

ИШЕМИЯДА ЛИПИДЛАРНИНГ ПЕРЕКИСЛИ ОКСИДЛАНИШИДА МИТОХОНДРИЯНИНГ ИЧКИ МЕМБРАНАСИДАН ЦИТОХРОМ С НИ ЧИҚИШИНИ ГЛАБРАНИН БИЛАН КОРРЕКЦИЯЛАШ

Ахмедова С.Э., Мирзакулов С.О., Алматов К.Т.

Мирзо Улуғбек номидаги Ўзбекистон Миллий университети

Асосий бажарадиган вазифаси ҳосил бўлган энергияни биологик фойдали шакли энергияга айлантириш бўлган митохондрияларни хужайраларнинг «электрстанциялари» деб ҳам атайдилар. Матрикс таркибида Кребс (ёки уч карбон кислоталар) цикли энзимлари жойлашган бўлади. Электронларни ташилиш тизимини ҳосил қилувчи энзимлар ички мембрана билан боғланган. Электронларни ташувчи энзимларнинг ҳар бир гуруҳини нафас олиш ансамбли деб аталади ва субхужайравий даражада элементар функци-онал бирликни ташкил қилади. Масалан, жигар хужайрасининг митохондрияси 1500 га яқин нафас олиш ансамблига эга. Улар тахминан ҳамма митохондриял мембраналарнинг чорак оғирлигини ташкил қилади. Матрикс ўзида юзлаб ҳар хил энзимларни юқори концентрацияли аралашмаларини сақлайди. Шу жумладан пируват ва ёғ кислоталарини оксидланиши ва лимон кислотаси цикли учун керак бўлган энзимларни ўзида тутиб туради. Ундан ташқари, у ерда митохондриянинг ДНК си, специфик рибосомалари, Т-РНК (ташувчи ДНК) ва митохондрия геноми экспрессиясида қатнашувчи ҳар хил энзимлар жойлашган.

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 алмашинувни ва хужайра дифференцировкасини назорат қилади [Зоров Д.Б., Исаев Н.К. и др., 2007]. Кислороднинг фаол шаклини нишони бўлиб митохондриянинг ДНК сини жароҳатлаши ҳисобланади [Allen R.G. and Tresini M., 2000; Турпаев К.Т., 2002] ва унинг жароҳатланиши [Alam T.I., Kanki T. et al., 2003] “митохондрия касалликлари”ни пайдо қилади.

Кейинги йилларда апоптозда митохондрия асосий роль ўйнаши тўғрисида маълумотлар олинди [Фильченков А.А., Абарменко И.В., 2001; Sculachev V.P., Bakeeva L.E. et al., 2004]. Апоптоз ва некрозда цитохром с муҳим роль ўйнаши тўғрисида маълумотлар олингандан кейин унга бўлган қизиқиш янада кучаймоқда [Бодрова М.Э. ва б., 2000; Галитовский В.Е., Гогвадзе В.Г., 2001]. Баъзибир тадқиқодчиларнинг олган маълумотларига биноан апоптозни пайдо қиладиган омиллардан бири митохондриянинг кўпчиб шишиши туфайли ташқи мембрананинг ёрилиши натижасида цитохром с ва бошқа индукторларни ички мембранада чикиши ҳисобланади [Petit P.X. et al., 1996; Vander H.M.G., Chendel N.S. et al., 1997]. Аммо бошқа ишларда [Skulachev V.P., 1998в; Cai J. et al., 1998] цитохром с интакт митохондриялардан ҳам чикиши кўрсатилган. Митохондрияларни жароҳатланиши ички мембранада ажралиб чиққан цитохром с ни митохондрия “пора” (туйнук-тирқиш) ларидан чикишига олиб келади, натижада хужайра ҳалокатга учрайди [Yang et al., 1997; Green, Reed, 1998]. Цитохром с апоптозни бошланишига сигнал беради, бу эса, кўпинча турли касалликларни пайдо бўлишига олиб келади.

Аммо, шу вақтгача ажратиб олинган митохондрияларни ишемия шароитида глабранинни липидларнинг перекисли оксидланишида, митохондрияларнинг структура ва функциясига таъсири ўрганилган эмас.

Тадқиқотнинг мақсади. Жигардан ажратиб олинган митохондрияларни тана ҳарорати (36,7⁰С) шароитида липидларнинг перекисли оксидланишида глабранин билан инкубация қилинганда, ротенонга сезгин НАД.Н-оксидаза ва ротенонни сезмайдиган НАД.Н-оксидазани фаолликларидаги ўзгаришларни аниқлашдан иборат.

