

УДК: 612.111.12:576.311.347:577.352.38

АКТИВАЦИЯ КИСЛОРОДА ГЕМОГЛОБИНОМ И ЭЛЕКТРОТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПЬЮ МИТОХОНДРИЙ

И.Б. Заводник¹, д.б.н.; И.К. Дремза, к.б.н.; Е.А. Лапина, к.б.н.;
В.Т. Чецевик; В.А. Аверин, к.б.н.

1 – УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»
Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси

Окислительные процессы, индуцируемые трет-бутилгидропероксидом в эритроцитах человека, изолированных митохондриях, клетках линии HL 60 взаимосвязаны с реакциями освобождения, активации и потребления кислорода. Интенсивность окислительных биохимических реакций контролируется изменениями напряжения кислорода. Взаимодействие гем-содержащих белков с органическим гидропероксидом сопровождается активацией процессов генерации свободных радикалов, истощением глутатиона, повреждением систем переноса (гемоглобин, эритроциты) и утилизации кислорода (цитохромы, митохондрии).

Ключевые слова: гемоглобин, эритроциты, митохондрии, кислород, трет-бутилгидропероксид

Tert-butyl hydroperoxide induced oxidative processes in human red blood cells, isolated mitochondria, HL 60 line cells are interrelated with the reactions of oxygen consumption, activation and release. The oxygen consumption proceeded in parallel with free radical generation, but not to membrane lipid peroxidation. The intensity of the biochemical oxidative processes is controlled by small changes in oxygen pressure. Interaction of haem-containing proteins with tert-butyl hydroperoxide resulted in reactions of oxygen-free radical generation, glutathione depletion, impairment of the system of oxygen transport (haemoglobin) and utilization (mitochondria).

Key words: haemoglobin, erythrocytes, mitochondria, oxygen, tert-butyl hydroperoxide

Введение

Изменение концентрации кислорода в клетке и ее компартментах влияет как на интенсивность метаболических процессов, так и на скорость активации кислорода гемсодержащими белками (гемоглобином крови, цитохромами митохондрий) с образованием активных форм кислорода [1]. В модели окислительного стресса *in vitro*, индуцируемого в суспензии эритроцитов человека, клеток линии HL 60, митохондриях печени крысы органическим трет-бутилгидропероксидом (т-БГП) – аналогом эндогенных гидроперекисей мембранных липидов, мы исследовали клеточные окислительные реакции, протекающие с участием кислорода. В настоящее время предложено несколько схем, описывающих процесс взаимодействия гемсодержащих белков и ферментов с органическими гидроперекисями [5], включая пероксидазный механизм и гомолитическое расщепление гидроперекисей с образованием пероксильного, алкоксильного и метильного радикалов. В то же время, механизмы индуцируемой т-БГП активации кислорода гемсодержащими белками остаются невыясненными.

Цель настоящей работы – выяснить зависимость между окислительными процессами и реакциями освобождения, активации и потребления кислорода в клетках и митохондриях.

Материалы и методы

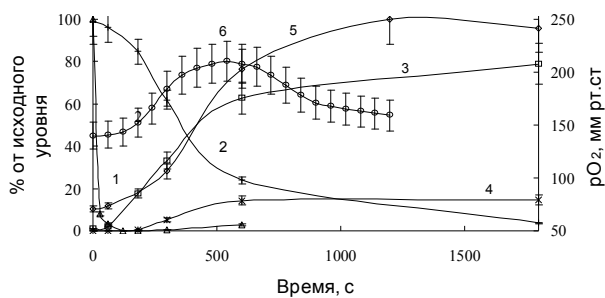
В работе использовали отмытые (трехкратно) от плазмы крови (145 мМ NaCl, 5 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4) эритроциты свежей консервированной крови человека, полученной на станции переливания крови г. Гродно, из которых готовили

5% суспензию. Митохондрии изолировали из ткани печени крысы методом дифференциального центрифугирования. Клетки линии HL 60 выращивали в минимальной среде Игла с солями Хенкса, содержащей 10% телячьей сыворотки в увлажненной атмосфере воздуха с 5% CO₂ при 37°C. Окислительный стресс моделировали внесением в суспензию эритроцитов, клеток линии HL 60 и изолированных митохондрий т-БГП [5]. Напряжение кислорода (pO₂) в суспензии регистрировали с помощью изготовленного в нашей лаборатории электрода Кларка, встроенного в термостатируемую полярографическую ячейку [3].

