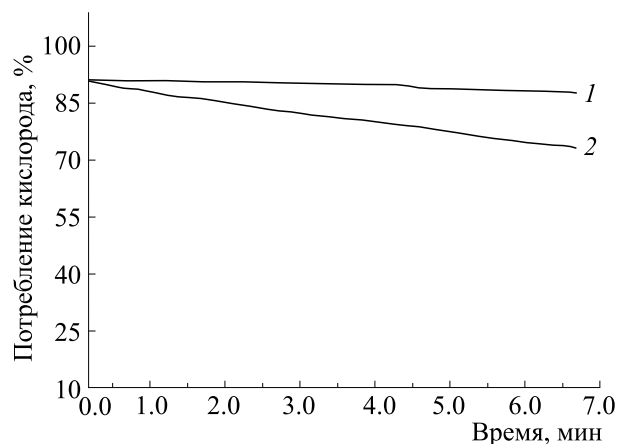
### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фракцию митохондрий из печени крысы выделяли по стандартной методике с небольшими модификациями [2], все растворы охлаждали на льду. Печень крысы помещали в 40 мл ледяной среды выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 0.5 мМ ЭГТА и 10 мМ HEPES (pH 7.5), после чего ее продавливали через пресс, добавляли 40 мл той же среды и затем проводили гомогенизацию в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения неразрушенных клеток. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали 20 мин при 3500 g (тяжелая фракция митохондрий). Полученный осадок осторожно гомогенизировали в 5–8 мл среды выделения и затем брали для опытов (хранили на льду и использовали в течение нескольких часов).

В полярографических опытах изотоническая среда инкубации митохондрий содержала 150 мМ



**Рис. 1.** Потребление кислорода в суспензии печеночных митохондрий (2 мг /мл) в изотонической среде при добавке 1 мМ НАДН (1) и то же в присутствии 400 мкМ глицерина (2). По оси ординат – содержание кислорода в процентах (100% соответствуют 250 мкМ в воде при нормальном атмосферном давлении).



**Рис. 2.** Потребление кислорода в суспензии митохондрий в изотонической среде при добавке 1 мМ сукцината (1), то же самое в присутствии 400 мкМ глицерина (2).

сахарозы и 10 мМ трис-фосфатного буфера (рН 7.0). Гипотоническая среда инкубации содержала только 40 мМ хлорида натрия (рН 7.0).

Измерение потребления кислорода суспензией митохондрий в герметичной ячейке объемом 2.6 мл при перемешивании (в изотонической или гипотонической среде при добавлении сукцината или НАДН) проводили полярографическим методом с использованием термооксиметра «Эксперт-001» (ООО «Эконикс», Россия) с электродом Кларка.

Светорассеяние митохондрий измеряли турбидиметрически при 700 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре «ПЭ-5400УФ» (ООО «ПромЭкоЛаб», Санкт-Петербург) по оптической плотности мутной суспензии. Концентрацию митохондриального белка определяли на том же приборе по оптической плотности триптофановых остатков при 286 нм (после разрушения митохондрий детергентом додецилсульфатом натрия, устраняющим светорассеяние) [3].

Спектры ИК-поглощения митохондриальных суспензий, помещенных и высушенных на прозрачных пластинах фторида кальция, регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре FT-801 («Симекс», Новосибирск). Образцы получали путем центрифугирования суспензий без глицерина (контроль) и в присутствии 100–400 мкМ глицерина (опыт). Супернатанты отбрасывали и высушивали 50 мкл осадка на пластинах с помощью конвекции теплого воздуха. Для ИК-спектроскопии митохондрии специально выделяли в 300 мМ хлорида натрия – без добавления сахарозы и дру-

гих реагентов, мешающих измерениям в средней ИК-области.

