

**ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ НАД.Н ОКСИДАЗЫ И ВЫХОДА ЦИТОХРОМА C
ИЗ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ПРИ АВТООКИСЛЕНИИ
И ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДОВ ПРИ ИШЕМИИ**

Ахмедова Саидахон Эргашали кизи

базовый докторант,
Национальный Университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Джаббарова Гулчехра Мухамед-Каримовна

доцент, Национальный Университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Мирзакулов Собитжон Олтинович

PhD, Национальный Университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Абдуллаева Гулбахор Толибжоновна

ст. науч. сотр. института Биофизики и биохимии
при Национальном Университете Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Анварова Гулиода Анвар кизи

магистрант,
Национальный Университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: PhD.mr.Urinov@mail.ru

**CHANGES IN THE ACTIVITY OF NAD H OXIDASE, AND RELEASE OF CYTOCHROME C
FROM THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE WHEN OXIDATION
AND PEROXIDE OXIDATION OF LIPIDS DURING ISCHEMIA**

Saidakhon Akhmedova

Basic doctoral student,
National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent

Gulchehra Djabbarova

Assistant professor,
National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent

Sobitjon Mirzakulov

PhD,
National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent

Gulbahor Abdullaeva

Senior Researcher at the Institute of Biophysics and Biochemistry
at the National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent

Gulshoda Anvarova

Master,
National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

В данной статье описан эксперимент, который был проведен в митохондриях, выделенных из печени крысы, инкубированных в условиях ишемии при 36,7 °С (аутоокисление). В результате образовывался малоновый диальдегид, и этот процесс ускорялся по мере продолжения эксперимента. Образование малонового диальдегида резко ускоряется в процессе инкубации при добавлении в митохондрии активатора перекисного окисления.

ABSTRACT

In this article, an experiment was carried out in mitochondria isolated from rat liver, incubated under ischemic conditions at 36.7°C (autooxidation), malondialdehyde was formed, and this process accelerated as the experiment continued. The formation of malondialdehyde is sharply accelerated during incubation when a peroxidation activator is added to the mitochondria.

Ключевые слова: митохондрия, печень, крыс, ишемия, аутоокисление, малоновый диальдегид.

Keywords: mitochondria, liver, rats, ischemia, autooxidation, malondialdehyde.

После получения результатов исследований о важной роли цитохрома *c* в процессах апоптоза и некроза интерес к изучению данной проблемы возрастает [1, 2]. По мнению некоторых исследователей, одним из факторов, вызывающих апоптоз, является выброс цитохрома *c* и других индукторов из внутренней мембраны в результате разрыва внешней мембраны из-за чрезмерного набухания митохондрий [3, 4, 5]. Однако в других исследованиях [6] указывается на то, что выход цитохрома *c* осуществляется также из интактных митохондрий. Деструкция митохондрий приводит к высвобождению цитохрома *c* из внутренней мембраны через митохондриальные «поры», что приводит к разрушению клеток [7, 8]. Цитохром *c* сигнализирует о начале апоптоза, который часто сопровождается появлением различных патологических состояний.

Мишенью для активной формы кислорода является повреждение участка ДНК митохондрий [9, 10]. Повреждение митохондриальной ДНК [11] инициирует «митохондриальные заболевания».

Однако до настоящего времени не проводился сравнительный анализ активности НАДН – оксидазы в изолированных митохондриях, которые были инкубированы с добавлением или без добавления активатора перекисного окисления липидов в условиях ишемии.

Цель исследования. В процессе инкубации митохондрий, выделенных из печени при базальной температуре (36,7°C) исследовать изменения липидного обмена в условиях аутоокисления и перекисного окисления липидов.

Материалы и методы исследования. Митохондрии из печени крыс были выделены при помощи дифференциального центрифугирования [12] с некоторыми модификациями [13] с использованием 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-НСl – буфера, pH 7,4, 2 мМ ЭДТА. Затем изолированные митохондрии дважды промывали и очищали в среде для выделения без ЭДТА. Изолированные митохондрии были разделены на две группы: первая группа – в качестве контроля, а к митохондриям второй группы добавили активатор перекисного окисления липидов.