Содержание кислорода в среде изменяли, продувая над суспензией эритроцитов увлажненный газообразный азот. Концентрацию образовавшихся стабильных продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), определяли спектрофотометрически по методу Stocks J. et Dormandy T. L. [4]. Содержание восстановленного глутатиона определяли по методу Ellman G.L. et al. [2].

Результаты и обсуждение

Процессы окисления эритроцитарного оксигемоглобина (HbO₂) при экспонировании эритроцитов т-БГП и мембранной пероксидации липидов (образование ТБКРС) протекали параллельно после стадии быстрого окисления внутриэритроцитарного глутатиона (рис. 1). При этом наблюдалось двухфазное изменение величины pO₂, которая представляет собой интегральный параметр, характеризующий процессы освобождения кислорода из связи с гемоглобином и его поглощения в кислородзависимых реакциях (рис. 1, кривая 6). Увели-



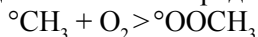
1 – окисление глутатиона; 2 – окисление окси-Нв; 3 – накопление мет-Нв; 4 – накопление феррильной формы Нв; 5 – образование ТБКРС; 6 – изменение pO_2 суспензии

Рисунок 1 – Временные зависимости окислительных процессов индуцируемых органическим т-БГП в эритроцитах

Примечание – Суспензия эритроцитов (Ht 5 %; 1,25 мМ т-БГП; 0,1 М фосфатный буфер; pH 7,4; 37°С). Кривые 1-6

чение pO_2 (освобождение O_2 из связи с гемоглобином) и окисление HbO_2 т-БГП протекали параллельно. Уменьшение pO_2 (поглощение кислорода) связано с использованием кислорода (при участии железа гемоглобина) для генерации активных форм кислорода.

Последовательность индуцируемых т-БГП окислительных процессов может быть представлена следующим образом: 1) окисление GSH; 2) окисление окси-Нв в мет-Нв и феррил-Нв, сопровождающееся освобождением кислорода в раствор; 3) окисление мембранных липидов; 4) поглощение кислорода. Мы предположили, что одной из главных реакций, связанных с поглощением кислорода, является образование метил-пероксильного радикала из радикала метила ($^{\circ}CH_3$), являющегося одним из продуктов разложения т-БГП при его взаимодействии с кислородом [5].



В митохондриях печени, подвергнутых воздействию т-БГП, мы наблюдали накопление продуктов пероксидации мембранных липидов, ингибирование активности компонентов дыхательной цепи (рис. 2), выраженное истощение митохондриального глутатиона (рис. 3), сопровождающееся накоплением смешанных дисульфидов глутатиона с митохондриальными белками (данные не представлены). Можно предположить, что ингибирование ферментных систем дыхательной цепи связано с окислением функционально значимых сульфгидрильных групп белков, нарушением структуры мембраны в результате перекисного окисления липидов и нарушением прооксидантно-антиоксидантного баланса митохондрий. Введение в суспензию митохондрий антиоксиданта мелатонина в эквимольных, по отношению к окислителю, концентрациях препятствует развитию окислительных повреждений митохондрий, что подтверждает сделанное ранее предположение о возможности использования мелатонина в качестве митохондриотропного протектора.

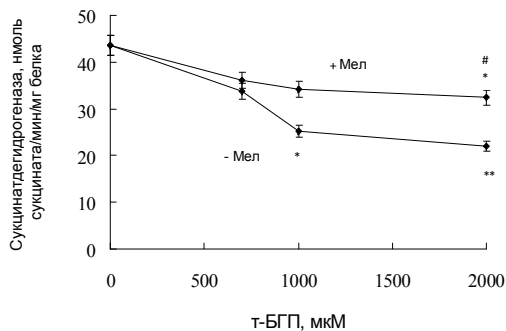


Рисунок 2 – Ингибирование сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени крысы при окислительном воздействии трет-бутилгидропероксида. Защитный эффект мелатонина (700 мкМ)

