

## CONTRIBUȚII LA STUDIUL SEPARĂRII MITOCONDRIILOR, A CONSUMULUI DE OXIGEN ȘI A FOSFORILĂRII OXIDATIVE ÎN ANAFILAXIA LOCALĂ A CREIERULUI LA COBAI

Maria Ardeleanu, dr. Ana Eperjessy, dr. I. Kelemen

Într-o lucrare anterioară am studiat cu scop orientativ, respirația tisulară și metabolismul energetic al fosforului pe țesutul cerebral lezat, la 35 de cobai (1).

Din aceste cercetări reiese că, în cursul proceselor alergice cerebrale au loc modificări profunde histo- și biochimice.

Întrucît în literatura de specialitate probleme ca: fosforilarea oxidativă, consumul de oxigen, leziunile biochimice ale celulelor cerebrale sînt tratate în mod sporadic, în lucrarea de față încercăm să prezentăm aceste probleme pe mitocondrii izolate.

### Material și metodă

Experiențele au fost efectuate pe 6+14 cobai de ambele sexe, cu greutate corporală de 350 grame repartizați în două loturi.

Lotul I. Martor (M) la care nu s-a făcut intervenție.

Lotul II. Animale sensibilizate anterior, cărora li s-a administrat intracerebral 0,2 ml ser de cal (S+Aic).

Sacrificarea lor s-a făcut prin injectare intracardială a 2 ml aer, după un interval de 3, 7, 9, 14, 16, 19, 28 de zile de la intervenție. Creierul, prelevat imediat, a fost spălat cu tampon fosfat pH = 7,38 și păstrat la +4° C.

Paralel au fost efectuate și examinări histopatologice, rezultatele acestora vor fi prezentate într-o altă lucrare.

### Etapele de preparare a mitocondriilor:

I. *Prepararea omogenizatelor* (2). Toate procedeele de separare s-au efectuat la 0°—+4° C. Creierul proaspăt a fost răcit într-o soluție de 0,34 M zaharoză, apoi tăiat în felii subțiri. La 1 g creier s-au adăugat 9 ml soluție, conținînd 0,34 M zaharoză și 0,01 M EDTA, la pH = 7,4 și s-au omogenizat la o turație de 10000, timp de 2 minute, cu omogenizator tip Potter-Elvehjem. Factorul cel mai important este dezintegrarea celulelor.

II. *Separarea nucleilor*. 10 ml de omogenizat a fost stratificat peste 10 ml de sol. 0,44 M zaharoză și centrifugat la 1000 turații (= 1300 g), timp de 2 minute. Sedimentul corespunde fracției nucleare.

III. *Separarea mitocondriilor*. Pe baza metodelor descrise în literatură (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), pentru separarea mitocondriilor cerebrale, am ajuns la varianta descrisă mai jos. Supernatantul obținut de la separarea nucleilor îl centrifugăm la 3720 turații (= 5000 g), timp de 10 minute. Sedimentul apare ca un agregat, format dintr-o bulă roșie, înconjurată cu un strat alb flocoșos. Din sedimentul mitocondrial 1 g este omogenizat în 5 ml soluție de zaharoză 0,34 M timp de 2 minute. Acest omogenat este apoi centrifugat timp de 10 minute cu o turație de 16000 (=21500 g). Procesul de omogenizare a mitocondriilor și îndepărtarea supernatantului prin centrifugare este repetat de 3 ori.

Mitocondriile obținute în ultima fază sînt resuspendate în sol. 0,34 M zaharoză, în proporție de 1 g substanță umedă la 3 ml.

Proteinele mitocondriale le-am determinat prin metoda Lowry, modificată de Miller (14), cu o soluție standard de albumină serică cristalizată, cu fotolorimetru (Spectromom 400) la 580  $\mu\text{m}$ .

Determinarea consumului de oxigen și fosforilarea oxidativă a mitocondriilor le-am efectuat cu metoda manometrică Warburg (4). Principiul metodei constă în determinarea simultană a consumului de oxigen și a fosforului esterificat.

Compoziția mediului de incubare conform datelor din literatură (9, 10, 11, 12, 13) conține:  $\text{MgSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  8  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na} \cdot \text{ADP}$  2  $\text{H}_2\text{O}$  2,5  $\mu\text{M}$  (conținut în fosfat 11,5%). EDTS 2  $\mu\text{M}$ , KCl 0,01  $\mu\text{M}$ , DPN 0,24  $\mu\text{M}$ , kreatina 40  $\mu\text{M}$  p. a., kreatin-kinaza 200 E 31 E/mg în unități Warthington,  $\alpha$ -cetoglutarat 21  $\mu\text{M}$ , citocrom C.1,5.10<sup>-5</sup> M, tampon fosfat pH = 7,38 soluție mitocondrială suspendată în sol. 0,34 M zaharoză cu un conținut în proteine de 8,0 mg/ml.