Спектры триптофановой флуоресценции белков разбавленных суспензий митохондрий (0.1–0.3 мг/мл) регистрировали на спектрофлуориметре SLM-4800 (SLM Inc., США) при возбуждении на 286 нм в кварцевых микрокюветах с длиной оптического пути 0.4 см.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость дыхания изолированных митохондрий лимитируется в первую очередь проницаемостью внутренней мембраны для добавляемых субстратов дыхательной цепи [4]. Внутренняя мембранная НАДН-дегидрогеназа, активный центр которой обращен в матрикс, слишком медленно окисляет НАДН, добавленный к свежевыделенным нативным митохондриям в изотонической среде, именно из-за своей низкой проницаемости (нет никакой «внешней» НАДН-дегидрогеназы в наружной мембране [2, 4]). Молекула сукцината, имеющая гораздо меньший размер, чем молекула НАДН, лучше проникает внутрь митохондрий и поэтому окисляется с более заметной скоростью [4].

При добавлении небольших (0.1–0.4 мМ) количеств глицерина к суспензии свежевыделенных печеночных митохондрий, помещенных в изотоническую среду, наблюдается активация НАДН-зависимого (рис. 1, табл. 1) и сукцинат-зависимого дыхания (рис. 2, табл. 1). Активация вызвана тем, что молекулы глицерина повышают проницаемость внутренней мембраны. Глицерин, встраиваясь в отдельные участки липидной фазы, вероятно, нарушает их (рис. 3). В результате НАДН и сукцинат легче входят внутрь, где и

**Таблица 1.** Скорость потребления кислорода (в мкМ/мин/мг) в суспензии печеночных митохондрий

Глицерин, мкМ	0	100	200	400	900
Скорость на НАДН в изотонии	28 ± 3	43 ± 3	39 ± 3	50 ± 4	41 ± 3
Скорость на сукцинате в изотонии	11 ± 3	17 ± 3	26 ± 3	81 ± 5	34 ± 3
Скорость на НАДН в гипотонии	120 ± 5	90 ± 5	50 ± 4	40 ± 4	—
Скорость на сукцинате в гипотонии	145 ± 5	110 ± 5	120 ± 5	130 ± 5	—

Примечание. Концентрация митохондрий в суспензии – 2 мг/мл. Изотоническая среда: митохондрии выделяли в среде, содержащей сахарозу – 250 мМ, ЭГТА – 0.5 мМ, НЕРЕС – 10 мМ, рН 7.4; для полярографии использовали изотоническую среду, содержащую сахарозу – 150 мМ, трис-фосфатный буфер – 10 мМ, рН 7.0. Гипотоническая среда: митохондрии выделяли в 300 мМ NaCl, для полярографии использовали дистиллированную воду (2 мл), добавляя туда митохондрии (0.5 мл), концентрация NaCl в итоге составляла 40 мМ..

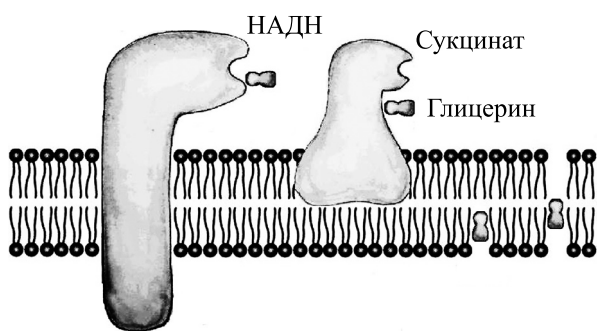
окисляются в активных центрах своих дегидрогеназ.

Зависимость дыхания от концентрации глицерина имеет сложный характер как в случае НАДН, так и в случае сукцината (рис. 4, табл. 1). При малых количествах глицерина в обоих случаях имеет место ускорение, обусловленное повышением мембранной проницаемости, а в более высоких – угнетение, что может быть связано как с прямым действием глицерина на дегидрогеназы, так и со слишком сильным повреждением мембран или (и) торможением ферментов за счет высокой микровязкости при связывании глицерина в активном центре. О повреждении свидетельствует уменьшение светорассеяния суспензии митохондрий. Так, при добавлении глицерина свыше 0.9 мМ наблюдалось падение величины светорассеяния (измеряемого по величине оптической плотности при 700 нм) с 1.7 до 0.8, что обусловлено выходом оптически плотного матричного содержимого наружу из-за резкого повышения проницаемости внутренней мембраны (этот вопрос был подробно рассмотрен в работе [4]).

