

5. Кочетыгов Н. И. Ожоговая болезнь. Л., 1973.
6. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаян Е. А. Журн. exper. и клинич. медицины АН Арм. ССР, 1975, т. 15, 2, стр. 3.
7. Bangham A., Standish M., Watkin J. J. Mol. Biol., 1965, 13, 1, 288.
8. Bieri J., Anderson A. Arch. Biochem. Biophys., 1960, 90, 105.
9. Mueller R., Rudin D., Tien H., Wescott T. J. Phys. Chem., 1963, 67, 2, 534.

УДК 616:577.115

А. С. СЕИЛАНОВ, Г. А. ПОПОВ, В. В. КОНЕВ

СВЯЗЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ С ДЫХАНИЕМ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ

На нативных митохондриях установлено, что относительно слабое активирование перекисного окисления эндогенных липидов низкими концентрациями FeCl_2 в среде приводит к стимулированию потребления кислорода и окислительного фосфорилирования, при интоксикации ПОЛ эти функциональные показатели митохондрий становятся ниже контроля.

В последнее время все большее внимание уделяется изучению роли процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в развитии целого ряда заболеваний. Интенсификация ПОЛ не является процессом, специфическим для какой-либо определенной патологии, и обнаруживается при злокачественном росте [1], Е-авитаминозе [2], действии ионизирующего излучения [3, 4], токсическом действии галогеналканов [5], ишемических повреждениях [6], атеросклерозе [7], стрессе [8] и др.

В процессе ПОЛ образуются продукты окисления жирных кислот, входящих в состав клеточных мембран, которые являются высокореакционными соединениями, оказывающими влияние на структурную организацию и функциональную активность различных мембранных структур. Проведено немало исследований [9, 10] на различных структурах, выделенных из клеток, мембранах митохондрий, микросом, эндоплазматического ретикулума и т. п. Однако практически все эксперименты велись при глубоком перекисном окислении липидов [9, 10], а механизм образования и первичного действия продуктов ПОЛ в условиях, приближенных к физиологическим, остается малознанным.

ПОЛ в биомембранах можно моделировать действием различных химических прооксидантов, например, ионами двухвалентного железа. Такое инициирование широко используется для изучения кинетики развития процессов ПОЛ как *in vitro*, так и *in vivo*.

Цель настоящего исследования—выявить связь между развитием реакций ПОЛ в биомембранах митохондрий и проявлением их функциональной активности. В качестве основных функциональных показателей были выбраны тесты—потребление кислорода митохондриями и сопряженный процесс окислительного фосфорилирования. Имея в виду тот факт, что ПОЛ протекает в пределах митохондриальных мембран, в которых локализованы и ферментные системы, ответственные за процесс дыхания и окислительного фосфорилирования, можно пред-

полагать наличие взаимосвязи между этими процессами и изменение степени функциональной активности митохондрий.

Материал и методы

Объектом исследования служили митохондрии из печени мышей линии СВА₅₇, выделенные методом дифференциального центрифугирования в растворе сахарозы в присутствии 1 мМ ЭДТА [11]. Перед вторым промыванием митохондрий среду выделения освобождали от ЭДТА, которая является ингибитором перекисного окисления липидов. Концентрацию белка определяли по Lowry [13]. 0,5 мл исходной суспензии митохондрий, содержащей 20 мг белка, были суспендированы в 8 мл среды инкубации, содержащей 130 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, 10 мМ MgCl₂, pH 7,4, либо в 8 мл среды выделения (без ЭДТА). Митохондрии инкубировали при температуре 37°C в атмосфере воздуха при постоянном перемешивании. В качестве добавок использовали 0,2 М K₂HPO₄ (0,5 мл), 0,2 М-сукцинат (0,5 мл), 0,04 М АДФ (0,5 мл), альбумин бычьей сыворотки в концентрации 3 мг/мл. Перекисное окисление инициировали введением соответствующих концентраций двухвалентного железа без добавочного восстановителя. Об активности ПОЛ судили по цветной реакции малонового диальдегида (МДА), образующегося в ходе ПОЛ, с 2-тиобарбитуровой кислотой [13]. МДА определяли в пробах по 0,5 мл, к которым добавляли по 0,5 мл 20% трихлоруксусной кислоты и по 1,5 мл 0,67% 2-тиобарбитуровой кислоты (Serva). После 10 мин кипячения и центрифугирования измеряли поглощение раствора при 532 нм и выражали концентрацию МДА в моль/мг белка. Коэффициент экстинкции принимали равным $1,56 \times 10^5$.

Параллельно процессу перекисного окисления исследовали потребление кислорода митохондриями в метаболически активном состоянии и сопряженное с ним окислительное фосфорилирование. Скорость окислительного фосфорилирования определяли по убыли из среды неорганического фосфата, который определяли по методу Fiske—Subbarow [14].

Скорость потребления кислорода митохондриями определяли полярографически на полярографе «Микроастроб» (Дания) в ячейке объемом 75 мкл. В качестве субстрата дыхания использовали сукцинат.

