

УДК 616-005. 1-001. 36-085. 355:577. 152. 191]-036. 8-07: 616. 36-018. 1:576. 314]-008. 9

Изменения состава мембранных фосфолипидов в патогенезе нарушений функций митохондрий головного мозга при геморрагическом шоке у кошек

Лескова Г.Ф.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Балтийская ул., 8. Тел./факс (495) 151-17-56. E-mail: NIOP@mail.ru

В экспериментах на кошках было установлено, что изменения состава фосфолипидов митохондриальных мембран можно отнести к основным патогенетическим факторам нарушений функций митохондрий головного мозга при геморрагическом шоке (ГШ). В митохондриях продолговатого мозга резкое уменьшение содержания мембранного фосфатидилхолина представляет один из основных механизмов снижения их энергообразующей функции, а также усиления апоптоза. Ключевой механизм апоптоза — агрегация митохондрий — в продолговатом мозге при ГШ связан с избыточной концентрацией мембранной фосфатидной кислоты. В митохондриях лобного отдела головного мозга падение концентрации мембранного фосфатидилэтаноламина является значимым механизмом нарушения энергообразования при ГШ. Снижение содержания мембранного фосфатидилинозитола можно рассматривать в качестве пути усиления апоптоза. Увеличение уровня мембранного лизофосфатидилхолина является общим механизмом нарушения функций митохондрий в изученных отделах головного мозга. Способствуя образованию специальных белковых каналов, этот фосфолипид стимулирует захват митохондриями Ca^{2+} . Лизофосфатидилхолин участвует в механизмах усиления образования активных форм кислорода, а также в активизации апоптоза.

Ключевые слова: фосфолипиды, мембраны митохондрий, головной мозг, механизмы апоптоза, геморрагический шок

Введение

Митохондрии функционируют в клетках относительно автономно. Наряду с ролью в образовании энергии известна их значимость в функционировании сигнальных путей широкого ряда клеточных процессов, включая Ca^{2+} -сигнализацию, накопление Ca^{2+} , синтез фосфолипидов и их перенос как между своими мембранами, так и в другие органеллы, а также апоптоз [2, 22]. Активность многих белков, контролирующих сигнальные пути клетки, опосредуется липидными мессенжерами, образованными на поверхности митохондрий. С учетом ключевой роли энергетического дефицита в развитии необратимости шоковых состояний, выявление механизмов нарушения функций митохондрий во время геморрагического шока (ГШ) следует рассматривать в качестве перспективного направления при изучении его патогенеза.

В наших предыдущих исследованиях выявлена ключевая роль дисрегуляции обмена фосфолипидов плазматических мембран в возникновении клеточных повреждений при геморрагическом шоке [3, 4]. Целью настоящей работы явилось изучение в условиях геморрагического шока роли мембранных фосфолипидов в патофизиологических механизмах нарушений функций митохондрий разных отделов головного мозга.

Материалы и методы

Опыты выполнены на 36 кошках массой $3,0 \pm 0,5$ кг, находящихся под наркозом (в/бр. введение нембутала в дозе 40 мг/кг). ГШ воспроизводили по методу Уиггерса—Файна. Для предупреждения свертываемости крови в катетерах животным вводили гепарин в дозе 2000 ЕД/кг. Через 30 мин после введения гепарина выпускали кровь

в резервуар, снижая давление до 40 мм рт.ст. в течение 30 мин и поддерживая его на этом уровне в течение 1 ч. Через 1,5 ч от начала кровопотери животных усыпляли нембуталом в дозе 90 мг/кг. Контролем к опытным группам служили интактные животные, которым вводили гепарин в указанной выше дозе. Митохондриальные мембраны продолговатого мозга и лобного отдела головного мозга выделяли по методу [14] из митохондрий, приготовленных по методу [15] в среде, содержащей 0,32 М сахарозу, 10 мМ трис-НСL (рН 7,4) и 1 мМ ЭДТА [8]. Общие липиды из выделенных мембран экстрагировали по Фолчу. Фосфолипиды разделяли на фракции с помощью тонкослойной хроматографии [11]. Хроматограммы денситометрировали на «Chromoscan-201» фирмы «Joues-Loebl» (Великобритания). Обсчет денситограмм проводили на полуавтоматическом анализаторе изображений «Leitz A.S.M.» Данные обрабатывали методом вариационной статистики по Стьюденту.