Материаллар ва тадқиқот усуллари. Каламуш жигаридан митохондрияларни дифференциал центрифуга усули билан [Schneider W.C., Hogeboom G.N., 1951], айрим

Ўзгартиришлар орқали [Алматов К.Т. ва бошқ, 2013] 0,25 М сахароза, 10 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,4, с 2 мМ ЭДТАдан фойдаланиб ажратиб олинди. Кейин ажратиб олинган митохондрияларни ЭДТА сиз ажратиш муҳитида икки марта ювиб тозаланди. Ажратиб олинган митохондрияларни икки гуруҳга бўлинди: биринчи гуруҳдагилар назорат учун қолдирилди, иккинчи гуруҳдагиларга липидларнинг перекисли оксидланиши активатори қўшилди. Кейин митохондрияларни 15 дақиқа давомида доимий аралаштирилиб турилган ҳолатда 36,7⁰С ҳароратда инкубация қилинди. Инкубациядан олдинги НАД.Н-оксидазаларнинг оксидланишидаги натижалар билан инкубация двомида олинган натижалар бир-бирига қиёслаб таҳлил қилинди.

Липидларнинг перекисли оксидланиши жараёнини аскорбатга боғлиқ тезлиги Ю.А.Владимиров ва А.И.Арчаковларнинг[1972] микроусули билан тиобарбитир кислота орқали аниқланди.

Митохондрия оксидазаларининг фаолликларини ўрганиш учун бир марта музлатиб-эритилган митохондриялардан фойдаландик [Алматов К.Т., 1990]. Митохондрияларни нафас олиш занжирини оксидаза тизимларининг фаолликларига флаваноидлар таъсирини полярографда аниқланди. Маълумки, жигар митохондрияси икки оксидланиш тизимига эга - НАД орқали оксидланувчи субстратлар ва қўшилган НАД.Н ни ташқи эркин оксидланиш йўли; ушбу йўлнинг нафас олиш занжирининг бошланғич қисми В₅-редуктазанинг НАД.Н₂-цитохроми ҳисобланади. Ушбу оксидланиш йўлларида бири (ички йўли) ротенон билан тўхтайди. Ўлчаш муҳити: рН 7,4 га тенг 0,05 – М трис-НСl, 0,005 М гистидин ва 0,66 М сахарозадан ташкил топган. Ротенонни – сезувчан НАД.Н – оксидаза фоллигини 1 л ҳажмдаги ячеёкага 3 мкМ НАД.Н₂. НАД.Н – оксидаза фаоллигини ҳам 2 мкг ротенон иштирокида аниқланди. Умумий НАД.Н – оксидаза фаоллигидан ротенонни сезадиган ва сезмайдиган НАД.Н оксидазаларнинг фаоллигини ҳисоблаб топилди [Алматов К.Т., 1990]. Оксидазаларнинг фаолликларини 25⁰ С да митохондриянинг 1 мг оқили ҳисобига 1 дақиқада сарфланадиган кислород атомини нанограммларида ифодаланди. Реакция ячеёкадаги ўлчаш муҳитига митохондрия қўшиш билан бошланди. Митохондриядаги оқил миқдори Lowry et al. [1951] аниқланди.

Олинган натижалар ва уларнинг таҳлили. Ишемияда митохондриялардаги липидларнинг перекисли оксидланишида малон диальдегидга глабранинни таъсири тўғрисида олинган натижалар 1-жадвалда берилган.

1-жадвал

Ишемияда митохондрияда липидларнинг перекисли оксидланишида малон диальдегидни ҳосил бўлишига глабранинни таъсири (М±м, n = 10-12)

Вакт, дақиқа	Липидларнинг перекисли оксидланиш реакция тезлиги, нМ малон диальдегиди/мг дақиқа оқил.			
	Назорат	%	Глабранин	%
0	0,060±0,01	100	0,060±0,01	100
3	0,075±0,02	124,9	0,067±0,01	111,5
6	0,085±0,04	142,0	0,075±0,02	124,9
9	0,0100±0,06	166,4	0,087±0,06	145,6
15	0,110±0,08**	183,3	0,096±0,08**	160,5

Агар, липидларнинг перекисли оксидланишида митохондрияларни 3, 6, 9 ва 15 дақиқалар давомида инкубация қилинганида малон диальдегиднинг ҳосил бўлиши 24,9; 42,0; 66,4 ва 83,3% ларга кўпайди. Митохондрияларга глабранинни қўшиб ўлчанда эса малон диальдегиднинг миқдори 11,5; 24,9; 45,6 ва 60,5% ларга кўпайди. Демак, ишемия шароитида глабранин митохондрияларда липидларнинг перекисли оксидланиши сезиларли даражада пасайтиради.

