



Биол. журн. Армении, 3 (62), 2010

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В МИТОХОНДРИЯХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ МОЗГА

Г.В. ЗАХАРЯН

ЕГМУ им. М.Гераци, кафедра медицинской химии

Исследовалось содержание липидных перекисей, цитохромов и кардиолипинов при экспериментальном отеке мозга. Показано, что активирование свободнорадикального окисления сопровождается уменьшением содержания кардиолипинов и цитохромов в митохондриальной фракции головного мозга крысы с экспериментальным отеком мозга. Полученные данные обсуждаются в связи с активированием процесса апоптоза в митохондриях при развитии отека мозга.

Отек мозга – митохондрии – цитохромы – кардиолипины – свободные радикалы

Ուսումնասիրվել է լիպիդների գերօքսիդացման գործընթացը, ցիտոքրոմների և կարդիոլիպիդների քանակը գլխուղեղում փորձարարական այտուցի ժամանակ: Ցույց է տրվել, որ միտոքոնդրիումներում ավելանում է գերօքսիդների քանակը և նվազում է ցիտոքրոմների և կարդիոլիպիդների պարունակությունը: Ստացված տվյալները քննարկվում են ապոպտոզի ակտիվացման հետ զուգընթաց:

Գլխուղեղի այտուց - միտոքոնդրիում - ցիտոքրոմ - կարդիոլիպին - ազատ ռադիկալ

The content of lipid peroxidation, cytochromes and cardiolipin under the brain edema has been investigated. The results indicate that under brain edema lipid peroxidation product increases and content cytochromes and cardiolipin in mitochondrial fractions decreases. The central role of mitochondria in the development of apoptosis in mitochondria is discussed based on available data.

Brain edema – mitochondria – cytochrome – cardiolipin – free radicals

Актуальность проблемы патофизиологических механизмов развития отека мозга (ОМ) связана с растущим числом сердечно-сосудистых заболеваний и черепно-мозговых травм во всем мире. Сложность этой проблемы, представляющей большой интерес для теории и практики медицины, обусловлена, в частности, разнообразием факторов, влияющих на развитие и устранение ОМ. В его развитии участвуют совокупность физиологических, биофизических и биохимических механизмов, определяющих феномены микроциркуляции, транскпиллярного обмена и объема жидкости в отдельных составных частях мозговой ткани. Под ОМ понимают процесс избыточного накопления воды в ткани мозга и межклеточных пространствах, наступающий вследствие нарушения баланса между кровью и тканями. При увеличении объема мозга в ограниченном внутри-

черепном пространстве происходит его сдавливание, вследствие чего нарушается мозговое кровообращение, приводящее к гипоксии и ишемии мозга [3].

Целью настоящей работы явилось исследование образования активных форм кислорода, содержания кардиолипина и цитохромов в митохондриальной фракции головного мозга при развитии ОМ.

Материал и методика. Исследование проводили на беспородных белых крысах обоего пола, массой 170-200 г, содержащихся в условиях вивария.

Токсический отек головного мозга вызывали внутрибрюшинным введением тетраэтилолова в дозе 10 мг на 1 кг массы животного. Критерием развития отека мозга служили выраженная гидратация мозговой ткани и показатели микроскопического исследования [6]. О содержании воды судили по сухому остатку ткани мозга после высушивания при 110°C до постоянной массы.

Животные были распределены на 2 группы по 10 в каждой: 1-интактные; 2-животные с воспроизведенным ОМ.

Митохондрии головного мозга выделяли в среде, содержащей 0,25 М сахарозы и 0,01 М трис-НС1 буфера, (рН -7,4), методом дифференциального центрифугирования при 13000 g, после осаждения ядер при 600g [5].

Количество цитохромов рассчитывали по величине поглощения при 605 нм для цитохрома а; при 550 нм для цитохрома с; при 565 нм для цитохрома в и 557 нм для цитохрома в₅ [2].

Об активности ПОЛ судили по количеству образования гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА). ГП определяли по цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм [7]. МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [1]. Количество белка определяли по Лоури [8].

Экстракцию липидов проводили метанол-хлороформенной смесью в соотношении 1:2. Фракционирование кардиолипидов проводили методом одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля (фирмы "Мерк", Германия) в системе растворителей хлороформ:метанол:аммиак в соотношении (65:35:5). Минерализацию липидного фосфора кардиолипина осуществляли в среде серной и азотной кислот с последующем расчетом количества неорганического фосфора в мкг сухой ткани [5]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как показали результаты исследования, изучение процесса перекисного окисления липидов при ОМ позволило обнаружить увеличение содержания ГП и МДА в митохондриальной фракции головного мозга (табл.1).

Таблица 1. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях головного мозга в норме и при экспериментальном ОМ (n =7)

Показатели	Контроль	Отек мозга-1
Гидроперекиси, Е нмоль/мг белка	0,55± 0,02	0,91±0,03 p< 0,001
МДА, нмоль/мг белка	5,8± 1,2	10,3 ±1,4 p< 0,001

При ОМ, вследствие нарушения доставки кислорода в ткань мозга, понижается концентрация молекулярного кислорода и увеличивается уровень восстановленности компонентов дыхательной цепи, в результате чего стимулируется восстановление кислорода по одноэлектронному пути, приводящему к образованию супероксидного радикала, дающему начало другим активным формам кислорода, таким как синглетный кислород, гидроперекиси. Увеличению содержания перекисей липидов в митохондриальной фракции головного мозга способствует высокое содержание в нем легкоокисляемых субстратов, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, а также наличие негеминового железа, являющегося активатором ПОЛ.

