



UDK: 557.153.3

Bobur YO'LDOSHEV,

O'zMU huzuridagi biofizika va biokimyo instituti tayanch doktoranti

E-mail: yuldoshevboburbek10@gmail.com

Nurali ERGASHEV,

O'zMU huzuridagi biofizika va biokimyo instituti yetakchi ilmiy xodimi, b.f.d

Esaxon KOMILOV,

O'zMU huzuridagi biofizika va biokimyo instituti katta ilmiy xodimi, PhD

Muxlisa IKROMOVA,

Qarshi davlat universiteti tayanch doktoranti

Ikrom CHO'LIYEV,

Osiyo texnologiyalar universiteti dotsenti, b.f.n

B.f.d., professor A.Yesimbetov tavsiyasiga asosan

THE EFFECT OF KAEMPFEROL FLAVONOID ON RESPIRATORY PROCESS OF RAT LIVER MITOCHONDRIA

Annotation

The effect of kaempferol flavonoid on oxidative phosphorylation process in mitochondria isolated from rat liver was studied. In our experiments, we used different concentrations of kaempferol flavonoid in the oxidation of succinate, a substrate dependent on FAD, and demonstrated the antioxidant properties of the studied flavonoid, partial division of the oxidative-phosphorylation process occurred under the influence of the studied substance.

Key words: rat liver mitochondria, oxidative-phosphorylation, kaempferol, ADP, FAD.

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДА КЕМПФЕРОЛА НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Аннотация

Изучено влияние флавоноида кемпферола на процесс окислительно-фосфорилирования в митохондриях, выделенных из печени крысы. В наших экспериментах мы использовали различные концентрации флавоноида кемпферола при окислении сукцината - субстрата, зависимого от ФАД, и продемонстрировали антиоксидантные свойства изучаемого флавоноида, частичное разделение процесса окислительно-фосфорилирования происходило под влиянием исследуемого вещества.

Ключевые слова. Митохондрии печени крысы, окислительное фосфорилирование, кемпферол, АДФ, ФАД.

KALAMUSH JIGAR MITOXONDRIYALARI NAFAS OLISH JARAYONIGA KEMPFEROL FLAVONOIDINING TA'SIRI

Annotatsiya

Maqolada Kempferol flavonoidining kalamush jigaridan ajratilgan mitoxondriyadagi oksidlovchi fosforlanish jarayoniga ta'siri o'rganildi. Tajribalarimizda FAD ga bog'liq substrat bo'lgan suksinatning oksidlanishida flavonoid kamferolning turli konsentratsiyasidan foydalandik va o'rganilayotgan flavonoidning antioksidant xususiyatlarini ko'rsatdik, o'rganilayotgan moddaning ta'sirida oksidlanish-fosforlanish jarayonining qisman ajralishi sodir bo'ldi.

Калит сўзлар: kalamush jigar mitoxondriyalari, oksidlanishli-fosforlanish, kempferol, АДФ, FAD.

Kirish. Mitoxondriya - hujayraning "energetik stansiyasi", unda oziq moddalar oksidlanib, elektr energiyasi yaratiladi, so'ngra u kimyoviy energiyaga (ATP) aylantiriladi [<https://ru.wikipedia.org/wiki/Митохондрия>]. Nafas olish tirik organizmlarning eng muhim va asosiy xususiyatlaridan biri bo'lib, sutemizuvchilarda nafas olish mitoxondriyalar ichki membranasida joylashgan nafas olish zanjiri komplekslari orqali amalga oshiriladi[10]. Mitoxondriyalar hujayra energiya almashinuvi va apoptozida muhim o'rin tutuvchi hujayra organoidlaridir. Jigar hujayralarida mitoxondriyalar hajmi kattaligi va biologik faoliyati bilan ajralib turadi. Bittagina gepatotsitda ~1500 mitoxondriya va 20 000 dan ziyod nafas olish kompleksi mavjud [16]. Bu komplekslarda oksidlanishli fosforlanish jarayoni amalga oshadi.