Результаты и обсуждение

Количество МДА, образующегося в суспензии митохондрий, интенсивность окислительного фосфорилирования и скорость потребления кислорода определяли через 0, 15, 30, 60, 120 и 180 мин с начала инкубации.

На рис. 1 приведены зависимость накопления МДА (А), потребление кислорода (Б) и окислительное фосфорилирование (В) в суспензии митохондрий от времени инкубации. Из рис. 1 А видно, что в присутствии в среде 50 мкМ Fe²⁺ происходит накопление до $9 \cdot 10^{-9}$ моль МДА/мг белка к 3 часам инкубации (кривая 2), в то время как в контроле накапливается не более $4 \cdot 10^{-10}$ молей МДА/мг белка митохонд-

рий. При этом в присутствии Fe^{2+} происходит угнетение потребления кислорода и неорганического фосфата в 3 раза по сравнению с соответствующим контролем через 3 часа инкубации.

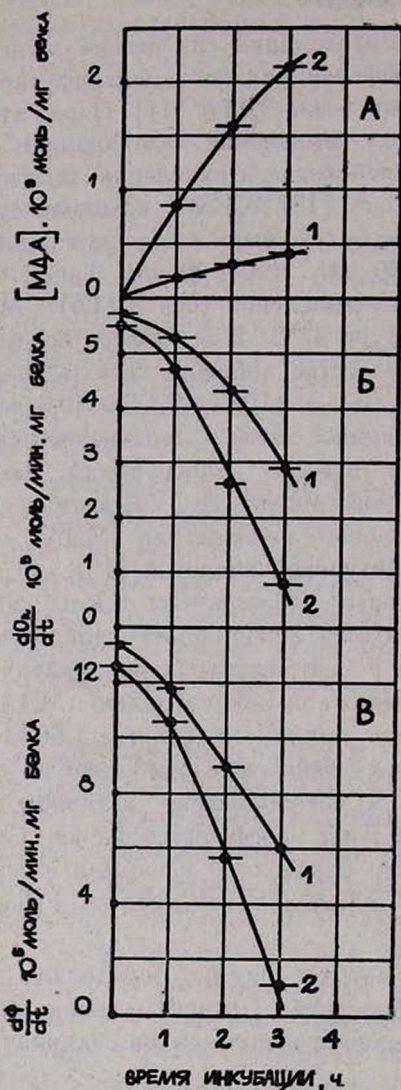


Рис. 1 Накопление малонового диальдегида (А), потребление кислорода (Б) и неорганического фосфата (В) в процессе инкубации митохондрий. Среда инкубации: 200 мМ сахарозы, 20 мМ Трис- HCl , 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ K_2HPO_4 , pH 7.3. Субстрат окисления: 5 мМ сукцинат, 2 мМ АДФ. Концентрация митохондриального белка—1 мг/мл, сывороточный альбумин—0,3 мг/мл. FeCl_2 — $5 \cdot 10^{-5}$ М. (1)—нативные митохондрии, (2)—то же в присутствии ионов Fe^{2+} . Среднеквадратичная ошибка средних величин не превышает 8%.

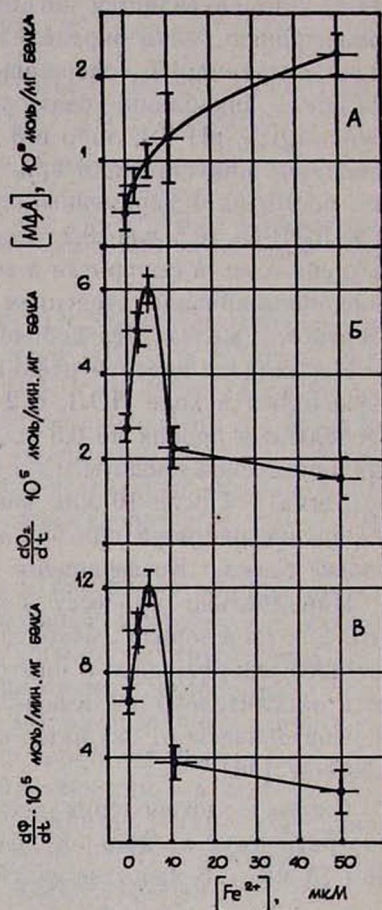


Рис. 2 Зависимость накопления малонового диальдегида (А), скорости поглощения кислорода (Б) и неорганического фосфата (В) в суспензии митохондрий от концентрации Fe^{2+} в среде через 3 часа инкубации. Условия инкубации те же, что и для рис. 1

Оказалось, что в зависимости от интенсивности процессов ПОЛ, регулируемой концентрацией Fe^{2+} в среде, скорость потребления кислорода и синтеза АТФ может не только подавляться, но, наоборот, усиливаться.

На рис. 2 приведена зависимость накопления МДА (А), скорость потребления кислорода (Б) и фосфора (В) в суспензии митохондрий через 3 часа инкубации от концентрации ионов железа в среде. Из рис. 2, А видно, что в исследованном диапазоне концентраций железа количество накапливаемого МДА увеличивается с ростом концентрации ионов железа. В то же время при относительно малых концентрациях железа (менее 10 μM) наблюдается стимулирование как потребления кислорода (рис. 1, Б), так и фосфора (рис. 1, В). Максимальное стимулирование (в 2 раза по отношению к контролю) наблюдается при концентрации около 5 μM Fe^{2+} в среде инкубации.