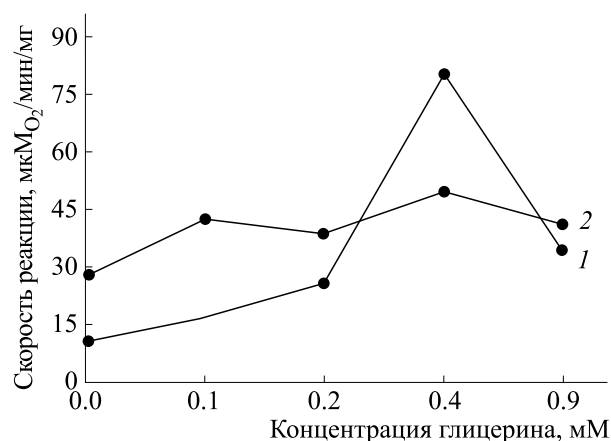
В гипотонической же среде, когда проницаемость внутренней мембраны велика и НАДН окисляется достаточно быстро, глицерин подав-

ляет дыхание уже в малой концентрации (рис. 5). Нужно отметить, что в гипотонических условиях кислород при окислении НАДН потребляется не только на цитохромоксидазе, но и непосредственно на НАДН-оксидазе [4]. Добавление глицерина в небольших концентрациях в гипотонических условиях приводит к существенному угнетению НАДН-зависимой дыхательной активности (рис. 6, табл. 1). Местом приложения глицерина тут является сам НАДН-дегидрогеназный комплекс I, а не другие комплексы дыхательной цепи, включая цитохромоксидазу. Это следует из того, что сукцинатоксидазная активность (в условиях гипотонии) глицерином почти не угнетается (рис. 6).

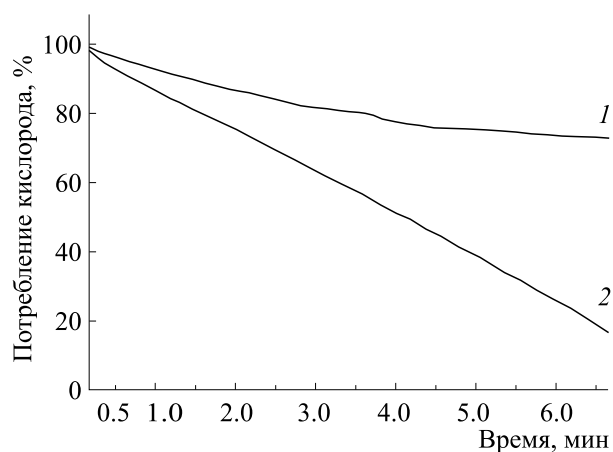
Подавление НАДН-зависимого дыхания глицерином трудно объяснить тривиальным повышением вязкости раствора, так как вязкость возрастает не слишком сильно: с ~1 сП (водный раствор) до 1.8 сП (0.4 мМ глицерина) [5]. Против тривиального эффекта вязкости говорит также



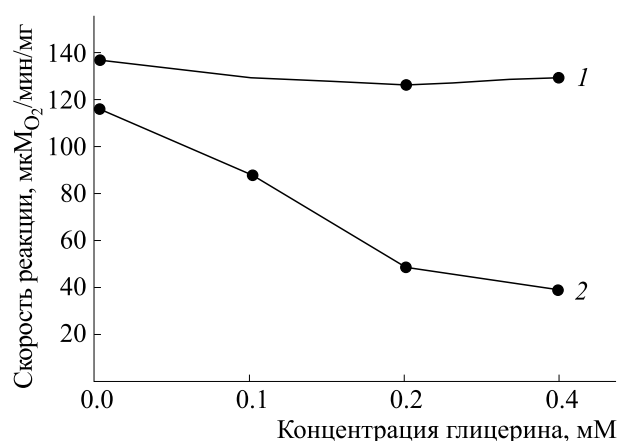
**Рис. 3.** Схема точек приложения глицерина во внутренней митохондриальной.



**Рис. 4.** Зависимости скорости сукцинат-оксидазной (1) и НАДН-оксидазной (2) реакции в суспензии митохондрий в изотонической среде от концентрации глицерина.