Oksidlanishli fosforlanish - bu mitoxondriyalar ichki membranasida NADH va FADH₂ elektronlarini oksidlovchi enzimalar komplekslari (I-IV) orqali atomik kislorodga yetkazish va shu orqali protonga qarshi gradient hosil qilish jarayonidir [17]. Ushbu gradient **ATP sintaza** (Kompleks V) orqali oqib, ADP va fosfatni ATP ga aylantiradi, bu esa hujayra uchun asosiy energiya manbaidir [18, 19].

Adabiyotlar sharhi. Oksidlanishli fosforlanish jarayonida yelektronlar mitoxondrial nafas olish komplekslari orqali yetkazib beriladi va ATF ishlab chiqarish uchun energiya manbai sifatida mitoxondriya ichki membranasida bo'ylab proton gradiyenti hosil qilinadi.

Elektron tashish janjiri quyidagi tarkibiy tuzilishga ega:

- ❖ **Kompleks I** (NADH dehidrogenaza) - NADH orqali elektronlarni koenzim Q ga uzatib, 4 proton (H⁺) tashiydi [17].
- ❖ **Kompleks II** (Succinat dehidrogenaza) - FADH₂ dan elektronlarni Q ga yuboradi (proton tashimaydi).
- ❖ **Kompleks III** (Cytochrom bc₁) - QH₂ dan cytochrom c ga elektron uzatib, natijada 4 H⁺ tashiydi [17, 19].

❖ **Kompleks IV** (Cytochrom c oksidaza) - oxigenni suvga aylantirib, ya'ni 2 proton tashlab, final elektron akseptorini bajaradi [17, 20].

Ushbu metabolik jarayon bilan bog'liq muhim biokimyoviy hodisalardan biri superoksid radikali $O_2^{\cdot-}$ ishlab chiqarishdir. Elektron mitoxondriyalardagi yelektron tashish zanjiridan chiqib ketganda, ayniqsa kompleks I yoki III da, u molekulyar kislorod bilan reaksiyaga kirishib, $O_2^{\cdot-}$ ni hosil qilishi mumkin [11, 12]. Chunki $O_2^{\cdot-}$ doimiy ravishda hujayra metabolizmi jarayonida hosil bo'ladi va vodorod peroksid (H_2O_2) va boshqa reaktiv kislorod turlariga (ROS) aylanishi mumkin. Hujayradagi ROS ning asosiy qismi mitoxondriyada to'planadi [6, 9]. ROS kimyoviy jihatdan reaktivdir va u ko'p miqdorda to'planganda hujayralar uchun toksik bo'lganligi sababli, superoksid dismutaza (SOD), turli xil metabolik fermentlar kabilarni o'z ichiga olgan yuqori darajada tartibga solinadigan antioksidant tizim tomonidan peroksidazalar va boshqa redoks molekullari hujayralardan tezda chiqarilishi aniqlangan [7]. Mitoxondriyalardagi nafas olish ko'p hollarda hujayra energiyasining yeng muhim generatoridir. Bu substratlarning, energiyani ATF ga aylantirish jarayonidir. Polyograf pribori tirik hujayralardagi kislorod iste'moli darajasini (OCR) o'lchash imkonini beradi va real vaqt rejimida mitoxondrial nafas olishning asosiy parametrlarini baholaydi. Mitoxondrial ingibitorlardan foydalanish orqali to'rtta asosiy mitoxondriya nafas olish parametrlarini o'lchash mumkin: bazal, ATF ishlab chiqarish bilan bog'liq, maksimal va proton oqish bilan bog'liq OCR [4]. Ushbu yondashuv ATF sintazasini blokirovka qilish uchun mitoxondrial ingibitorlar - oligomitsinni, FCCP - ichki mitoxondrial membranani protonlar uchun o'tkazuvchan qilish va elektron tashish zanjiri orqali maksimal elektron oqimini ta'minlash uchun hamda rotenon va antimitsin A - mos ravishda I va III komplekslarni ingibirlash uchun qo'llanilishini talab qiladi [8].