Затем митохондрии инкубировали при 36,7°C при постоянном перемешивании в течение 15 мин. Результаты, полученные до инкубации и во время инкубационного периода, сравнивали и анализировали.

Аскорбат – зависимую скорость перекисного окисления липидов определяли микрометодом, предложенным Ю.А. Владимировым и А.И. Арчаковым по тиобарбитуратовой кислоте [14].

Интактные митохондрии дают возможность изучить, прежде всего, интенсивность процесса дыхания и окислительного фосфорилирования, которая в той или иной степени зависит от активности ферментов дыхательной цепи митохондрий. Однако интактные митохондрии не позволяют судить о полной активности этих ферментов, так как это связано с тем, что с одной стороны существует система окислительного фосфорилирования митохондрий, с другой – ограниченный доступ окисляющих субстратов к активному центру ферментов.

Учитывая это мы использовали единожды, замороженные-и размороженные митохондрии для изучения активности митохондриальных оксидаз [15]. Влияние флавоноидов на активность оксидазных систем дыхательной цепи митохондрий определяли полярографическим методом. Известно, что митохондрии печени имеют две системы окисления – внутренний путь фосфорилирования при окислении субстратов и сукцината НАД и внешний путь свободного окисления при добавлении НАДН. Начальным звеном дыхательной цепи этого пути является НАДН₂ – цитохром В₅ – редуктаза.

Один из этих путей окисления (внутренний путь) тормозится ротеноном. Среда измерения: pH 7,4, 0,05 – М трис – HCl, 0,005 М гистидин и 0,66 М сахараза.

Активность ротенон – чувствительной НАДН – оксидазы была определена в объеме 1 мл ячейки в 3 мкМ НАДН₂. Активность НАДН – оксидазы также определялась в присутствии 2 мкг ротенона. По активности суммарной НАДН – оксидазы рассчитывалась активность НАДН оксидаз, которые воспринимают и не воспринимают ротенон [15]. Активность оксидаз выражали в нанogramмах атома кислорода, потребленного за 1 минуту из расчета 1 мг митохондриального белка при 25°C. Реакцию инициировали добавлением митохондрий к среде измерения в клетке. Количество белка в митохондриях определяли по методу Lowry et al. [16].

Результаты и их обсуждение. Результаты по изучению влияния аутоокисления и перекисного окисления липидов на малоновый диальдегид в митохондриях в условиях ишемии представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Изменение образования малонового диальдегида в митохондриях при аутоокислении и перекисном окислении липидов при ишемии ($M \pm m, n = 10-12$)

Показатель	Время, минуты	Скорость реакции перекисного окисления липидов, нМ малонового диальдегида / мг мин белка			
		АО	%	ЛПО	%
Малоновый диальдегид	0	0,060±0,01	100	0,060±0,01	100
	3	0,062±0,01	104	0,075±0,02	124,9
	6	0,065±0,02	109	0,085±0,04	142,0
	9	0,067±0,02	112	0,010±0,06	166,4
	15	0,069±0,03	115	0,110±0,08**	183,3

Примечание. Различия в надежности здесь и в других таблицах: * $R < 0,05$; ** $R < 0,02$; *** $R < 0,01$; **** $R < 0,001$. АО – аутоокисление, ЛПО – перекисное окисление липидов. Перекисное окисление липидов в митохондриях измеряли, добавляя 20 мкМ $FeSO_4 + 0,2$ аскорбата. Накопление малонового диальдегида измеряли при оптической плотности 532 нм, $KCl - 115$ мМ, $NaH_2PO_4 - 1$ мМ, трис- $HCl - 5$ мМ (рН 7,4) в среде измерения и температуре 36,7 °С.

