

ИШЕМИЯДА МИТОХОНДРИЯЛАРДА ЭНЕРГИЯ АЛМАШИНУВИНИ АВТООКСИДЛАНИШ ВА ЛИПИДЛАРНИНГ ПЕРЕКИСЛИ ОКСИДЛАНИШИДА ЎЗГАРИШИ

Ахмедова С.Э.¹, Мирзакулов С.О.², Алматов К.Т.³

РЕЗЮМЕ

Ишемия шароитида каламуш жигаридан ажратилган митохондрияларни 36,7°C да инкубация қилишда малон диальдегиди ҳосил бўлади ва бу жараён тажрибанинг давомийлигига боғлиқ ҳолда тезлашади, митохондрияларнинг нафас олиши ва оксидланувчи фосфорланиш эса пасаяди. Митохондрияларни перекисли оксидланиш активатори қўшиб инкубация қилишда малон диальдегидининг ҳосил бўлиши кескин ошади, нафас олиши ва оксидланувчи фосфорланишнинг пасайиши эса сезилари даражада тезлашади. Демак, ишемида, *in vitro* шароитларида, худди *in vivo* шароитларига ўхшаб эркин радикаллар ҳосил бўлишининг тезлашиши митохондрияларда нафас олиш ва АТФ синтезини пасайтиради.

Калит сўзлар: Жигар, митохондрия, ишемия, автооксидланиш, липидларнинг перекисли оксидланиши.

Долзарблиги. Энергия ҳосил қилиниши ва алмашинувида хужайра митохондриялари асосий роль ўйнайди. Хужайралардаги 95 % АТФ митохондрияларда оксидланишли фосфорланиш жараёнида синтезланади. Аденинин нуклеотидларнинг транслоказаси АТФ синтаза ва оксидланиш энзимлари билан синхрон ишлаши митохондрия ичидаги адениннуклеотидларнинг (асосан АТФ) умумий миқдори назорати остида бўлади ва ана шу миқдорнинг оз ёки кўплигига боғлиқлиги исботланган. Митохондрияда АТФ нинг ишлаб чиқарилиши 15-20% га камайса хужайрада энергияга боғлиқ функциялар 75-80% га пасайиб кетиши аниқланган, натижада касаллик бошланади: марказий асаб тизимининг функцияси, юрак иши, жигар, буйрак ва бошқа аъзоларнинг синтетик жараёнлари бузила бошлайди [Cesimano E.M., Knight A.R., Slusser J.G. et al. 2009].

Митохондрия супероксиданион, водород пероксиди, азот оксиди, пероксинитрит ва шунга ўхшаш редокс-потенциални катта қудратга эга бўлган бошқарувчиларни ишлаб чиқаради, хужайранинг редокс-потенциалини бошқаришда фаол иштирок этади ва ўз навбатида протолизни, транскрипцияни фаоллашувини, мДНК даги ўзгаришни, хужайрадаги алмашинуви ва хужайра дифференцировкасини назорат қилади [Зоров Д.Б., Исаев Н.К. и др., 2007].

Митохондрия одам ва хайвон хужайраларининг фақатгина норма шароитидагина эмас, балки турли хил патологик ҳолатларда ҳам асосий вазифаларни бажарадиган хужайра ичидаги органеллаларнинг энг муҳими

¹ Ахмедова С.Э. – ЎзМУ Биология факультети Физиология ва биофизика кафедраси магистри

² Мирзакулов С.О. – ЎзМУ Биология факультети Физиология ва биофизика кафедраси таянч докторанти

³ Алматов К.Т. - ЎзМУ Биология факультети Физиология ва биофизика кафедраси профессори

ҳисобланади. Кўпчилик патологик жараёнларнинг ривожланиши, шу жумладан, аноксия, ишемия, гемorragик шок ва шу кабилар митохондрияларнинг нормал фаолиятини бузилиши ва митохондрия функцияларининг йўқолиши билан кузатилади. Ҳар хил патологик таъсиротларга митохондрия бирламчи нишон бўлишини кўрсатувчи кўплаб экспериментал натижалар олинган [Wallace D.C., 2001; Szewczyk A., Wojtczak L., 2002; Di L.F., Canton M., Menabo R. et al., 2007; Szeto H.H., 2008].