Shunday qilib, oksidlanishli fosforillanish yeukariot hujayralardagi asosiy energiya manbai hisoblanar yekan. Bu jarayon mitoxondriya ichki membranadagi to'rtta ferment, shulardan uchta proton nasoslari orasidagi yelektron oqimi orqali amalga oshiriladi. Ichki membrana ustidagi proton gradiyentida to'plangan energiya beshinchi oksidlanishli fosforillanish kompleksi, ATF sintazasi tomonidan ATF sintezi uchun ishlatiladi. Oksidlanishli fosforillanish oqsil komplekslarining to'rttasi nafas olish superkomplekslari deb ataladigan barqaror obyektlarga birlashadi [15].

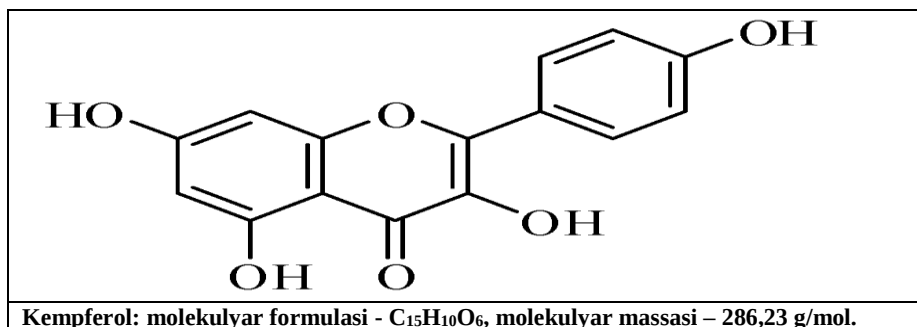
Ishning maqsadi. Kalamush jigaridan ajratilgan mitoxondriyalardagi FADga bog'liq substrat - suksinatli oksidlanishli fosforillanish jarayoniga kempferol flavonoidining ta'sir mexanizmini tadqiq qilishdan iborat.

Tadqiqot metodologiyasi. Tadqiqotlar 160-180 gr og'irlikdagi oq zotsiz erkak kalamushlar ustida olib borildi. Kalamush jigar mitoxondriyalari Shneyder usuli bo'yicha differensial sentrifugalash metodi yordamida ajratildi [3]. Dekapitatsiya qilish orqali jonsizlantirilgan hayvon qorin bo'shlig'i o'histalik bilan ochildi va ajratish muhitiga jigar 6:1 nisbatda solindi hamda teflon gomogenizatorida bir xil hajmga keltirib olindi. Ajratish muhiti tarkibi: 250 mM saxaroza, 10 mM tris-HCl, 1 mM YEDTA, pH-7,4. Mitoxondriya PC-6 sentrifuga yordamida cho'ktirildi, bu jarayon ikki xil bosqich orqali amalga oshirildi:

1) 1500 aylanma/minut tezlikda 5 daqiqa davomida yadro hamda hujayra fragmentlari ajratib olindi;

2) 6000 aylanma/minut tezlikda 15 daqiqa davomida aylantirib mitoxondriya ajratib olindi va YEDTAsiz ajratish muhitidan 10:1 nisbatda qo'shib ishchi holatga keltirib olindi. Sentrifugalashdagi har ikkala bosqich ham $\pm 2^\circ C$ haroratda olib borildi. Jigar mitoxondriyalardagi oqsil miqdori biuret usulidan foydalanib aniqlandi [13] va u 60-80 mg/ml ni tashkil qildi.