Если при инкубации аутоокисленных митохондрий в течение 3 и 6 мин не наблюдалось изменений в образовании малонового диальдегида, то в течении 9 и 15 мин этот показатель увеличивался на 12,0 и 15% соответственно. При измерении путем добавления активатора перекисного окисления липидов в митохондриях количество малонового диальдегида через 3 и 6 минут увеличивалось на 29,9 и 42,0% соответственно. Продолжение эксперимента значительно ускорило увеличение количества малонового диальдегида. Если за 9 минут этот показатель увеличился на 66,4%, то за 15 минут увеличился на 83,3%.

Таким образом, при ишемии, перекисное окисление липидов в митохондриях происходит за счет аутоокисления и находится в прямой зависимости от продолжительности ишемии, однако при добавлении

активатора перекисного окисления липидов этот процесс резко усиливается.

Митохондрии печени имеют две системы системного окисления – субстраты, которые фосфорилируются и окисляются сукцинатом и НАД во внутренней дыхательной цепи, а после добавления НАД происходит внешнее свободное окисление, которое проходит через НАДН₂ – цитохром В₅ – редуктазу [17] (рис. 1). Внутренний путь в дыхательной цепи ингибируется ротеноном. Внешний путь окисления НАД чувствителен к цитохромоксидазой флавин – 5 – цитохром В₅ только тогда, когда цитохром с, расположенный на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны, выходит из мембраны в мембранное пространство, и ротенон не оказывает влияния на этот путь.



1 – окисление НАДН CoQ под действием фермента НАДН – CoQ -редуктазы и одновременное образование супероксида (O_2^-); 2 – окисление восстановленного цитохрома с, катализируемое $CoQH_2$ – цитохром s – редуктазой, и одновременное образование супероксида (O_2^-) из O_2 ; 3 – окисление восстановленного цитохрома с кислородом под действием цитохромоксидазы; 4 – повторное окисление супероксида (O_2^-) до O_2 за счет утечки цитохрома между митохондриальными мембранами; 5 – превращение O_2^- в N_2O_2 катализом супероксиддисмутазы; 6 – превращение H_2O_2 в H_2O и в O_2 под действием каталазы; 7 – превращение восстановленного глутатиона до окисленного глутатиона под действием глутатионпероксидазы при участии H_2O_2 [17].

Рисунок 1. Дыхательная цепь (митохондрии) и антиоксидантные системы митохондрий

Результаты, полученные по изучению высвобождения цитохрома *c* из внутренней мембраны митохондрий при аутоокислении и перекисном окислении липидов при ишемии представлены в таблице 2.

Если окисление ротенон-чувствительной НАД.Н-оксидазы (внутреннее дыхание) увеличивалось на 7,9% и 29,5% соответственно при инкубации митохондрий в условиях аутоокисления в течение 3 и 6 мин, и было равно контрольному значению, то через 9 мин и 15 мин этот показатель снизился на 31,1% по сравнению с контролем. Активность ротенон нечувствительной НАД.Н-оксидазы (внешнее дыхание), напротив, практически не изменяется спустя 3 минуты инкубации, а затем постепенно увеличивается. Если инкубация на 6 минуте увеличивается на 18,4%, то 9 и 15 минут она увеличивается на 35,5 и 43,0%

соответственно. Активность ротенон-чувствительной НАД.Н-оксидазы увеличивается на 26,5% через 3 мин при инкубации с добавлением активатора липидов, через 6 мин по сравнению с предыдущим временем, увеличивалась на 14,8% относительно контроля. Напротив, на 9-й минуте эксперимента этот показатель снизился на 12,1% по сравнению с контролем, а на 15-й минуте – на 56,6%. При инкубации с добавлением к митохондриям активатора перекисного окисления липидов активность НАД.Н-оксидазы, нечувствительной к ротенону, начинала увеличиваться с начала инкубации и соответственно ускорялась по мере продолжения эксперимента. Если на 3-й минуте эксперимента она увеличилась на 18,9%, то на 6, 9 и 15 минутах – на 32,8; 52,9 и 68,7% соответственно.