**Рис. 5.** Потребление кислорода в суспензии митохондрий в гипотонической среде (40 мМ NaCl) при добавке 1 мМ НАДН в присутствии 400 мкМ глицерина (1) и без глицерина (2).



**Рис. 6.** Зависимости скорости сукцинат-оксидазной (1) и НАДН-оксидазной (2) реакции в суспензии митохондрий в гипотонической среде от концентрации глицерина.

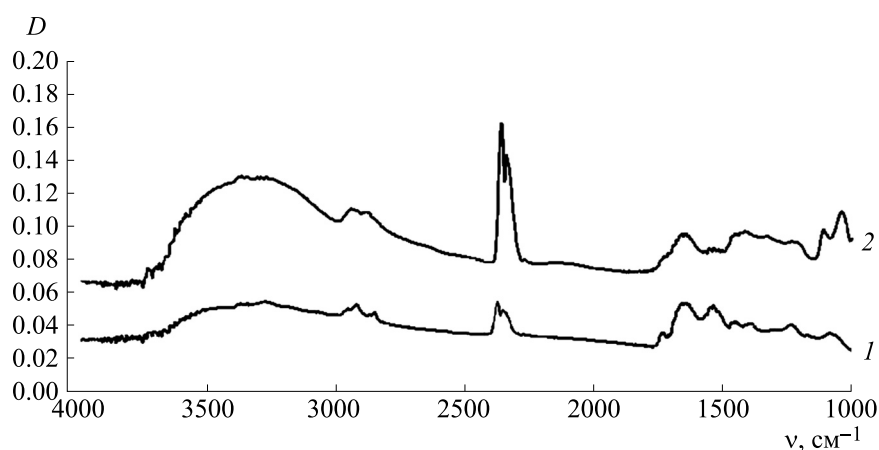
то, что глицерин почти не влияет на скорость сукцинатзависимого дыхания (табл. 1). Из полученных данных следует, что глицерин действует непосредственно на НАДН-дегидрогеназный комплекс I (рис. 3), но не на дыхательные комплексы II, III и IV.

Возможны четыре причины угнетающего действия глицерина на окисление НАДН комплексом I (рис. 3): а) повышение вязкости в районе активного центра фермента; б) аллостерическое ингибирование; в) конкурентное ингибирование; г) повышение вязкости липидной фазы. В первых двух случаях молекула глицерина воздействует на фермент путем образования с ним трех водородных связей. В третьем случае молекула глицерина, входя в карман фермента, мешает вхождению туда молекулы НАДН. В чет-

вертом случае глицерин мешает диффундировать убихинону, который должен снимать электроны с НАДН-дегидрогеназы.

Судя по действующим концентрациям глицерина, его константа связывания с мембранами митохондрий достаточно велика и составляет не менее  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . Глицерин может хорошо связываться с мембранными липидами и белками за счет формирования сразу трех водородных связей своими тремя гидроксильными группами.

Существенное связывание глицерина с митохондриальными мембранами подтверждается прямыми данными ИК-Фурье-спектроскопии (рис. 7). Главный вклад в ИК-поглощение теней митохондрий, потерявших матрикс, дают мембранные белки [4]. Широкая интенсивная полоса



**Рис. 7.** Спектры ИК-поглощения высушенных теней митохондрий (на поверхности окошка из фтористого кальция) без добавок (1) и с мембранно-связанным глицерином (2). Митохондрии выделяли из печени в растворе 0.3 М NaCl (без сахарозы, триса и ЭГТА).

**Таблица 2.** Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции белков митохондрий от добавления глицерина и дейтерированного глицерина

Длина волны, нм	Интенсивность триптофановой флуоресценции митохондрий, отн. ед.	То же + 0.1 мМ глицерина	То же + 0.1 мМ дейтероглицерина
320	0.94	0.57	1.28
355	1.05	0.71	1.48
380	0.53	0.36	0.72