Как следует из рис. 1, А, Б, В (кривые 1), в процессе инкубации митохондрий скорость потребления кислорода (Б) и фосфорилирования (В) снижалась в контрольных вариантах при отсутствии в среде экзогенного железа. Исключение из инкубационной среды сахарозы или сывороточного альбумина усиливало этот эффект (данные не приводятся). Частично такое снижение функциональной активности митохондрий может быть обусловлено нарушением проницаемости мембран митохондрий для катионов, накоплением их в митохондриях и набуханием последних [15], о чем свидетельствует то, что при этом митохондрии подвергаются частичному переокислению (рис. 1, А, кривая 1) и, следовательно, повреждению.

Ингибирующее действие ПОЛ на дыхание и окислительное фосфорилирование при концентрациях ионов Fe^{2+} в среде 10 μM и более может быть следствием нарушения структурной организации мембран, что соответствует литературным данным [2, 19, 20]. Несколько неожиданным является эффект стимулирования функциональной активности митохондрий при относительно малых концентрациях Fe^{2+} в среде. При этом, вероятно, митохондрии обладают способностью реагировать на развитие в них ПОЛ небольшой интенсивности путем включения энергетической защиты.

Возможно также, что стимулирование функциональной активности митохондрий под влиянием ПОЛ, в свою очередь, развивающихся в клетках при различных патологиях, является одним из регуляторных механизмов, поддерживающих ПОЛ в нормальных клетках на низком уровне. Это может иметь важное принципиальное значение для понимания механизма защиты биосистем на клеточном уровне организации от влияния повреждающих факторов, опосредованных через перекисное окисление липидов.

ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ԿԱՊԸ ՇՆՁԱՌՈՒԹՅԱՆ
ԵՎ ԲԲՎԱՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՑՄԱՆ ՀԵՏ

Նատիվ միտոքոնդրիումներում որոշվել է թթվածնի և անօրգանական ֆոսֆորի ծախսման արագության կախվածությունը էնդոգեն լիպիդային պերօքսիդացման ինտենսիվությունից:

Միջավայրում FeCl_2 իոնների կոնցենտրացիան 10MKM -ից ցածր լինելու դեպքում մալոնային դիալդեհիդի քանակության բարձրացման ֆոնի վրա թթվածնի և ֆոսֆատի յուրացումը ավելանում է 2 անգամով: 10MKM -ից բարձր լինելու դեպքում միտոքոնդրիալ լիպիդային պերօքսիդացման պրոցեսների ինտենսիվացումը ուղեկցվում է թթվածնի և ֆոսֆատի յուրացման իջեցումով:

A. S. SEYLANOV, G. A. POPOV, V. V. KONEV

CONNECTION OF PEROXIDE OXIDATION OF MITOCHONDRIAL
LIPIDS WITH BREATHING AND OXIDATED PHOSPHORYLATION

It has been established on native mitochondria, that relatively weak activation of endogenous lipids' peroxide oxidation by low concentrations of FeCl_2 results in stimulation of oxygen consumption and oxidative phosphorylation; in case of intensification of peroxide oxidation of lipids these functional indices are lower of the control.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Биленко М. В. В кн.: Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., 1982, стр. 195.
2. Владимир Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972
3. Карльсон К., Леси Л., Уре Л. В кн.: Эмоциональный стресс. Л., 1970, стр. 158.
4. Калмыкова В. И. Там же, стр. 181.
5. Козлов Ю. П., Коган В. Е. и др. Инф. бюлл. Научного совета по пробл. радиобиологии АН СССР. М., 1975, 18, стр. 115.
6. Кузин А. М. Известия АН СССР, сер. биол., 1980, 6, стр. 883.
7. Мэдди Э. Биохимическое исследование мембран. М., 1979.
8. Попов Г. А., Конев В. В. Радиобиология, 1978, 18, 4, стр. 507.
9. Романцев Е. Ф., Бичейкина Н. И. и др. Митохондрии. Структура и функции. М., 1966.
10. Эммануэль Н. М., Липчина Л. П. ДАН СССР, 1958, 121, 1, стр. 141.
11. Nohl H., Breuninger V., Hegner D. Eur. J. Biochemistry, 90, 385—390, 1978.
12. Watanabe T., Nakamura T. J. Biochemistry, 86, 1041, 1979.
13. Loury O., Rosenbrough N. et al. J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
14. Fiske C. N., Subarrow Y. J. Biol. Chem., 66, 37, 1925.
15. Hunter F., Gebicki J. et al. J. Biol. Chem., 238, 2, 1963.
16. Osafumi S., Hiroshi Y. Biochem. et biophys. acta, 572, 531, 1979.
17. Kaname A., Setsuo M. et al. Okayama-Igakkaizasshi, 92, 1015, 1980.