Таблица 2.

Изменения активности ротенон-чувствительной и ротенон – нечувствительной НАД.Н-оксидаз при аутоокислении и перекисном окислении липидов при ишемии ($M \pm m$; $n = 10-12$)

Показатели	Время, минуты	Скорость дыхания, нанограмм атом кислород/мин мг белка			
		АО	%	ЛПО	%
Ротенон чувствительная НАД.Н – оксидаза	0	51,61±5,12	100	51,61±5,12	100
	3	55,69±5,18	107,9	65,28±5,08	126,5
	6	66,83±5,79	129,5	59,25±4,52****	114,8
	9	49,80±6,66****	96,5	45,36±5,32****	87,9
	15	30,40±5,30****	68,9	22,40±3,60****	43,4
Ротенон не чувствительная НАД.Н – оксидаза	0	5,14±0,38	100	5,14±0,38	100
	3	5,37±0,33	104,5	6,11±0,37	118,9
	6	6,08±0,33	118,4	6,82±0,45	132,8
	9	6,96±0,39****	135,5	7,86±0,40****	152,9
	15	7,35±0,50****	143,0	8,67±0,37****	168,7

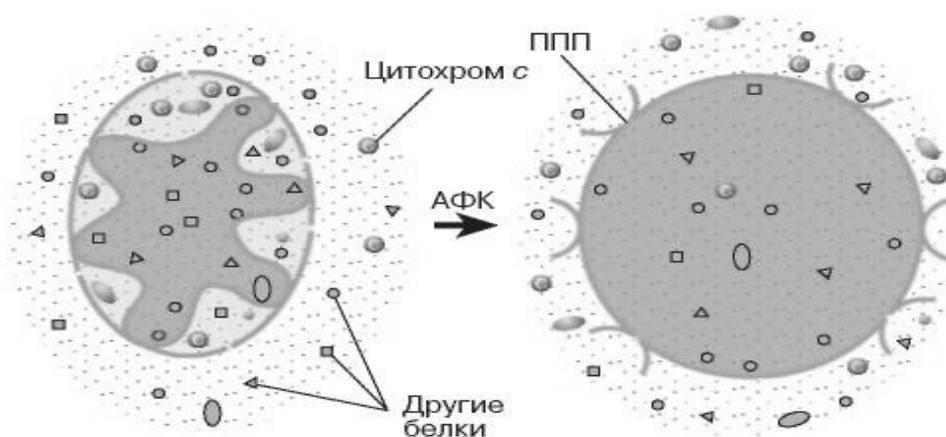


Рисунок 2. Открытие «пор» (дыр) во внутренней мембране митохондрий под действием активной формы кислорода (АФК) приводит к набуханию митохондриального матрикса, разрыву внешней мембраны митохондрий, выходу цитохрома *c* и других проапоптотических белков через мембрану. Синие точки – это низкомолекулярные вещества в пространстве между мембранами, когда матрикс и поры закрыты [17]

Таким образом, при инкубации митохондрий при ишемии (автоокисление), активность ротенон-чувствительной НАДН – оксидазы начинает медленно увеличиваться через 3 минуты эксперимента, достигая максимального значения к 6 минуте, а спустя 9 минут приближается к контрольным показателям и, снижается через 15 минут, в то время как активность ротенон – нечувствительной НАДН – оксидазы наоборот, начинает медленно увеличиваться, и этот процесс ускоряется по мере продолжения эксперимента.

При инкубации с добавлением активатора перекисного окисления липидов митохондрий пик активности НАДН – оксидазы достигается в течение 3 минут, а затем постепенно начинает уменьшаться. В то же время активность ротенон-нечувствительной НАДН – оксидазы, увеличивается с начала инкубации и соответственно ускоряется по мере продолжения эксперимента. Анализируя полученные результаты, можно заключить, что выброс цитохрома *c* из внутренней мембраны митохондрий в интерстициальное пространство при аутоокислении в условиях ишемии сначала практически не наблюдается, но при продолжении инкубации этот процесс начинает усиливаться,

значит этот процесс значительно усиливается при инкубации с добавлением активатора перекисного окисления.