Результаты и обсуждение

Отличительной чертой последствий ГШ было прогрессивное исчезновение фосфатидилхолина из мембран митохондрий продолговатого мозга: его уровень по сравнению с контрольным оказался сниженным в 2,2 раза ($p < 0,05$ — 0,01) (рис. 1). Кроме того, в этих мембранах в значительном количестве накапливались лизоформы фосфолипидов. Во внешних и внутренних мембранах митохондрий продолговатого мозга уровень лизофосфатидилхолина увеличился в 5,2 и 3,0 раза соответственно ($p < 0,05$), а концентрация лизофосфатидилсерина — в 4 и 2 раза соответственно ($p < 0,05$ — 0,01). Во внутренних мембранах митохондрий наблюдали повышение уровня лизофосфатидилэтаноламина: он превышал контрольный

показатель в 2,2 раза ($p < 0,05$), что сочеталось с увеличением содержания фосфатидной кислоты в 2,8 раза ($p < 0,02$).

Таким образом, среди основных причин повреждения мембран митохондрий продолговатого мозга при ГШ следует рассматривать резкое падение содержания фосфатидилхолина. Фосфатидилхолин связан с комплексом I дыхательной цепи митохондрий менее прочно, чем кардиолипин, но он также необходим для поддержания NADH-убихинон-оксидоредуктазы в активном состоянии [16]. Его истощение вносит вклад в необратимую деактивацию этого фермента. Считают, что фосфатидилхолин необходим для солубилизации гидрофобного убихинона.

Поскольку митохондриальные мембраны мозга обогащены фосфатидилхолином, содержащим докозагексаеновую кислоту, являющуюся основной мишенью Ca^{2+} -независимой фосфолипазы $A_2\beta$ [5], гиперактивация этого фермента во время ГШ имеет, по-видимому, решающее значение при повреждении митохондриальных мембран продолговатого мозга.

Уменьшение концентрации фосфатидилхолина в мембранах митохондрий продолговатого мозга при ГШ может

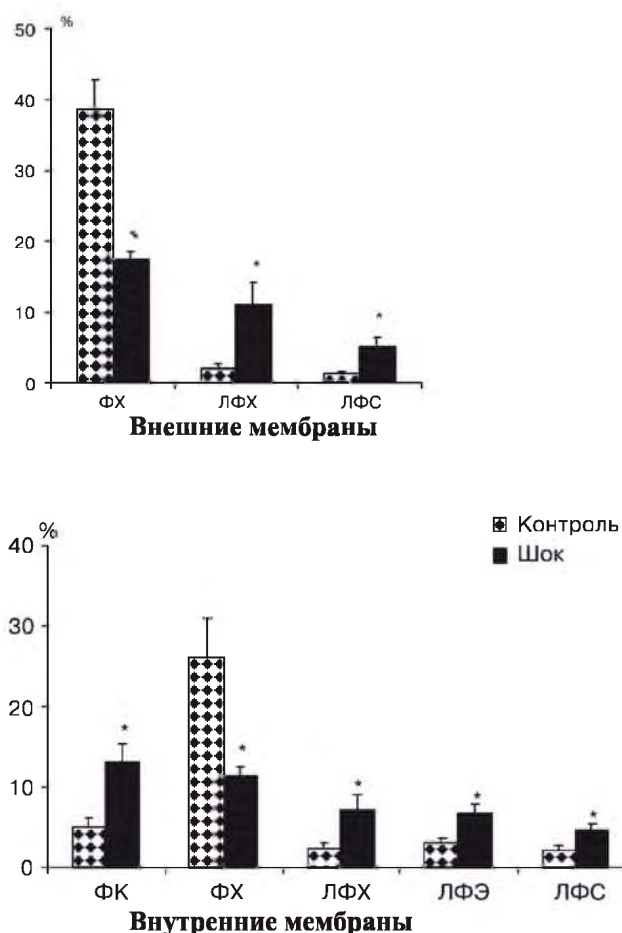


Рис. 1. Изменение фосфолипидного состава (%) мембран митохондрий продолговатого мозга при геморрагическом шоке ($M \pm m$; $n = 4-5$);

здесь и на рис. 2: ФХ — фосфатидилхолин; ФК — фосфатидная кислота; ЛФЭ — лизофосфатидилэтаноламин; ЛФС — лизофосфатидилсерин; $p < 0,05$ по сравнению с контрольными показателями; n — количество животных.

