

М. И. АГАДЖАНОВ

СООТНОШЕНИЕ ОКИСЛЕНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫС, ОТРАВЛЕННЫХ ХЛОРОПРЕНОМ

Многочисленными исследованиями по биохимии хлоропренового отравления было показано, что хлоропреи оказывают токсическое воздействие на организм, вызывает значительные биохимические сдвиги в различных органах и системах. В механизме действия хлоропрена на организм основную роль играют его агрессивные перекиси, которые, будучи липотропными веществами, диффундируют в различные ткани и органы, особенно в нервную ткань, где и индуцируют образование липидных перекисей [6].

На основании общности механизма действия, а также морфологических, физиологических и биохимических изменений в организме автор проводит аналогию между хлоропреновой интоксикацией и действием ионизирующей радиации. В обоих случаях образование перекисей может инициировать цепную реакцию окисления, которая и обуславливает чрезвычайную многогранность воздействия как ионизирующей радиации, так и хлоропренового отравления.

Поэтому мы решили изучить изменения в процессах, имеющих универсальное значение в жизнедеятельности организма, и выполняющих интегрирующую функцию в обмене веществ. Именно к таковым относятся процессы окислительного фосфорилирования — универсальный механизм превращения энергии окисления в легко мобилизуемую и используемую для функции форму.

Экспериментальная часть. Опыты ставили на 59 белых крысах обоего пола, содержащихся на смешанной диете. Часть животных затравляли хлоропреном в затравочных камерах хронически ингаляционным динамическим методом ежедневно при двухчасовой экспозиции, при концентрации хлоропрена 2 мг/л. Срок отравления 30, 60 и 90 дней. Другая часть животных служила контролем.

Установлено, что процессы переноса электронов в дыхательной цепи и сопряженные с ними реакции фосфорилирования связаны с митохондриями [11]. Поэтому в качестве препарата с более высокой окислительной и фосфорилирующей активностью мы использовали митохондрии.

Митохондрии мозга крысы выделяли по методу Восс и др. [18]. Изучение дыхания и окислительного фосфорилирования проводили полярографическим методом. Митохондрии (Мх) инкубировали в среде (НС), предложенной Бацила и др. [10]. Количество митохондрий в каждой пробе соответствовало 1,1—1,3 мл белка, определенного по Лоури [14].

Для изучения митохондрий мозга при различных функциональных нагрузках мы использовали такие вполне физиологические воздействия, как субстраты дыхания (глутамат, сукцинат), акцепторы фосфата (АДФ) и ингибиторы дыхания (2,4-динитрофенол).

В. П. Скулачев изучал соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях печени голубей в различные времена года [9]. Автор показал изменчивость коэффициента Р/О в зависимости от сезонного фактора. Чтобы исключить роль сезонного фактора, а также возможные колебания в условиях опыта, мы исследовали митохондрии мозга как нормальных, так и отравленных животных в один и тот же день.

С митохондриями, выделенными из мозга каждой как контрольной, так и отравленной хлоропрепом крысы, ставили следующие пробы:

- I. ИС+Мх — эндогенное дыхание,
- II. ИС+10мМ глюкозы+Мх,
- III. ИС+10 мМ глутамата+Мх, на 120 сек. +250 μ М АДФ, после замедлений дыхания +125 μ М ДНФ,
- IV. ИС+10 мМ глутамата+Мх, на 120 сек. +250 μ М АДФ, после замедления дыхания +125 μ М ДНФ,
- V. ИС+5 мМ глутамата+5 мМ сукцината+Мх, на 120 сек. +250 μ М АДФ, после замедления дыхания +125 μ М ДНФ,
- VI. ИС+5 мМ глутамата+5 мМ сукцината+Мх, на 120 сек. +250 μ М АДФ, после замедления дыхания +125 μ М ДНФ.

Состояние митохондрий характеризовалось скоростью дыхания в μ АО/сек/литр, величиной ДК (дыхательный контроль) и Р/О.

Результаты исследований. Как показывают полученные данные, скорость поглощения кислорода митохондриями мозга различна в зависимости от субстрата окисления.