В этих условиях митохондриальная цепь переноса электронов становится мощным источником образования активных форм кислорода – нестабильных и крайне реакционноспособных метаболитов. Показано, что двумя основными местами образования свободных радикалов в дыхательной цепи является комплекс 1 (НАДН-коэнзим Q-редуктаза) и комплекс 2 (убихинон цитохром с-редуктаза) [9].

Как показали исследования, при экспериментальном ОМ наблюдается уменьшение содержания цитохромов, и в большей степени это касается цитохрома с (табл.2). По характеру связи с мембранами митохондрий цитохром с существенно отличается от других компонентов цепи переноса электронов. В противоположность остальным цитохромам, находящимся в прочном комплексе со структурным белком митохондрий, цитохром с, локализованный в липидной фазе, сравнительно легко отделяется от структур и свободно переходит в раствор при действии на митохондрии некоторых повреждающих агентов, при этом митохондрии теряют способность к окислительному фосфорилированию.

При активировании свободнорадикального окисления в митохондриях образующиеся свободные радикалы приводят к разобщению окислительного фосфорилирования, снижению мембранного потенциала, набуханию митохондрий, изменению проницаемости митохондриальной мембраны, увеличению ионов Ca^{2+} , что приводит к образованию неспецифической митохондриальной поры и индукции апоптоза [12]. Важная роль в запуске апоптоза принадлежит митохондриям; выход цитохрома с приводит к запуску каскада реакций, катализируемых каспазами [11]. Считается, что одной из причин выхода цитохрома с из внутренней митохондриальной мембраны является пероксидация, приводящая к окислительному повреждению кардиолипидов.

В этой связи нами проведено исследование по определению количества кардиолипидов в митохондриях при ОМ. Как показали исследования, нами обнаружено уменьшение содержания кардиолипидов в митохондриальной фракции головного мозга животных с экспериментальным ОМ (табл.2).

Таблица 2. Изменение содержания цитохромов и кардиолипидов в митохондриях головного мозга в норме и при ОМ (n= 7)

Цитохромы, нмоль/мг белка	Контроль	ОМ
в	$0,140 \pm 0,006$	$0,112 \pm 0,005^{**}$
с	$0,182 \pm 0,012$	$0,113 \pm 0,011^{**}$
с ₁	$0,145 \pm 0,007$	$0,100 \pm 0,006^{*}$
а	$0,218 \pm 0,009$	$0,185 \pm 0,008^{***}$
В ₅	$0,183 \pm 0,01$	$0,138 \pm 0,009^{**}$
Содержание кардиолипидов, мкг/г ткани	$198,54 \pm 7,2$	$133,4 \pm 6,3^{*}$

Примечание: * – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,05$

Согласно данным литературы, кардиолипиды принимают участие в связывании отдельных компонентов дыхательной цепи друг с другом, и локализованы они исключительно в энергозапасующих мембранах митохондрий [4]. С кардиолипидами связывают переходы между метаболическими состояниями (1-4 состояние по Чансу). В митохондриях мозга интактных животных кардиолипиды прочно связаны; отщепление кардиолипидов сопровождается торможением активности цитохромоксидазы, нарушением стабилизации и активности сукцинат-дегидрогеназы [10].

Наши исследования показали, что при ОМ имеет место уменьшение содержания кардиолипидов в митохондриальной фракции головного мозга крыс. Нам представляется, что образующиеся свободные радикалы вызывают окислительное повреждение кардиолипидов, в результате чего содержание их в мито-

хондриях уменьшается. В нормальных условиях кардиолипины удерживают цитохром с. При активации свободнорадикального окисления в митохондриях кардиолипины окисляются и освобождают цитохром с. После выхода в цитоплазму он образует комплекс с фактором активации апоптоза (АраF-1), активирующей нижестоящие каспазы, которые осуществляют апоптоз клеток.

Таким образом, очевидно, что развитие патогенеза изученного нами патологического процесса сопровождается молекулярными изменениями мембраны митохондрий, являющихся как непосредственной мишенью повреждающего действия патогенных факторов, так и вовлеченных в патологический процесс в связи с инициацией механизмов повреждения клетки (дефицит энергопродукции, интенсификация процессов свободнорадикального окисления, изменение состава фосфолипидов).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление в биологических мембранах М., Наука, 252 с., 1972.
2. *Евдотиенко Ю.С., Евдотиенко Ю.С., Монова Е.Н.* Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, М., Наука, 153 с., 1967.
3. *Квитницкий-Рыжов Ю.Н.* Современное учение об отеке и набухании головного мозга, Киев, Здоровье, 170 с., 1988.
4. *Милейковская Е., Ханг М., Доухан В.* Роль кардиолипина в энергозапасующих мембранах. Биохимия, 70, с.191-196, 2005.
5. *Методы биохимических исследований*, Л., изд-во Ленинградского университета, 272 с., 1982.
6. *Овсепян Л.М., Захарян Г.В., Карагезян К.Г.* Особенности качественных и количественных изменений гликолипидов в мозговой ткани белых крыс с экспериментальным острым отеком мозга. Нейрохимия, 22, с.195-201, 2005.
7. *Современные методы в биохимии*, М., изд-во Медицина, 391 с., 1977.
8. *Lowry N.J., Rosenbogh, A.J., Farr et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent J.Biol. Chem, vol.153, p.265-275, 1951.
9. *Genova M., Veutura B., Giuliano G. et al.,* The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex 1 is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster 2. FEBS Lett, 505, p.368, 2001.
10. *Pfejffer K., Gohil V., Stuart R. et al.* Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. J.Biol. Chem., 278, p.52873-52880, 2003.
11. *Susin.S.A., Lorenzo N.K., Samzami N.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature, 397, p.441-446, 1999.
12. *Zoratti M., Szabo J.* Novel channels of the inner mitochondrial membrane. Biochem. Biophys. Acta, 5, p.351-63, 2009.

Поступила 08.06.2010