Аммо, шу вақтгача ажратиб олинган митохондрияларни ишемия шароитида липидларнинг перекисли оксидланишини фаоллаштирувчиси кўшилган ва кўшилмаган шароитда инкубация қилинганда, митохондрияларнинг нафас олиши, оксидланишли фосфорланишини бир-бирларига қиёслаб ўрганилган эмас.

Тадқиқотнинг мақсади. Жигардан ажратиб олинган митохондрияларни тана ҳарорати ($36,7^{\circ}\text{C}$) шароитида инкубация қилиниши жараёнида, автооксидланиш ва липидларнинг перекисли оксидланишида липид алмашинувидаги ўзгаришларни аниқлашдан иборат.

Материаллар ва тадқиқот усуллари. Каламуш жигаридан митохондрияларни дифференциал центрифуга усули билан [Schneider W.C., Hoogeboom G.N., 1951], айрим ўзгартиришлар билан [Алматов К.Т., Юсупова У.Р., Абдуллаев Г.Р. ва б.] $0,25\text{ M}$ сахароза, 10 mM трис- HCl -буфер, $\text{pH } 7,4$, 2 mM ЭДТАдан фойдаланиб ажратиб олинди. Кейин ажратиб олинган митохондрияларни ЭДТА сиз ажратиш муҳитида икки марта ювиб тозаланди. Ажратиб олинган митохондрияларни икки гуруҳга бўлинди: 1- гуруҳдагилар назорат учун қолдирилди, 2- гуруҳдагиларга липидларнинг перекисли оксидланиши активатори кўшилди. Кейин митохондрияларни 80 дақиқа давомида доимий аралаштирилиб турилган ҳолатда $36,7^{\circ}\text{C}$ ҳароратда инкубация қилинди. Инкубациядан олдинги натижа билан инкубация давомида олинган натижалар бир-бирига қиёслаб таҳлил қилинди.

Полярографик ускуна потенциометр КСП-4 асосида йиғилган, унга $0,65$ вольтни доимий ушлаб турувчи полярографик кўшимча уланган. Ускуна айланувчи платинали ва хлорланган кумуш электродлардан, ҳамда 25°C ҳароратни сақлайдиган 1 мл ли ячейкалардан ташкил топган [Алматов К.Т. ва б., 2013]. Жигар митохондрияларини нафас олиши ва оксидланишли фосфорланиши учун ячейкаларга қуйидаги таркибли инкубация муҳити: 250 mM сахароза, 10 mM трис- HCl , $\text{pH } 7,4$ ва 5 mM K_2HPO_4 кўшилди. Бош мия митохондриялари нафас олиши ва оксидланишли фосфорланиши учун - сахароза- 250 mM , KCl - 12 mM , K_2HPO_4 - 5 mM , трис- HCl -буфер - 5 mM ($\text{pH } 7,4$) инкубация муҳитидан фойдаланилди. Флавоноидларни *in vitro* шароитида жигар митохондрияларга таъсирини текшириш учун мақсадга қараб танланган субстратлар, ҳамда митохондриялар кўшилди. Оксидланиш субстрати сифатида 10 mM глутамат олинди. Полярографик ячейкадаги аралашма кислородга сезгир айланувчи платинали электрод билан жадал равишда аралаштирилиб турилди. Инкубация муҳитидан кислород

сарфланишини қайд этиш жараёни ячеякага митохондрия суспензиясини (0,05-0,06мл) киритиш йули билан бошланди.

Митохондрияларнинг нафас олиш ва фосфорланиш кўрсаткичларини ҳисоблаш Чанс-Вильямс мезонлари бўйича ўтказилди [Chance B., Williams G.L., 1955]. Бунда нафас олиш тезлигининг қуйидаги кўрсаткичлари аниқланди: V_2 – оксидланиш субстратини оксидланиш ҳолати, V_3 – АДФ қўшилгандан кейинги фаол фосфорланувчи ҳолат, V_4 - ячеякадаги АДФ ни сарфланиб бўлгандан сўнги ҳолат: Чанс бўйича нафас кўрсаткичи ($HK_4 - V_3/V_4$ нисбати), ҳамда турли субстратларни (10 мМ сукцинат ёки глутамат) оксидланишида АДФ/О нисбати. Митохондрияларнинг барча метаболик ҳолатларда нафас олиш тезлиги 1 мг оксилга нисбатан нанограмм атом кислород/дақиқада ифодаланди.