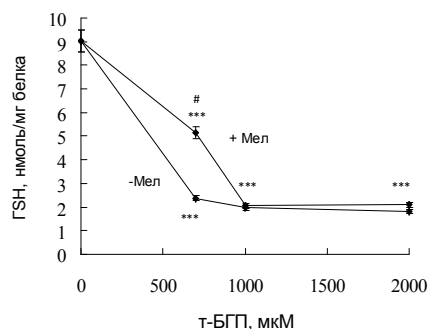


Рисунок 3 – Окисление внутримитохондриального глутатиона при окислительном воздействии трет-бутилгидропероксида. Защитный эффект мелатонина (700 мкМ)

Инкубация клеток линии HL60 с трет-бутилгидропероксидом сопровождалась генерацией в клетках свободных радикалов (рис. 4), которое мы регистрировали по интенсивности флуоресценции дихлорофлуоресцеина при предварительной нагрузке клеток дихлорофлуоресцеин-диацетатом. Энергия активации, рассчитанная нами из графика Аррениуса, равна $54,1 \pm 7,4$ кДж/моль. Очевидно, что генерация свободных радикалов происходит при взаимодействии окислителя (т-БГП) с гемосодержащими белками электронтранспортной цепи митохондрий (цитохромами). Восстановление гидропероксида цитохромами можно рассматривать как реакцию активации молекулы кислорода, катализируемую этими ферментами. Оцененная нами энергия активации реакции восстановления трет-бутилгидропероксида гемоглобином была значи-

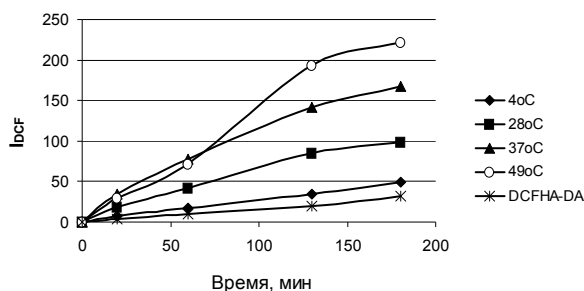


Рисунок 4 – Кинетические кривые генерации свободных радикалов в клетках линии HL60 (1 млн клеток/мл) при экспонировании клеток трет-бутилгидропероксида (100 мкМ) при различных температурах

тельно выше ($124,3 \pm 15,6$ кДж/моль), что свидетельствует о более высоком энергетическом барьере активации кислорода гемоглобином, по сравнению с цитохромами.

Заключение

Взаимодействие оксигемоглобина эритроцитов, компонентов электрон-транспортной цепи митохондрий с органической гидроперекисью сопровождается активацией реакций генерации свободных радикалов, истощением GSH, повреждением гемоглобина и мембранных липидов, компонентов переноса электронов, т.е. ключевых систем переноса и утилизации кислорода в организме. Мембранное окисление липидов – кислородзависимый процесс, а реакции окисления оксигемоглобина и глутатиона не зависят от концентрации O_2 .

Очевидно, что равновесное (обратимое), с изменением спинового состояния, и неравновесное, с изменением валентности иона железа гема при взаимодействии кислорода с гем-содержащими белками (гемоглобином эритроцитов, цитохромами и цитохромоксидазой митохондрий) представляет один из важнейших биохимических процес-

сов, определяющих физиологическое состояние организма. Эффективность окислительных реакций в клетке определяется во многом ее физиологическим состоянием, метаболической активностью, уровнем антиоксидантной защиты, напряжением кислорода. Высокая энергия активации указанных реакций предохраняет клетку от чрезмерного окислительного стресса.

Литература

1. Герасимов Ф.М., Деленян Н.В., Шаов М.Т. - Формирование системы противокислородной защиты организма / Под ред. Е.А. Коваленко: М. Медицина, 1998. - 187 с.
2. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem. Pharmacol.* - 1961. - Vol. 7. - P. 88-95.
3. Imai K., Morimoto H, Kotani M, Watari H, Hirata W. Studies on the function of abnormal hemoglobins. I. An improved method for automatic measurement of the oxygen equilibrium curve of hemoglobin // *Biochim et biophys. Acta.* - 1970. - Vol. 200, № 2. - P. 189-196.
4. Stocks J., Dormandy T.L. The autooxidation of human red cells lipids induced by hydrogen peroxide // *Br. J. Haematol.* - 1971. - Vol. 20, № 1. - P. 95-111.
5. Van der Zee J., Barr D.P., Mason R.P.J. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and *tert*-butyl hydroperoxide // *Free Radic. Biol. Med.* - 1996. - Vol. 20, № 2. - P. 199-206.

Поступила 08.04.09