в районе  $3300\text{ см}^{-1}$  обусловлена валентными колебаниями ОН-групп и NH-групп (белковый Амид А); дуплет в районе  $2900\text{ см}^{-1}$  обусловлен валентными колебаниями ОН- и СН-групп белков и липидов; небольшая полоса в районе  $1660\text{ см}^{-1}$  обусловлена валентными колебаниями СО-групп (белковый Амид I), а также деформационными колебаниями ОН-групп молекул связанной воды, оставшейся после высушивания образца; небольшой пик при  $1540\text{ см}^{-1}$  (Амид II) вызван деформационными колебаниями NH-групп. При связывании глицерина с митохондриями резко усиливается широкая полоса при  $3300\text{--}3400\text{ см}^{-1}$ , что связано с валентными колебаниями трех ОН-групп глицерина. Деформационный дуплет глицерина при  $1050\text{ см}^{-1}$  в мембранах заметно усилен в сравнении со спектром самого глицерина (на рисунке сам глицерин не показан). Поскольку при связывании глицерина наблюдается снижение белкового пика при  $1540\text{ см}^{-1}$ , то это говорит о том, что молекулы глицерина связываются не только в липидной фазе, но также образуют комплексы с поверхностями мембранных белков. Кроме того, при связывании глицерина с мембранами усиливается пик при  $2300\text{ см}^{-1}$ , принадлежащий углекислому газу, имеющемуся в мембранах и в глицерине (фоновый сигнал углекислого газа воздуха был вычтен). Общая приподнятость ИК-спектра теней митохондрий в присутствии глицерина по сравнению с тенями митохондрий без глицерина обусловлена большим светорассеянием этого образца (поэтому при оценке интенсивностей белковых полос вклад этой бесструктурной полосы вычитали).

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что глицерин способен сам по себе напрямую транспортироваться (пассивно по градиенту) внутрь митохондрий, а не только в форме глицерофосфата. Он эффективно связывается с митохондриальными мембранами, формируя каналы и повышая проницаемость внутренней мембраны для субстратов — НАДН и сукцината. Проникая внутрь, он подав-

ляет прежде всего работу НАДН-дегидрогеназного комплекса I.

Факт связывания глицерина с мембранами нативных митохондрий подтверждается данными по изменению их белковой триптофановой флуоресценции (табл. 2). Глицерин тушит триптофановую флуоресценцию, акцептируя вибронную энергию на валентные колебания групп —ОН и —СН, а дейтероглицерин (D8), наоборот, усиливает — благодаря увеличению квантового выхода флуоресценции триптофана в окружении тяжелых групп —OD и —CD.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность А.В. Чаплыгиной, М.С. Фроловой и А.Н. Дойниковой за помощь в работе.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. Кокс и Д. Нельсон, *Основы биохимии Ленинград* (Москва, 2017).
2. И. В. Шарова и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **49** (5), 814 (2004).
3. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin, 2002).
4. Н. Л. Векшин, *Биофизика митохондрий* (Фотонвек, Пушкино, 2019).
5. *Краткий справочник физико-химических величин*, сост. Н. М. Барон и др. (Химия, Л., 1974)..

## Glycerol Transport in Mitochondria

A.I. Dal\* and **N.L. Vekshin**\*\*

\*Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

\*\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Particular emphasis is placed on the entry of glycerol molecules (in a non-phosphorylated form) into the mitochondria. Spectrofluorimetry and FTIR spectroscopy have revealed that glycerol is effectively bound to mitochondrial membranes from rat liver. By using polarography and turbidimetric methods it was shown that at low concentrations (0.1–0.4 mM) glycerol increases the permeability of the inner membrane for substrates, such as NADH and succinate, and at high concentrations it strongly damages membranes. Low glycerol concentrations increase but high concentrations of glycerol suppress oxygen consumption of intact mitochondria suspended in an isotonic medium with NADH or succinate added. In a hypotonic medium, glycerol immediately begins to suppress NADH dehydrogenase, but not succinate dehydrogenase. The data obtained provide evidence for a conclusion that glycerol itself can directly transported (passively along a gradient) into the mitochondria, and not only in the form of glycerophosphate. It is assumed that glycerol, while interacting with lipids and proteins, forms channels in the inner membrane for the penetration of itself and substrates.

*Keywords: mitochondria, glycerol, oxygen consumption, NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, respiratory chain*