Липидларнинг перекисли оксидланиши жараёнини НАДФ ва аскорбатга боғлиқ тезлиги Ю.А.Владимиров ва А.И.Арчаковларнинг [1972] микроусули билан тиобарбитир кислота орқали аниқланди. Инкубация муҳити 1 мл хажмли аралашмада: 0,2 мМ $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$; 1 мМ НАДФН (ёки 0,8мМ аскорбин кислота); 0,012 мМ Мор тузи ($FeSO_4(NH_4)_2 \cdot 6H_2O$); 50 мМ трис HCl-буфер, (pH 7,4) ва 50 мкл митохондрия суспензияси ташкил қилди. Назоратдаги синамада НАДФН ёки аскорбин кислотадан ташқари муҳитнинг барча компонентлари солинди. 20 дақиқа давомида 37°C хароратда доимий равишда аралаштирилиб туриб инкубация қилинди. Реакцияни 30% учхлорсирка кислотадан 1 мл дан қуйиб тўхтатилди ва дақиқасига 6000 айланма тезликда 10 дақиқа давомида центрифугалангандан кейин чўкмаси олиб ташланди. Ундан кейин 1,5 мл ли центрифугатга 0,6М тиобарбитир кислотадан 0,3 мл ва 0,12 М тиобарбитир кислотадан 1,2 мл қўшилди. Ҳосил бўлган рангни кучайтириш учун пробиркаларни сув ҳаммомига жойлаштирилди ва 100°C хароратда 10 дақиқа давомида инкубация қилинди. Ҳосил бўлган рангни интенсивлигини спектрофотометрда 535 нм да ўлчанди. Ҳосил бўлган малон диальдегидини 1,56/10 см га тенг моляр экстинция коэффициентида ҳисоблаб топилди. Липидларнинг перекисли оксидланиш реакция тезлигини нМ малон диальдегиди/мг дақиқа оксилда берилди. Митохондриядаги оксил миқдори Lowry O.H. et al., [1951] услуби бўйича аниқланди.

Натижалар ва уларнинг таҳлили. Ишемия шароитида автооксидланиш ва липидларнинг перекисли оксидланишини митохондриялардаги малон диальдегидга таъсири тўғрисида олинган натижалар 1-жадвалда берилган.

Агар, автооксидланишди митохондрияларни 3 ва 6 дақиқалар давомида инкубация қилинганида малон диальдегиднинг ҳосил бўлишида ўзгариш деярли кузатилмаган бўлса, 9 ва 15 дақиқаларга борганда 12,0 ва 15% ларга кўпайди. Митохондрияларга липидларнинг перекисли оксидланишини фаоллаштирувчиси қўшиб ўлчанда эса 3 ва 6 дақиқаларда малон диальдегиднинг миқдори 29,9 ва 42,0% га кўпайди. Тажрибанинг давом этиши малон диальдегиднинг миқдорини кўпайиши сезиларли даражада

тезлаштирди. Агар 9 дақиқада 66,4% га ошган бўлса, 15 дақиқада –83,3% га кўпайди.

1-жадвал

Ишемия шароитида автооксидланиш ва липидларнинг перекисли оксидланишида митохондриядаги малон диальдегидни ҳосил бўлишини ўзгариши ($M \pm m$, $n = 10-12$)

Кўрсаткич	Вақт, дақиқа	Липидларнинг перекисли оксидланиш реакция тезлиги, нМ малон диальдегиди/мг дақиқа оксил.			
		АО	%	ЛПО	%
Малон 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	0,101±0,06	166,4
	15	0,069±0,03	115	0,110±0,08**	183,3

Изоҳ: бу ерда ва бошқа жадвалларда ишончлилиқ фарқлари: *P < 0,05; **P < 0,02; ***P < 0,01; ****P < 0,001. АО – автооксидланиш, ЛПО – липидларнинг перекисли оксидланиши. Митохондрияларда липидларнинг перекисли оксидланиши 20 мкМ FeSO₄ + 0,2 аскорбат кўшиб ўлчанди. Малон диальдегидини тўпланишини 532 нм оптик зичликда, Ксl - 115 мМ, NaH₂PO₄ – 1 мМ, трис-НСl- 5 мМ (рН 7,4) ўлчаш мухитида ва 36,7⁰С хароратда ўлчанди.

Навбатдаги мақсадимиз ишемия шароитида автооксидланиш ва липидларнинг перекисли оксидланишида митохондрияларнинг нафас олиши ва оксидланишли фосфорланишини аниқлашдан иборат бўлди (2 жадвал).