свидетельствовать также о гиперэкспрессии митохондриальной фосфолипазы D, контролирующей сигнальный путь слияния митохондрий [13]. Известно, что слияние митохондрий с последующим их делением — ключевой процесс поддержания гомеостаза в нормальных клетках, позволяющий митохондриям с одной стороны, изменять морфологию с целью увеличения эффективности энергообразования, а с другой, — выявлять поврежденные митохондрии, которые в дальнейшем подвергаются аутофагии [13]. Кроме того, слияние митохондрий с их последующим делением способствует переносу АТФ и Ca^{2+} в те субклеточные отделы, где они наиболее необходимы. Преобладание слияния митохондрий над делением приводит к их удлинению, в то время как следствием преобладания деления митохондрий над слиянием является их фрагментация [9]. Эти морфологические изменения митохондрий связаны с патологическими состояниями, включая апоптоз клеток и нейродегенеративные заболевания. Процесс слияния митохондрий опосредуется GTP-азами их внешних и внутренних мембран, контролирующими митохондриальное слияние, — белками Mitofusin (Mfn) и Opa 1, соответственно, — и медиатором слияния Dinamin-related protein 1 (Dnp 1). Активация фосфолипазы D противодействует фрагментации митохондрий, выполняя роль регулятора запрограммированной клеточной гибели. Гиперэкспрессия этого фермента приводит к агрегации митохондрий — одному из показателей апоптоза.

Увеличение уровня фосфатидной кислоты во внутренних мембранах митохондрий может являться следствием увеличенного распада фосфатидилхолина, сочетающегося со снижением дальнейшего превращения фосфатидной кислоты в диглицериды. Фосфатидная кислота способствует слиянию митохондрий [22]. Она служит для закрепления в мембране эффекторов — фузогенных белков, белков-переносчиков и липидных модификаторов. В некоторых случаях фосфатидная кислота модифицирует их. Увеличенный уровень образования мембранной фосфатидной кислоты приводит к агрегации митохондрий. Вместе с тем, фосфатидная кислота способствует встраиванию в митохондриальные мембраны цитоплазматической фермента, катализирующего ее переход в диглицериды (фосфатидат-фосфатазы). Переход фосфатидной кислоты в диглицериды устраняет ее функцию усилителя слияния митохондрий. Таким образом, при ГШ механизм контроля фосфатидной кислотой слияния митохондрий нарушается, что можно рассматривать среди причин агрегации митохондрий.

Накопление лизоформ фосфолипидов (лизофосфатидилхолина, лизофосфатидилэтанолamina и лизофосфатидилсерина) в мембранах митохондрий продолговатого мозга свидетельствует об гиперактивации фосфолипаз, а также о недостаточной скорости рециклирования и снижении активности лизофосфолипаз. Лизофосфатидилхолин напрямую способствует образованию мембранных пор, которые повторяют некоторые свойства специальных белковых каналов, стимулируя захват Ca^{2+} [21]. Этот фосфолипид быстро накапливается в митохондриях во время апоптоза, стимулируя разрушающее действие на мембраны белка Bid, контролирующего клеточную смерть на уровне митохондриальных мембран [10]. Следует также отметить значимость накопления лизофосфатидилхолина в митохондриях продолговатого мозга для

усиления образования активных форм кислорода, поскольку этот механизм встречается преимущественно в митохондриях и связан, главным образом, с активацией митогенактивируемой протеинкиназы ERK 1/2 [20].

Характерной особенностью вызванных ГШ изменений во внешних мембранах митохондрий лобных долей больших полушарий головного мозга является снижение содержания фосфатидилинозитола на 42,7% ($p < 0,02$) (рис. 2). Истощение мембранного фосфатидилинозитола может быть связано с активацией фосфатидилинозитол-4-киназы — лимитирующего фермента образования фосфорилированных форм этого фосфолипида. В нервных клетках фосфатидилинозитол-4-киназа 92 находится в наружной мембране митохондрий и контролирует преимущественно митохондриальное слияние [12]. Таким образом, снижение содержания фосфатидилинозитола в наружной мембране митохондрий лобного отдела головного мозга указывает на возможный путь их агрегации, инициирующей апоптоз.