În cursul experiențelor ATP-ul format din ADP, este instabil din cauza prezenței ATP-azei. Această instabilitate poate fi înlăturată prin inhibarea fermenților prezenți cu florură, sau prin stabilizarea ATP-ului format pe cale enzimatică cu kreatin-kreatinchinază sau glucoză-hexochinază. Pe baza experiențelor efectuate de Lardy și de noi, prezența enzimelor menționate au același efect; valoarea raportului P/O fiind puțin mai scăzută în cazul sistemului hexochinază-glucoză.

Prezența DPN-ului în mediul de fosforilare protejează integritatea structurii mitocondriilor, dar nu are influență asupra valorii  $\text{QO}_2$  și a relației P, O.

Rezultatele noastre au fost exprimate în modul următor:

1. În cazul mitocondriilor am calculat concentrația proteinei mg/g substanță umedă.

2. Valoarea consumului de oxigen  $\text{QO}_2$  a fost calculată în ml/oră pe mg de proteine, — fosforul anorganic a fost evaluat în microatom, mg proteine.

#### *Determinarea consumului de oxigen și a fosforilării oxidative*

Am introdus soluția de incubare în cuva principală, iar în vasul lateral soluția mitocondrială, volumul total fiind 3 ml,  $t = 38^\circ \text{C}$ .

După restabilirea temperaturii, conținutul vasului lateral a fost introdus în cuva principală și în 6 vase se inactivează proteinele cu alcool absolut, după filtrare se determină conținutul în fosfat (proba control). În 7 cuve am determinat consumul de oxigen, timp de 1 oră, după care am inactivat proteinele, iar din filtrat am determinat fosforul.

Fosforul esterificat l-am calculat în comparație cu probele inactivate la timpul 0, exprimat în microatom.

Fosforul anorganic a fost determinat volumetric cu o soluție titrată de  $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$  de 0,005 M în prezența Eriochromului negru T și a urotropinei la fierbere (15).

Cantitatea oxigenului consumat de mitocondrii, în timp de 1 oră, ne dă valoarea  $\text{QO}_2$  exprimată în ml, iar pentru determinarea raportului P, O cantitatea oxigenului am exprimat-o în  $\mu$  atom. Experiențele s-au repetat pe cîte două animale.

#### *Rezultate și discuții*

În tabelul nr. 1 și figura nr. 1 prezentăm rezultatele obținute cu  $\alpha$ -cetoglutarat ca substrat, în prezența ADP-ului pe mitocondriile preparate din creier normal de cobai și cele obținute la diferite intervale după intervenție, din creierul lezat.

În caz normal valoarea respirației tisulare a preparatelor mitocondriale este  $\text{QO}_2 = 102$  oră-mg proteine. După a treia zi de la intervenție cînd și leziunile cerebrale sînt caracterizate prin focare de necroze hemoragice, edem și apariția leziunilor anoxice acute, consumul de oxigen al mitocondriilor

MARIA ARDELEANU ȘI COLAB.: CONTRIBUȚII LA STUDIUL SEPARĂRII MITOCONDRIILOR

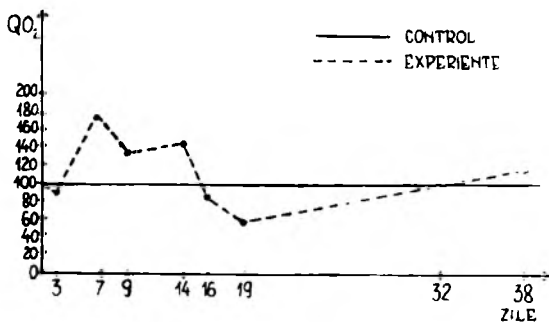


Fig. nr. 1

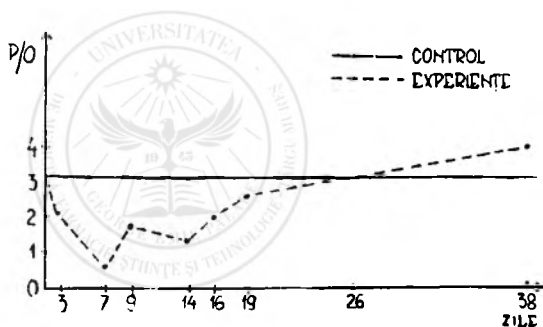


Fig. nr. 2

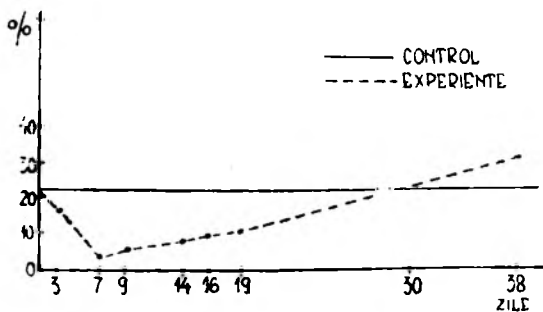


Fig. nr. 3

Tabelul nr. 1

Nr. crt.	Timpul de intervenție	QO <sub>2</sub> $\mu$ l	O <sub>2</sub> $\mu$ atom	P $\mu$ atom	Cantitatea de proteine mg/g subst. umede	P/O
1	Control	112	10	28,97	22,35	2,89
2		121	10,8	33,74	21,65	3,18
3		72,10	6,43	22,50	22,66	3,30
	Media	101,75	9,07	28,40	22,54	3,10
1	3 zile	91,78	8,19	17,6	18,52	2,14
2	7 „	198,80	17,70	10,38	2,35	0,59
3	9 „	139,00	12,41	22,60	3,70	1,80
4	14 „	144,50	12,90	17,16	7,38	1,32
5	16 „	81,20	7,25	13,55	7,94	1,86
6	19 „	63,00	5,38	13,55	9,70	2,51
7	28 „	127,00	11,41	46,77	31,03	4,09