Polyarografik registratsiyani amalga oshirish uchun ochiq tipdagi aylanuvchi platinali yelektroddan foydalandik. Polyarografik yacheykada harorat $26^\circ C$ ni tashkil yetdi. V_4 - holatda va V_3 - metabolik holatda nafas olish tezligi, shuningdek nafas olish nazorati va ADF/O qiymatlari aniqlandi [5]. 1 ml inkubatsiya muhitida O_2 ning miqdori 500 ng-atomni tashkil yetdi. Inkubatsion muhitning tarkibi: 250 mM saxaroza, 5 mM suksinat, 5 mM KH_2PO_4 , 5 mM tris-HCl, pH-7,4 ga teng. Bunda 1 ml inkubatsion muhitga 1 mg atrofida mitoxondriyalar oqsilini tutgan mitoxondriyalar suspenziyasi ya'ni 50 mikrolitr miqdorda qo'shildi va mitoxondriyalarning polyarografik oksidlanishli fosforillanish jarayoni registratsiya qilindi. Oksidlanish substrati suksinatni qo'llaganimizda, suksinat oksidlanishining konkurent ingibitori - oksaloatsetat to'planishini oldini olish maqsadida muhitga rotenon qo'shildi. Flavonoidning strukturaviy tuzulish formulasi 1-rasmda keltirilgan. Olingan natijalar Origin 6.1 kompyuter dasturida statistik tahlil qilindi. $P < 0,005$ ko'rsatkich barcha holatlarda ishonarli deb baholandi.



1-rasm. O'rganilgan flavonoidning strukturaviy tuzilishi.

Olingan natijalar va ularning tahlili. Adabiyotlardan ma'lumki, mitoxondriyalardagi oksidlanishli fosforillanish jarayonlarini qisman bo'luvchi xossasiga yega bo'lgan biologik faol birikmalar mitoxondriyalar ichki membranasida protonlar o'tishini (siriqishini) tezlashtiradi [1, 14]. Bu holat ishemik adaptatsiyalanish jarayonlarida muhim o'rin tutishi mumkin. Mitoxondriyalardagi nafas zanjiri fermentlari uning membranasini lipoproteinli karkasida joylashgan bo'lib, bu fermentlar oksidlanishli fosforillanish tizimi faoliyatini belgilab beradi. Bu holat Jakobs va Senedi ma'lumotlarida keltirilishicha bu fermentlar erkin oksidlanish yoki oksidlanishli fosforillanish jarayonlarida ishtirok yetadi. Bu ferment tizimlari mitoxondriyalar membranasining erimaydigan fraksiyasini hosil qiladi va oksidlanishli fosforillanish jarayoni bilan uzviy bog'langan bo'ladi. Mitoxondriyalarda kechadigan bo'kish, labilizatsiya va dezorganizatsiya holatlarining sodir bo'lishi erkin oksidlanish jarayoni ulushiga to'g'ri kelsa, mitoxondriyalarning hajmini qisqarishi, stabilizatsiyasi oksidlanishli fosforillanish jarayonlari ulushiga to'g'ri keladi [2].

Olib borilgan *in vitro* tajribalarda kempferolning oksidlanishli fosforillanish jarayoniga ta'siri o'rganildi. Bunda kempferol flavonoidining 1, 5, 10, 25 va 50 mkM konsentratsiyalaridan foydalanildi. V_2 holati nazoratda $0,54 \pm 0,047$ ko'rsatkichni namoyon

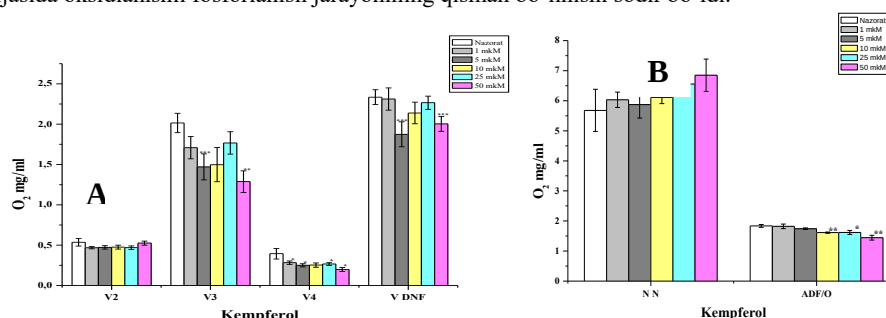
qildi. 1 va 5 mkM kempferol ta'sirida esa bu ko'rsatgich mos ravishda $0,47 \pm 0,013$ va $0,47 \pm 0,02$ qiymatlarga o'zgarishi ko'zatildi, qolgan konsentratsiyalar ya'ni 10, 25 va 50 mkMlar ta'sirida esa V_2 holati $0,47 \pm 0,024$, $0,468 \pm 0,02$ va $0,52 \pm 0,025$ qiymatlargacha o'zgarishi aniqlandi.