В условиях ГШ во внутренних мембранах митохондрий лобного отдела головного мозга снижается концентрация фосфатидилэтаноламина — на 32% ($p < 0,02$). Известно, что уменьшение содержания фосфатидилэтаноламина (на 20—30%) в митохондриях приводит к глубоким изменениям их морфологии и функций [18, 19]. Фосфатидилэтаноламин необходим для поддержания мембранного потенциала, играющего решающую роль в переносе белков во внутреннюю мембрану и через нее. Потеря этого фосфолипида митохондриями вызывает уменьшение их мембранного потенциала, сочетающееся с нарушением трансмембранного переноса белков [7]. Фосфатидилэтаноламин связан с комплексами дыхательной цепи. Он является решающим фактором формирования и/или интеграции суперкомплексов в митохондриальных мембранах [18]. При дефиците мембранного фосфатидилэтаноламина снижается респираторная способность митохондрий, продукция АТФ и активность электронно-транспортной цепи комплексов I и IV, причем нарушается организация этих комплексов, что коррелирует с уменьшением экспрессии белков. Истощение фосфатидилэтаноламина в митохондриях способствует образованию мегакомплексов между цитохромом *bc1* и цитохром С-оксидазой [7]. Активность цитохром С-оксидазы снижается. Считают, что дефицит фосфатидилэтаноламина в митохондриях вызывает разъединение функции электронно-транспортной цепи и образования АТФ, поскольку в клетках с ограниченным содержанием этого фосфолипида снижается потребление кислорода [18]. Ультраструктура митохондрий при дефиците фосфатидилэтаноламина значительно отклоняется от нормы. Недостаточность этого фосфолипида ингибирует их слияние, и они подвергаются фрагментации [17]. Дисфункции митохондрий, вызванные дефицитом фосфатидилэтаноламина, приводят к аутофагии [18].

Исключительно важной представляется роль фосфатидилэтаноламина как предшественника лигандов каннабиноидных рецепторов в головном мозге. Образование этих лигандов увеличивается во время нейродегенерации [11]. В мембранах митохондрий нейронов представлены каннабиноидные СВ1-рецепторы, где они напрямую контролируют клеточное дыхание и энергообразование [6]. Через активацию СВ1-рецепторов каннабиноиды вызывают снижение образования цАМФ, падение активности

протеинкиназы А и комплекса I дыхательной цепи митохондрий. Учитывая изложенное, можно полагать, что при геморрагическом шоке дефицит фосфатидилэтаноламина во внутренних мембранах митохондрий лобного отдела головного мозга связан с использованием этого фосфолипида в качестве предшественника эндоканнабиноидов, что приводит к дисфункциям митохондрий.

В мембранах митохондрий лобного отдела головного мозга при ГШ накапливаются лизоформы фосфолипидов. Повышение уровня лизофосфатидилхолина наблюдали как во внешних (в 3,3 раза; $p < 0,01$), так и во внутренних (в 6,2 раза; $p < 0,02$) мембранах, а лизофосфатидилэтаноламин накапливался во внешних мембранах митохондрий (увеличился по сравнению с контрольным показателем в 1,9 раза; $p < 0,05$). Увеличение мембранного лизофосфатидилхолина указывает на его ключевую роль в патогенезе нарушений функций митохондрий лобного отдела головного мозга при ГШ.