Агар, митохондрияларни автооксидланиш шароитида 3, 6 ва 9 дақиқа давомида инкубация қилинганида V₂ ҳолатдаги оксидланиш 6,7; 17,8 ва 30,5% ларга ошган бўлса, липидларнинг фаоллаштирувчиси кўшиб инкубация қилинганида – 19,0; 28,6 ва 59,8% ларга ошди. Ишемия шароитида митохондрияларнинг нафас олишини ўзгариши фосфорланишли оксидланиш ҳолатида кузатилди. Агар, митохондрияларни автооксидланиш шароитида 3 дақиқа давомида инкубация қилинганида V₃ ҳолатдаги оксидланиш деярди ўзгармаган бўлса, 6 дақиқасида 17,6% га пасайган бўлса, 9 дақиқада – 24,7%га пасайди. Липидларнинг фаоллаштирувчиси кўшиб инкубация қилинганида 3 дақиқада фосфорланишли оксидланиш ўзгармади, аммо кейинги, яъни 6 ва 9 дақиқаларда 6,1 ва 19,8% ларга пасайди. Ишемия шароитида митохондрияларнинг V₄ ҳолатдаги нафас олиши кўпайди, лекин V₂ ҳолатга нисбатан ошиши тезлашди. Агар, митохондрияларни автооксидланиш шароитида 3, 6 ва 9 дақиқа давомида инкубация қилинганида V₄ ҳолатдаги оксидланиш 12,7; 34,0 ва 48,4% ларга ошган бўлса, липидларнинг фаоллаштирувчиси кўшиб инкубация қилинганида – 23,4; 55,7 ва 95,2% ларга ошди.

**Ишемияда автооксидланиш ва липидларнинг перекисли
оксидланишини глутаматни хар хил метаболик ҳолатларда
оксидланишига таъсири ($M \pm m$; $n = 10-12$)**

Кўрсаткичлар	Вақт, дақиқа	Нафас олиш тезлиги, нанограмм атом кислород/мин МГ ОКСИЛ			
		АО	%	ЛПО	%
V ₂	0	31,8±3,7	100	31,8±3,7	100
	3	33,6±3,5	106,7	37,8±3,9	119,0
	6	37,4±4,0	117,8	40,9±4,7*	128,6
	9	41,5±5,3*	130,5	50,8±6,2**	159,8
V ₃ (АДФ)	0	92,5±7,4	100	92,5±7,4	100
	3	97,1±7,9****	105,0	92,1±4,5****	99,6
	6	76,3±5,5****	82,4	80,8±5,2****	93,9
	9	69,6±3,5****	75,3	74,2±4,6****	80,2
V ₄	0	29,5±4,0	100	29,5±4,0	100
	3	33,2±4,7	112,7	36,4±3,8*	123,4
	6	39,6±4,0*	134,0	45,9±3,8***	155,7
	9	43,8±3,8***	148,4	59,6±3,8****	195,2
НК _ч	0	3,13±0,09	100	3,13±0,09	100
	3	2,93±0,06***	93,6	2,53±0,05***	80,8
	6	1,92±0,04****	64,8	1,88±0,04***	63,7
	9	1,59±0,06****	50,7	1,24±0,04***	39,6
АДФ/О	0	2,86±0,07	100	2,86±0,07	100
	3	2,75±0,05****	96,4	2,48±0,07****	86,8
	6	2,07±0,09****	72,2	1,70±0,06****	59,6
	9	1,87±0,06****	65,3	1,42±0,04****	39,7

Ишемия шароитида митохондрияларнинг нафас олишини фосфорланишли оксидланиш ҳолатида пасайиши ва V₄ ҳолатда ошиши Чанс бўйича нафас кўрсаткичи ва АДФ/О коэффицентини пасайишига олиб келди. Бунда ҳам пасайиш автооксидланишга нисбатан липидларнинг перекисли оксидланиши фаоллаштирувчиси кўшилгандаги шароитда сезиларли бўлди. Агар, митохондрияларни автооксидланиш шароитида 3, 6 ва 9 дақиқа давомида инкубация қилинганда Чанс бўйича нафас олиш кўрсаткичи 6,4; 35,2 ва 59,3% ларга пасайган бўлса, липидларнинг фаоллаштирувчиси кўшиб инкубация қилинганда – 19,2; 36,3 ва 60,4% ларга пасайди. АДФ/О коэффицентини автооксидланишнинг 3 дақиқасида деярли ўзгармаган бўлса, 6 ва 9 дақиқаларда 27,8 ва 34,7% ларга пасайган бўлса, липидларнинг оксидланиши фаоллаштирувчиси кўшилганда АДФ/О коэффицентини пасайиши 3 дақиқадан оқ бошланди, яъни 13,2% га камайди, кейинчалик

пасайиш кескин тезлашди, яъни 6 ва 9 дақиқада назоратга нисбатан 30,4 ва 60,3% ларга пасайди.