scade cu 10%, dacă valoarea controlului o considerăm egală cu 100%. De la 3 pînă la 14 zile după intervenție, respirația mitocondriilor se intensifică în medie cu 60%, aceasta se explică probabil prin capacitatea deosebită de compensare a țesutului nervos, care solicită toate mijloacele ce stau la dispoziție pentru reechilibrarea dereglărilor produse de leziune. În intervalul de 16—19 zile după intervenție, respirația preparatelor este inhibată cu 30%; după 19 zile tinde spre valoarea normală și chiar o depășește la 28 de zile.

Din tabelul nr. 1 și figura nr. 2 reiese că, valoarea relației P/O a mitocondriilor izolate în caz normal este de  $3,10 = P/O$  (această valoare considerînd-o egală cu 100%).

În intervalul de la 1—20 de zile după intervenție, valoarea relației P/O scade în medie cu 47%, apoi se observă o creștere treptată, ajungînd și chiar depășînd valoarea normală după 25 de zile.

Din tabelul nr. 1 și figura nr. 3 reiese că, în cursul leziunilor alergice și cantitatea de proteine a mitocondriilor izolate scade de la 7 pînă la 20 de zile în medie cu 36%, în diferite perioade de la intervenție, ca după 29 de zile cantitatea de proteine să depășească valoarea normală.

Inhibarea respirației mitocondriale se datorește faptului că enzimele care activează oxigenul molecular, ca enzimele piridinice și citocromoxidaza, limitează transportul de electroni. Este importantă stabilirea pe parcurs a acestor factori.

Creșterea valorii QO<sub>2</sub>, în prezența substratului de  $\alpha$ -cetoglutarat, este probabil un mecanism de reglare, care limitează catabolismul aminoacizilor în ciclul acidului citric, datorită leziunii țesuturilor.

Valoarea crescută a relației P/O confirmă faptul că celulele captează o cantitate mai mare de DPN în scopul oxidării substratului de  $\alpha$ -cetoglutarat.

Unii consideră că oxidarea  $\alpha$ -cetoglutaratului în acid succinic, respectiv oxidarea fumaratului, implică formarea DPNH<sup>+</sup> care prin reoxidare în sistemul fosforilant al DPNH<sup>+</sup> determină creșterea citului de P/O.

Valoarea scăzută a relației P/O apare datorită incapacității țesuturilor de a sintetiza o cantitate optimă de coenzimă care asigură o bună funcționare biologică a celulei vii. Acest proces este confirmat și de faptul că valoarea relației P/O scade paralel cu conținutul în proteine a mitocondriilor izolate.

*Sosit la redacție: 9 ianuarie 1971.*

### Bibliografie

1. EPERJESSY ANA, ARDELEAN MARIA, KELEMEN I.: Studiul metabolismului energetic al țesutului cerebral în traumatismul experimental al creierului. Lucrare prezentată la ședința Academiei, București, 15 februarie 1968;
2. SIDNEY P. și colab.: Methods in Enzymology, Ed. Acad. Press. INC, Publishers New York, 1955;
3. HOGEBOM C. A., SCHNEIDER W. C.: J. Biol. Chem. (1953), 204, 233;
4. EPERJESSY ANA, KISS A.: Studii și Cercetări de Biochim. (1961), 4, 551;
5. GURBAN C., CÎRSTEA E.: Studii și Cercetări de Biochim. (1964), 8, 1, 57;
6. SELARIU C., MIHĂIESCU S.: Stud. și Cercet. de Biochim. (1961), 3, 350;
7. SLENCZKA W.: Biochem. Zschr. (1959), 331, 496;
8. BRODY T. M., BAIN I. A.: J. Biol. Chem. (1952), 195, 655;
9. KADENBACH B.: Biochem. Zschr. (1966), 1, 344,
10. BODE C., KLINGENBERG M.: Biochem. Zschr. (1965), 3, 341,
11. DALLAM R. D., HOWARD: Biochim. Biofiz. Acta (1960), 37, 188;
12. VALLIN T., LÖW L. H.: European Journ. of Biochemistry (1968), 5, 3, 402;
13. J. C. ARCOS. R. S. SOHAL și colab.: Experimental and Molecular Pathology (1968), 8, 1;
14. LOWY O. H., ROSENBROUGH N. I., TARR A.: J. Biol. Chem. (1951), 193, 625;
15. EPERJESSY ANA, KISS A., ARDELEAN MARIA: Contribuții la microdozarea compușilor anorganici și organici ai fosforului. Lucrare prezentată la Sesiunea științifică a Bazei de cercetări Tîrgu Mureș a Academiei R.S.R., 20 iunie 1968.