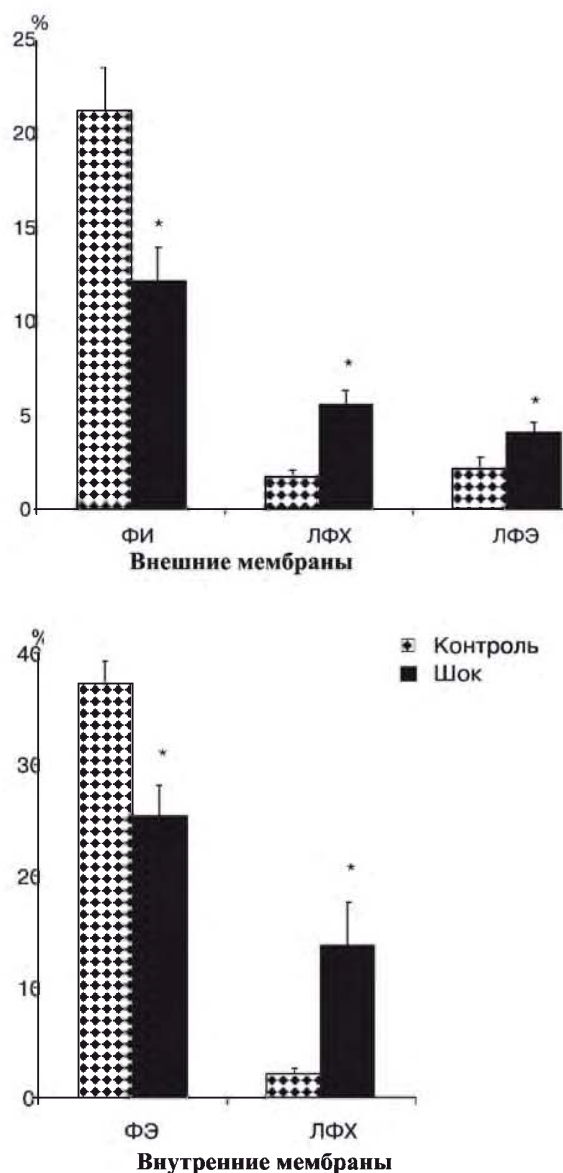


Рис. 2. Изменение фосфолипидного состава (%) мембран митохондрий лобного отдела головного мозга при геморрагическом шоке ($M \pm m$; $n = 4-6$). ФИ — фосфатидилинозитол.

Заключение

Вышеизложенное позволяет считать, что изменения состава фосфолипидов митохондриальных мембран можно отнести к основным патогенетическим факторам нарушений функций митохондрий головного мозга при геморрагическом шоке. Для разных отделов мозга эти изменения строго специфичны. В продолговатом мозге выявлено резкое уменьшение содержания мембранного фосфатидилхолина митохондрий представляющее один из центральных механизмов снижения их энергообразующей функции, а также усиления клеточного апоптоза. Ключевой механизм апоптоза — агрегация митохондрий — в продолговатом мозге связан с избыточной концентрацией мембранной фосфатидной кислоты.

Учитывая роль фосфатидилэтанолamina в механизмах энергообразования, падение содержания этого фосфолипида в мембранах митохондрий лобного отдела головного мозга при геморрагическом шоке можно рассматривать среди основных механизмов снижения их энергообразующей функции. Уменьшение уровня мембранного фосфатидилинозитола митохондрий указывает на присутствие в них зависимого от метаболизма этого фосфолипида пути усиления апоптоза.

Увеличение концентрации мембранного лизофосфатидилхолина является общим механизмом нарушения функций митохондрий в изученных отделах головного мозга. Способствуя образованию специальных белковых каналов, этот фосфолипид стимулирует захват митохондриями Ca^{2+} . Лизофосфатидилхолин участвует в механизмах усиления образования активных форм кислорода, а также активизации апоптоза.

Таким образом, полученные данные указывают на важную роль дисрегуляции обмена мембранных фосфолипидов в нарушении функций митохондрий головного мозга при геморрагическом шоке, а также на перспективность изыскания путей нормализации фосфолипидного обмена для устранения энергетического дефицита при шоковых состояниях.