Демак, ажратиб олинган митохондрияларни ишемия шароитида сақлаганда митохондрияларнинг АТФ синтезини пасайтиради ва бу жараён липидларнинг перекисли оксидланишини фаоллаштирувчиси қўшилганда сезиларли даражада тезлашади. Бу олинган натижадан ишемия шароитида эндоген липолитик, протеолитик энзимларнинг фаолликларини тезлашиши ва липидларнинг перекисли оксидланиши жараёнини кучайиши синхрон равишда фаоллашади деган хулосага келиш мумкин. Митохондрияларни липидларнинг оксидланишини фаоллаштирувчиси қўшиб инкубация қилинганда перекисли оксидланиши янада кучайиши натижасида митохондриянинг ички мембранасини бузилиши ва АТФ синтезини пасайишини янада тезлашади.

Адабиётлар рўйхати

1. Cesimano E.M., Knight A.R., Slusser J.G. et al. Mitochondria the hemi of the cell. // *AdvEmergNurs J.* - 2009. - V. 31. - N 1. - P. 54-62.
2. Зоров Д.Б., Исаев Н.К. и др. Митохондрия как многоликий янус. Обзор. // *Биохимия. Москва,* - 2007, - Т. 72, - вып. 10, - С. 1371-1384.
3. Wallace D.C. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. // *Novartis Found Symp.* - 2001. - V. 235. - P. 247-263.
4. Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. // *Pharmacol Rev.* - 2002. - V. 54. - P. 101-127.
5. Di L.F., Canton M., Menabo R., Kaludercic N., Bernardi P. Mitochondria and cardioprotection. // *Heart Fail. Rev.* - 2007. - V. 12. - P. 249-260.
6. Szeto H.H. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. // *Antioxid Redox Signal.* - 2008. - V. 10. - P. 601-619.
7. Schneider W.C., Hogeboom G.N. Cytochemical studies of mammalian tissues the isolation of cell components by differential centrifugation. // *Cancer. Res.* - 1951. - V. 19. - P. 1 – 22.
8. Алматов К.Т., Юсупова У.Р., Абдуллаев Г.Р. ва б. Организмнинг нафас олиши ва энергия хосил қилишини аниқлаш. Тошкент. - 2013. - Б. 103.
9. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzyme in oxidative phosphorylation. 1V. Respiratory chain. // *J. Biol. Chem.,* - 1955. - N 2. - P. 429 – 444.
10. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисная окисление липидов в биологических мембранах, / Москва: Наука. 1972. - С. 214.
11. 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. - N. 1. - P. 265 – 274.

РЕЗЮМЕ

При инкубации митохондрий, выделенных из печени крыс в условиях ишемии при 36,7°C образуется малоновый диальдегид и этот процесс ускоряется в зависимости от продолжительности эксперимента, дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий снижается. При инкубации митохондрий с добавлением активатора перекисного окисления образование

малонового диальдегида резко увеличилось, снижение дыхания и окислительного фосфорилирования заметно ускоряется. Значит, при ишемии в условиях *in vitro*, точно, как *in vivo* ускорение образования свободных радикалов снижает дыхание и синтез АТФ в митохондриях.

Ключевые слова: печень, ишемия, автоокисление, перекисное окисление липидов.

SUMMARY

At incubation of mitochondria, isolated from rat liver in ischemia condition at 36.7°C malonic dialdehyde is formed and this process accelerates depending on the duration of the experiment, respiration and OXPHOS of mitochondria is reduced. At incubation of mitochondria with addition of peroxide oxidation activator, formation of malonic dialdehyde sharply increased, reduction of respiration and OXPHOS notably fastened. So at ischemia *in vitro* conditions, like as *in vivo*, acceleration of free radicals decreases respiration and ATP synthesis in mitochondria.

Key words: liver, mitochondria, ischemia, auto oxidation, lipid peroxidation