

УДК 612.019:591.044

Л. М. Овсепян, академик К. Г. Карагезян, А. В. Мелкумян, Г. В. Захарян

**Взаимосвязь окислительного фосфорилирования и процесса
перекисного окисления липидов в митохондриальной фракции
головного мозга при гипоксии**

(Представлено 2/VI 2006)

Ключевые слова: *окислительное фосфорилирование, перекисное окисление липидов, гипоксия*

Кислородное голодание организма вызывает метаболические перестройки в тканях, влияя главным образом на систему биологического окисления. Кислород используется клетками в процессе дыхания, в основном митохондриальной системой окисления. Полное восстановление молекулы кислорода до воды требует наличия четырех электронов. При гипоксии понижается концентрация молекулярного кислорода и увеличивается уровень восстановленности компонентов дыхательной цепи, в результате чего стимулируется восстановление кислорода по одноэлектронному пути. В этих условиях в митохондриях (МХ) накапливаются активные формы кислорода; при переносе первого электрона формируется супероксидный радикал, при переносе второго - перекись водорода; наиболее токсичный и реактивный гидроксил - радикал является результатом третьего переноса электрона [1]. При снижении мозгового кровотока и развитии ишемии именно митохондриальная дыхательная цепь переноса электронов становится мощным источником образования активных форм кислорода - нестабильных и крайне реакционноспособных метаболитов.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение процессов окислительного фосфорилирования, содержания цитохромов, а также перекисного окисления липидов в митохондриальной фракции головного мозга в норме и при гипоксии.

Опыты проводили на беспородных белых крысах массой 170-200г. Гипоксию головного мозга вызывали одномоментной окклюзией сонных артерий (30 мин). МХ головного мозга выделяли в среде, содержащей 0.25 М сахарозы и 0.01 М трис-НСl буфера, рН7.4, методом дифференциального центрифугирования при 13000 g, после осаждения ядер при 600 g. Скорость дыхания МХ измеряли полярографически с помощью электрода Кларка в среде инкубации следующего состава, в mM: сахароза - 100, KH_2PO_4 - 15, трис HCl - 15 (рН 7.4), ЭДТА - 0.1. В качестве субстратов окисления использовали комплекс субстратов янтарной (4 mM) и глютаминовой (6 mM) кислот. Скорость дыхания регистрировали в следующих метаболических состояниях: V_2 - состояние покоя до работы в присутствии субстратов окисления; V_3 - состояние активной деятельности, стимулированное добавкой в среду АДФ (200 mM); V_4 - состояние отдыха после работы или отрегулированное состояние. Дыхательный контроль, определяемый отношением V_3 к V_4 , отражает степень стимуляции

дыхания в зависимости от уровня фосфорилирования [2]. Количество цитохромов рассчитывали по величине поглощения в максимуме поглощения α -полосы при 605 нм для цитохрома а, при 550 нм для цитохрома С, при 562 нм для цитохрома В и при 557 нм для цитохрома В₅ [3].

О содержании диеновых конъюгатов судили по характерному для них поглощению при 233 нм [4], гидроперекисей - по цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм [5], малонового диальдегида - по реакции с тиобарбитуровой кислотой [6]. Количественное определение белка производили по Лоури [7]. Достоверность полученных результатов оценивали методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Таблица 1

Показатели дыхательной и фосфорилирующей активности (в нг ат О/с мг белка)
митохондрий мозга в норме и при гипоксии (субстрат - сукцинат+глутамат) (n = 7)

Показатели	V ₂	V ₃	V ₄	ДК	Т фосфор.
Контроль	2.49±0.16	5.45±0.2	2.59±0.16	2.18±0.15	20±1.2
Гипоксия	2.28±0.17	2.44±0.16*	2.38±0.12	1.07±0.17*	40±1.3*

Примечание: * $p < 0.001$.

Как видно из табл.1, МХ мозга контрольных крыс при наличии сукцината и глутамата в качестве субстрата окисления поглощают 2.49 нг атомов кислорода на 1 мг белка. Добавление АДФ оказывает приблизительно двукратное стимулирующее воздействие на этот процесс, дыхательный контроль при этом колеблется в пределах 2.18, и по этой величине представляется возможность судить о способности дыхательной цепи к ускорению процесса переноса электронов на фоне введения экзогенной АДФ и переходу в отрегулированное состояние. Согласно результатам проведенных исследований гипоксия сопровождается заметным уменьшением скоростей дыхания V₂ и V₄, удлинением времени фосфорилирования и резко выраженным уменьшением скоростей V₂ и V₃, что является отчетливым показателем серьезности нарушений в процессе передачи электронов по дыхательной цепи. Величина дыхательного контроля, равная 1.07, указывает на почти полное разобщение процессов дыхания и фосфорилирования при гипоксии. Этот комплекс изменений однозначно свидетельствует о нарушении при гипоксии сопряжения окисления и фосфорилирования в МХ. Снижение скорости переноса электронов в активном и разобщенном состояниях может быть обусловлено изменением активностей комплексов дыхательной цепи МХ или изменением содержания цитохромов. В табл.2 представлены данные об уменьшении содержания цитохромов в дыхательной цепи переноса электронов в МХ мозговой ткани гипоксических животных.

Содержание цитохромов в митохондриях головного мозга в норме и при гипоксии (нмоль/мг белка) (n = 5)

Цитохром	Контроль	Гипоксия
B	0.140±0.006	0.112±0.005**
C	0.182±0.012	0.133±0.011***
C-1	0.159±0.007	0.112±0.006*
a	0.238±0.009	0.205±0.008***
B-5	0.183±0.011	0.128±0.009**

Примечание: * - $p < 0.001$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.02$.