Список литературы

1. Каргаполов А.В., Карцова С.В. // Вопр. мед. химии. — 1975. — Т. 21 — Вып. 3. — С. 325—327.
2. Новицкий В.В., Гольберг Е.Д., Ало А.Д. и др. Патолофизиология. — Томск: Изд-во ФГБОУ ВПО Национального исследовательского Томского государственного университета, 2001.
3. Лескова Г.Ф., Крыжановский Г.Н. // Бюл.эксп.биол. и мед. — 2011. — Т. 151, №3. — С. 255—258.
4. Лескова Г.Ф., Су Л.Б., Удовиченко В.И. // Пат.физиол. и эксп. тер. — 1990. — №1. — С. 15—17.
5. Beck G., Sugiura Y., Shinzawa K. et al. // J. Neurosci. — 2011. — Vol. 31. — P. 1411—1420.
6. Benard G., Massa F., Puente N. et al. // Nat. Neurosci. — 2012. — Vol. 15. — P. 558—564.
7. Bottinger L., Horvath S.E., Kleinschroth T. et al. // J. Mol. Biol. — 2012. — Vol. 423. — P. 677—686.
8. Diaz-Munoz M., Tapla R. // Biochem. Pharmacol. — 1989. — Vol. 38. — P. 3835—3841.
9. Gao Q., Froman M.A. // BMB Rep. — 2012. — Vol. 45. — P. 7—13.
10. Goonesinghe A., Mundy E.S., Smith M. et al. // Biochem. J. — 2005. — Vol. 387. — Pt. 1. — P. 109—118.
11. Hansen H.S., Lauritzen L., Strand A.M. et al. // J. Neurochem. — 1997. — Vol. 69. — P. 753—761.
12. Heilmeyer L.M.G., Szivak I., Vereb G. et al. // IUBMB Life. — 2003. — Vol. 55. — P. 59—65.
13. Huang H., Cao Q., Peng X. et al. // Dev. Cell. — 2011. — Vol. 20. — P. 376—387.
14. Levy M., Toury R., Andre J. // Biochim. Biophys. Acta. — 1967. — Vol. 135. — P. 599—613.
15. Lovtrup S., Zelander T. // Exp. Cell Research. — 1962. — Vol. 27. — P. 468—473.
16. Sharpley M.S., Shannon R.J., Draghi F., Hirst J. // Biochem. — 2006. — Vol. 45. — P. 241—248.
17. Steenbergen R., Nanowski T.S., Beigneux A. et al. // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280. — P. 40032—40040.
18. Tasseva G., Bai H.D., Davidescu M. et al. // J. Biol. Chem. — 2013. — Vol. 288. — P. 4158—4173.
19. Vance J.E., Tasseva G. // Biochim. Biophys. Acta. — 2013. — Vol. 1831. — P. 543—554.
20. Watanabe N., Zmijewski J.W., Takabe W. et al. // Am. J. Pathol. — 2006. — Vol. 168. — P. 1737—1748.
21. Wilson-Ashworth H.A., Judd A.M., Law R.M. et al. // J. Membr. Biol. — 2004. — Vol. 200. — P. 25—33.
22. Yang C.Y., Frohman M.A. // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 2012. — Vol. 44. — P. 1346—1350.

Поступила 17.07.2014

Composition changes of membranes phospholipids in pathogenesis of brain mitochondrial function during hemorrhagic shock in cats

Leskova G.F.

Institute of General Pathology und Pathophysiology;
Moscow, 125315, Baltijskaja str., 8. Tel./fax (495) 151-17-56

In experiments on cats it has been established, that composition changes of membranes phospholipids can be the basic pathogenic factors of brain mitochondrial dysfunctions under hemorrhagic shock. The decrease of membrane phosphatidylcholine content in mitochondria of medulla oblongata represents one of the basic mechanisms of mitochondrial energy-formation function decrease and intensification of cellular apoptose. The key mechanism of apoptose — the mitochondria aggregation — in medulla oblongata under hemorrhagic shock is connected with superfluous concentration of membrane phosphatidic acid. In mitochondria of cerebral hemispheres frontal lobes a specific falling of membrane phosphatidylethanolamine concentration indicate on a significant way of energy-formation disturbances during hemorrhagic shock. The decrease of membrane phosphatidylinositol content can be considered as a way of apoptose intensification. The increase of membrane lysophosphatidylcholine level is the general mechanism of mitochondrial functions disturbances in the studied departments of a brain. Promoting formation of special protein channels, this phospholipid stimulate a mitochondrial capture of Ca^{2+} . Lysophosphatidylcholine participates in mechanisms of intensive formation of reactive oxygen species, and also in activation of apoptose.

Key words: phospholipides, mitochondrial membranes, brain, mechanisms of apoptose, hemorrhagic shock