FAD ga bog'liq substrat - suksinatning oksidlanishida kislorodning sarf bo'lish tezligi V_3 va V_4 holatlarda nazoratda $2,01 \pm 0,1$ va $0,39 \pm 0,06$ ko'rsatgichlarni na'moyon qilib, bu holat 1 va 5 mkM kempferol ta'sirida ya'ni V_3 holati $1,7 \pm 0,1$ va $1,4 \pm 0,1$ ga hamda V_4 holati esa $0,28 \pm 0,02$ ba $0,25 \pm 0,019$ ga o'zgarishi aniqlandi. Flavonoidning 10, 25 va 50 mkM konsentratsiyalari ta'sirida V_3 holat $2,14 \pm 0,13$, $2,26 \pm 0,082$ va $2,0 \pm 0,093$ larga V_4 holati esa $0,25 \pm 0,027$, $0,26 \pm 0,017$ va $0,197 \pm 0,024$ largacha o'zgarishi aniqlandi.

V_{DNF} ko'rsatgichi nazoratda $2,3 \pm 0,092$ ni, 1 mkM konsentratsiyada $2,3 \pm 0,14$ ni, 5 va 10 mkM konsentratsiyalarda esa $1,8 \pm 0,15$ va $2,14 \pm 0,13$ larni, shuningdek kempferolning 25 va 50 mkM konsentratsiyalari ta'sirida $2,26 \pm 0,082$ hamda $2,004 \pm 0,093$ larni hosil qilishi aniqlandi.

Yuqoridagi natijalardan kelib chiqqan holda nafas nazorati (NN) va ADF/O koeffitsiyenti nazoratda $5,68 \pm 0,70$ va $1,84 \pm 0,046$ ni hosil qilgan bo'lsada, 1 mkM flavonoid ta'sirida mos ravishda $6,03 \pm 0,25$ va $1,8 \pm 0,074$ ga, 5 mkM kempferol ta'sirida yesa mos ravishda $5,87 \pm 0,45$ va $1,74 \pm 0,027$ gacha 10 mkM modda qo'shilganda $6,1 \pm 0,19$ va $1,62 \pm 0,02$ ga o'garishi hamda 25 mkM flavonoid ta'sirida $6,5 \pm 0,15$ va $1,6 \pm 0,06$ ni, flavonoidning 50 mkM konsentratsiyasi ta'sirida yesa nafas nazorati qiymati $6,8 \pm 0,5$ ni ADF/O ko'rsatgichi yesa $1,4 \pm 0,079$ ga o'zgarishi aniqlandi.

Bu olingan natijalar kempferolning yuqori antioksidant xossaga yega yekanligini isbotlaydi. Chunki kempferolning *in vitro* holatda ta'siri natijasida oksidlanishli fosforlanish jarayonining qisman bo'linishi sodir bo'ldi.



2-rasm. Kempferol flavonoidining turli konsentratsiyalarini jigar mitoxondriyalari nafas olish jarayoniga ta'siri (FAD ga bog'liq substrat - suksinatning oksidlanishida kislorodning sarf bo'lish tezligi). A – V_2 , V_3 , V_4 va V_{DNF} holatlarga kempferol ta'siri. B – nafas nazorati hamda ADF/O ko'rsatgichiga kempferol flavonoidining ta'siri.

Inkubatsion muhitning tarkibi: 250 mM saxaroza, 5 mM suksinat, 5 mM KH_2PO_4 , 5 mM tris-HCl, pH-7,4 ga teng. (* - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$; $n=8$).