При исследовании процесса перекисного окисления липидов нами обнаружено увеличение содержания продуктов свободнорадикального окисления - диеновых конъюгатов, гидроперекисей и малонового диальдегида в МХ. Увеличению содержания перекисей в головном мозге способствуют высокое содержание в нем легко окисляемых субстратов, таких как полиненасыщенные жирные кислоты и катехоламины; сравнительно низкий уровень антиоксидантов - глутатиона и витамина Е и антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы); наличие высокого содержания в МХ негеминового железа, которое является активатором ПОЛ, а также недостаточность кислорода при гипоксии, приводящие к активированию свободнорадикальных реакций.

Мишенью повреждающего действия свободных радикалов являются белки, нуклеиновые кислоты и липиды клеточных мембран. Механизм ингибирующего действия свободных радикалов кислорода на активность ферментов связывают с окислительной модификацией аминокислотных остатков мембранно-зависимых ферментов. Согласно данным Цханга и соавт. [8] НАДН-оксидаза, НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, сукцинатоксидаза и F_0F_1 -АТФаза ингибируется гидроперекисями и супероксидрадикалами. Окислительная модификация белков может сопровождаться их агрегацией [9]. Нам представляется, что одним из объяснений сниженной активности окислительного фосфорилирования при гипоксии может быть как ингибирование ферментов, так и нарушение белок-белковых и белок-липидных взаимоотношений в дыхательных комплексах МХ, где помимо отмеченного одной из главных мишеней ОН-радикалов является ДНК [10]. Примечательно, что ДНК МХ, кодирующая небольшое количество пептидов НАДН-дегидрогеназы, апоцитохром в, субъединицы 1-3 цитохромоксидазы и шестую и восьмую субъединицы F_0F_1 -АТФазы, обладают большей, чем ядерная ДНК, чувствительностью к действию оксидантов [11].

Таблица 3

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге в норме и при гипоксии (n = 7)

Показатель	Контроль	Гипоксия
Диеновые конъюгаты, нмоль/мг белка	1.22±0.15	2.94±0.18*
Гидроперекиси, Е/мг белка	0.62±0.02	1.12±0.03*
МДАНмоль/мг белка	5.2±1.2	11.3±1.4*

Примечание: * - $p < 0.001$.

Таким образом, наблюдаемое нами снижение скорости дыхания МХ в активном и разобщенном состояниях, коэффициента АДФ/О, также уменьшение содержания цитохромов дыхательной цепи являются результатом окислительного повреждения белков и нуклеиновых кислот в МХ свободными радикалами, образующимися в дыхательной цепи при гипоксических состояниях.

Институт молекулярной биологии НАН РА

Литература

1. Болдырев А. А. - Нейрохимия. 1995. Т. 12. N3. С. 271-278.
2. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом Г. М. Франк. 1973. М. Наука. 120с.
3. Евдотиенко Ю. В., Мохова Е. Н. Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксация азота. 1967. М. Наука. С. 35-48.
4. Романова Л. А. Стальная И. Д. В кн.: Современные методы в биохимии. 1977. М. Наука. С. 63.
5. Стальная И. Д. В кн.: Современные методы в биохимии. 1977. М. Наука. С. 64
6. Владимиров Ю. А. Арчаков А. И. В кн. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. 1972. М. Наука. С. 252.
7. Lowry O., Rosenbogh N., Farr A. - J. Biol. Chem. 1951. V. 153. N1. P. 265-275.
8. Zang Y., Marcillat O. - J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 16330-16336.
9. Halliwell B. - In: Free Radikals in the Brain. 1992. P. 21-40.
10. Calabrese V., Scapagnini G, Bates T. E. - Neurochemikal Research. 2001. V. 26. N6. P. 739-765.
11. Mecocci P., Beal M. F., Cecchetti R. et al - Mol. Chem. Neuropathol. 1997. V. 31. P. 53-64.

Լ. Մ. Հովսեփյան, ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյոզյան, Ա. Վ. Մելքումյան, Գ. Վ. Ջաքարյան

Գլխուղեղի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում լիպիդների պերօքսիդացիոն գործընթացի և օքսիդատիվ ֆոսֆորիլացման փոխադարձ կապը հիպօքսիայի ժամանակ

Հետազոտվել են գլխուղեղի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում օքսիդատիվ ֆոսֆորիլացման, ցիտոքրոմների պարունակության և լիպիդների պերօքսիդացման գործընթացները փորձարարական հիպօքսիայի պայմաններում: Ուսումնասիրությունները բացահայտել են օքսիդատիվ ֆոսֆորիլացման ռեակցիաների խախտում, ցիտոքրոմների պարունակության իջեցում և ազատ ռադիկալային գործընթացների ակտիվացում:

Հետազոտությունների արդյունքները, անկասկած, հետաքրքրություն են ներկայացնում հասկանալու ախտաբանազենետիկական այն մեխանիզմները, որոնք ընկած են օրգանիզմի հիպօքսիկային վիճակների հիմքում:

L. M. Hovsepyan, academician K. G. Karageuzyan, A. V. Melkumyan, G. V. Zakharyan

**Cooperation Between of Lipid Peroxidation and Oxidative Phosphorylation
in the Brain Mitokhordial Fraction under the Conditions of Hypoxia**

It was shown that processes of oxidative phosphorylation and peroxidation of lipids as well as the quantitative changes of cytochrom contents under the conditions of experimental hypoxia are accompanied by the significant abnormalities. The data obtained have demonstrated that abnormalities mentioned are characterized by activation of free radical peroxidation reactions, by the lowering of the cytochromes quality and by the depression of the intensity of phosphorilation reactions.

These results spray the light on the modern understandings of pathogenetical mechanisms, which are under lying in the base of hypoxia.