Выводы:

1. Когда митохондрии, выделенные из печени крысы, инкубировали в условиях ишемии при 36,7°C (аутоокисление), образовывался малоновый диальдегид, и этот процесс ускорялся по мере продолжения эксперимента. Образование малонового диальдегида резко ускоряется при инкубации при добавлении в митохондрии активатора перекисного окисления.

2. При аутоокислении активность ротенон чувствительной НАДН– оксидазы в митохондриях снижается, активность ротенон – нечувствительной НАДН– оксидазы увеличивается за счет высвобождения цитохрома *c* из внутренней мембраны, а при перекисном окислении липидов эти изменения ускоряются.

3. При различных стрессовых состояниях и патологиях высвобождение цитохрома *c* из внутренних мембран митохондрий клеток организма аналогично высвобождению цитохрома *c* при ишемии в изолированных митохондриях.

Список литературы:

1. Бодрова М.Э., Дедухова В.И., Мохова Е.Н. Генерация трансмембранного электрического потенциала при окислении НАДН по внешнему пути и разобщающее действие жирных кислот после кратковременного открытия Ca^{2+} – зависимой циклоспорин А – чувствительной поры в митохондриях печени. // Биохимия, 2000. – Т. 65. – вып. 4. – С. 562-569.
2. Галитовский В.Е., Гогвадзе В.Г. Исследование Ca^{2+} аккумулирующей способности митохондрий тимоцитов при апоптозе. //Биохимия, – 2001, – Т.66, - вып.6, С. 775-779.
3. Фильченков А.А., Абраменко И.В. Апоптоз в патогенезе заболеваний человека. – Киев: ДНА, 2001. – 120 с.
4. Фильченков А.А., Залесский В.Н. Апоптоз кортикальных нейронов при развитии ишемических инсультов // Нейрофизиология. – 2002. – Т. 34, №6. – С. 468-484.
5. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунов Е.М. Программируемая клеточная смерть // Биохимия. – 2000. – Т. 65, Вып. 8. – С. 1029-1046.
6. Skulachev V.P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades // FEBS Letters, 1998. – Vol. 423. – № 3, – Pp. 275-280.
7. Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. // Science, – 1997. – V. 275. – N.5303, – Pp. 1129-1132.
8. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis.// Science, – 1998. – V. 281. – № 5381, Pp. 1309-1312.
9. Allen R.G., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. // Free Radic Biol Med., 2000, v. 28, № 3, Pp. 463-499.
10. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов. // Биохимия, 2002, т. 67, № 3, С. 281-292.
11. Alam T.I., Kanki T. et al. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM // Nucleic Acids Res., 2003. V. 31, Pp. 1640-1645.
12. Schneider W.C., Hogeboom G.N. Cytochemical studies of mammalian tissues the isolation of cell components by differential centrifugation. // Cancer. Res. – 1951. – V. 19. – Pp. 1 – 22.
13. Алматов К.Т., Юсупова У.Р., Абдуллаев Г.Р. ва бошқалар. Организмининг нафас олиши ва энергия хосил қилишини аниқлаш. Тошкент. - 2013. – Б. 103.
14. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисная окисление липидов в биологических мембранах// – Москва: Наука. 1972. – С. 214.
15. Алматов К.Т. Механизмы развития повреждений мембран митохондрий и роль липолитической системы: дис. докт. биол. наук, Ташкент, – 1990. – 390 с.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent// J. Biol. Chem., – 1951. – V. 193. – № 1. – Pp. 265 – 274.
17. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: Роль активных форм кислорода // Соросовский Образовательный Журнал. – 2001, – Т. 7, – №6, – С. 4-10.