Xulosa. Kempferol flavonoidi kalamush jigar mitoxondriyalari nafas olish jarayoniga ta'siri o'rganildi. Tatqiqotlarda flavonoid ta'siri natijasida FAD ga bog'liq substrat - suksinatning oksidlanishida kislorodning sarf bo'lish tezligi V_3 va V_4 holatlarda konsentratsiyaga mos ravishda kamayishi ko'zatildi. Shuningdek, ADF/O ko'rsatgichi ham konsentratsiyaga mos ravishda kamayib borgan bo'lsa, nafas nazorati aksincha konsentratsiyaga mos ravishda ko'payib borishi aniqlandi. Demak kempferol flavonoidi kalamush jigar mitoxondriyalari oksidlanishli fosforlanish jarayonining qisman bo'linishi olib keldi.

ADABIYOTLAR

- Самарцев В.Н., Дубинин М.В. Стимуляция пальмитиновой кислотой окисления дофамина в митохондриях печени в присутствии атр и трет-бутилгидропероксида // Биол. мембраны. – 2016. – Т. 33(3).
- Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. Мембранная биоэнергетика // М.: МГУ, 2010. – 368 с.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. The mitochondrion. The Molecular Biology of the Cell // (4th ed.). – 2002. – P. 767-768.
- Andreas Kohler, Antoni Barrientos, Flavia Fontanesi, Martin Ott. The functional significance of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. EMBO Rep 2023 Nov 6;24(11):e57092. doi: 10.15252/embr.202357092
- Chance B., Williams G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv.enzymol. – 1956. – V.17. – P. 65-134.
- Halliwell B., Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine // 3rd ed. Oxford University Press Inc. New York, NY1999.
- Hélène Pelicano., Li Feng., Yan Zhou., William Plunkett., Michael J., Keating., Peng Huang. Inhibition of Mitochondrial Respiration // JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. SEPTEMBER 2003. doi.org/10.1074/jbc.M301546200. P37832-37839,
- Natalia Smolina, Joseph Bruton, Anna Kostareva, Thomas Sejersen. Assaying Mitochondrial Respiration as an Indicator of Cellular Metabolism and Fitness Methods // Mol Biol. 2017;1601:79-87. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9.
- Richter C., Gogvadze V., Laffranchi R., Schlapbach R., Schweizer M., Suter M., Walter P., Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases // Biochim. Biophys. Acta. 1995; 1271: 67-74
- Runyu Guo, Jinke Gu, Shuai Zong, Meng Wu, Maojun Yang. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. Biomed J. 2018 Feb;41(1):9-20. doi: 10.1016/j.bj.2017.12.001. Epub 2018 Mar 26
- Saybasili H., Yuksel M., Haklar G., Yalcin A.S. Antioxid // Redox Signal. 2001. 3. 1099-1104.
- Staniek K., Gille L., Kozlov A.V., Nohl H. Free Radic // Res. 2002. 36: 381-387.
- Tanaka T., Saotome M., Katoh H. et. al. Glycogen synthase kiase-3 β opens mitochondrial permeability transition pore through mitochondrial hexokinase II dissociation // J Physiol Sci. – 2018. –V. 68(6). –P. 865-871.
- Toime L.J., Brand M.D. Uncoupling protein-3 lowers reactive oxygen species production in isolated mitochondria // Free Radic Biol Med. – 2010. – Vol. 49(4). – P. 606-611.
- Yuriy Chaban, Egbert J Boekema, Natalya V Dudkina. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilization // Biochim Biophys Acta. 2014 Apr;1837(4):418-26.

16. И. Рослый, Т. Демура Мы дышим... митохондриями печени // *Фармвестник*. – 2018. №9 (164).
17. Letts J.A., Sazanov L.A. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain // *Nat Struct Mol Biol.* – 2017. – Vol. 24(10). – P. 800–808.
18. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism // *Nature*. – 1961. – Vol. 191. – P. 144–148.
19. Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement // *Redox Biol.* – 2020. – Vol. 37:101674.
20. Pham L., Arroum T., Wan J. et al. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through tight control of cytochrome c oxidase // *Redox Biol.* – 2024. – Vol. 78:103426.
21. Internet manbalari:
22. <https://ru.wikipedia.org/wiki/Митохондрия>
23. <https://en.wikipedia.org/wiki/Chemiosmosis>