Ишемияда глабранинни липидларнинг перекисли оксидланишида ротенонга сезгир ва ротенонни сезмайдиган НАД.Н – оксидазаларнинг фаолликларининг ўзгаришитўғрисида олинган натижалар 2-жадвалда берилган.

Липидларнинг перекисли оксидланишида митохондрияларни 3 ва 6 дақиқалар давомида инкубация қилинганида ротенонни сезувчи НАД.Н-оксидазанинг фаоллиги назоратга нисбатан 26,5 ва 14,8% ларга ошган бўлма, 9 дақиқада, назоратга нисбатан 12,1% га пасайди, 15 дақиқага борганда пасайиш тезлашиб 66,6 % га етди. Ротенонни сезмайдиган НАД.Н-оксидазанинг фаоллиги, тажрибанинг 3, 6, 9 ва 15 дақиқаларида назоратга нисбатан 8,9; 26,8; 42,9 ва 58,7 % ларга кўпайди.

Митохондрияларга глабранинни қўшиб ўлчанганда эса ротенонни сезадиган НАД.Н-оксидазанинг фаоллиги ошиши 3 ва 6 дақиқаларда бирозгина пасайди (назоратга нисбатан 12,5 ва 10,4% га ошди), Тажрибанинг 9 дақиқасига борганда назоратдаги кўрсаткичга тенглашди, 15 дақиқасига борганда (назоратга нисбатан 24,1% га ошди) пасайди. Ротенонни сезмайдиган НАД.Н-оксидазанинг фаоллигини 3 дақиқада ўзгармади, 6 дақиқалан бошлаб оша бошлади ва бу жараён тажрибанинг давом этишига мос холда тезлашди. Агар, тажрибанинг 6 дақиқасида назоратга нисбатан 12,8% ошган бўлса, 9 ва 15 дақиқаларда 22,5 ва 34,9% ларга тезлашди.

Шундай қилиб, ишемия шароитида глабранин митохондрияларда липидларнинг перекисли оксидланиши шароитида ротенонни сезадиган НАД.Н-оксидазанинг

2-жадвал

Ишемияда липидларнинг перекисли оксидланишини ротенонга сезгир ва ротенонни сезмайдиган НАД.Н – оксидазаларнинг фаолликларига таъсирини глабранин билан коррекциялаш ($M \pm m$; $n = 10-12$)

Кўрсат- гичлар	Вакт, дақиқа	Нафасолиштезлиги, нанограмм атом кислород/мин мг оксил			
		Назорат	%	Глабранин	%
Ротенонни	0	51,61±5,12	100	51,61±5,12	100
Сезадиган НАД.Н- Оксидаза	3	65,28±5,08	126,5	59,61±5,55	112,5
	6	59,25±4,52****	114,8	56,98±5,07	110,4
	10	45,36±5,32****	87,9	51,97±4,86	100,7
	20	22,40±3,60****	43,4	39,17±4,56	75,9
Ротенонни сезмайдиган НАД.Н- Оксидаза	0	5,14±0,38	100	5,14±0,38	100
	3	5,60±0,37	108,9	5,16±0,44	100,4
	6	6,52±0,45	126,8	5,80±0,49	112,8
	10	7,34±0,50****	142,9	6,29±0,46	122,5
	20	8,16±0,57****	158,7	6,93±0,52	134,9

фаоллигини инкубациянинг бошларида ошишини ва кейинчалик пасайишини сезиларли даражада секинлаштиради, ротенонни сезмайдиган НАД.Н-оксидазанинг фаоллигини ошишини эса пасайтиради. Демак, глабранинг ишемия шароитида митохондрия мембранасида “монокатлам” сохараларни пайдо бўлишини пасайтиради, мембранани стабиллаштиради ва эндоген литик энзимларнинг фаоллигини пасайтиради.

Демак, глабранинни митохондрияга қўшиб липидларнинг перекисли оксидланишида 36,7⁰С да инкубация қилинганида митохондрияларда ротенонга сезгир НАД.Н-оксидазанинг фаоллиги ва АТФ синтези ошиши, ротенонни сезмайдиган НАД.Н-оксидазанинг фаоллиги пасайиши натижасида цитохром c ни ички мембранадан ажралиб чиқиши секинлашади ва назоратдаги кўрсаткичларга яқинлашади.

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.