У нормальных животных эндогенное дыхание протекает со скоростью 0,553 μ АО/сек (рис. 1а), с глюкозой скорость дыхания 0,559 μ АО/сек (рис. 2а). Приблизительно на том же уровне дышат митохондрии и в

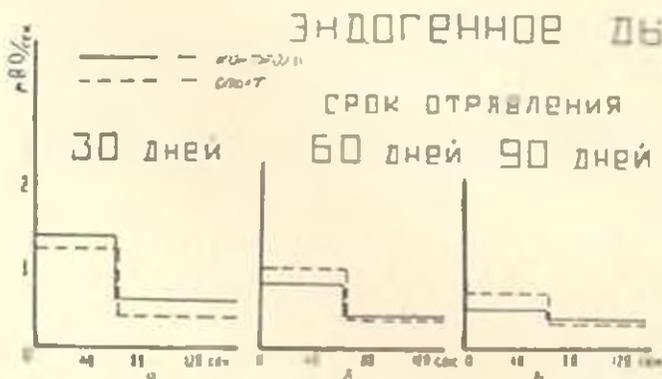


Рис. 1. Скорость дыхания митохондрий мозга как контрольных, так и отравленных в течение различных сроков крыс в μ АО/сек. Кривые (рис. 1—7) выведены на основании средних данных, полученных от 10 контрольных и 10 отравленных крыс.

при отсутствии глутамата, однако добавление АДФ усиливает дыхание до 1,211 μ АО/сек. (рис. 3а). С сукцинатом поглощение кислорода идет со значительно большей скоростью и составляет 1,211 μ АО/сек. без акцеп-

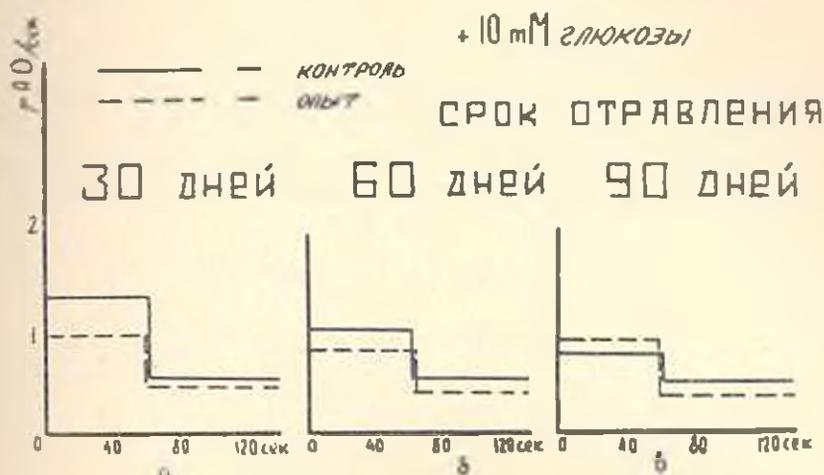


Рис. 2. Скорость дыхания митохондрий мозга с 10 mM глюкозы.

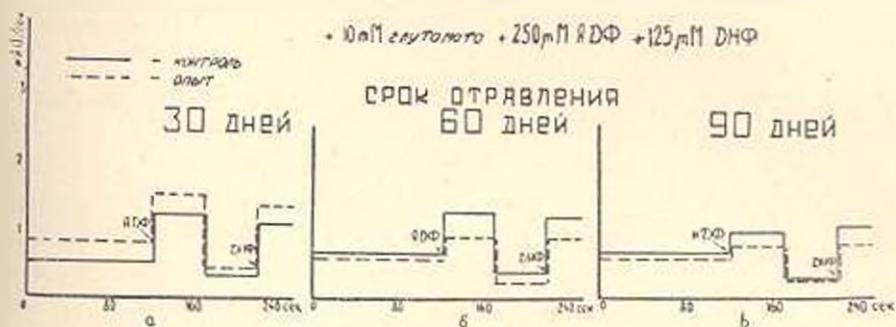


Рис. 3. Скорость дыхания митохондрий мозга с 10 mM глутамата с последующим добавлением 250 μ M АДФ и 125 μ M ДНФ.

тора фосфата. Добавка АДФ усиливает дыхание до 2,013 μ АО/сек (рис. 4а). При этом с глутаматом были получены ДК=3,7 и Р/О=2,4, а с сукцинатом ДК=2,9 и Р/О=2,5 (табл. 1). Эти данные совпадают с данными других авторов [10, 17].

Как видно из рис. 1, скорость дыхания митохондрий после 30-дневной затравки снижается на 29,9% (1а), однако через 60 дней она повышается до нормальной (1б) и несколько снижается после 90 дней затравки (1в).

После однемесячного отравления скорость дыхания с глюкозой (рис. 2) снижается на 22,6% (2а), после двухмесячной и трехмесячной затравки (2б, в) практически не меняется (соответственно ниже на 22,8 и 21,7%).

Данные, полученные с глутаматом, приведены на рис. 3. Как видно из рисунка, после однемесячной затравки (3а) скорость дыхания без акцептора увеличивается на 55,3%, а в присутствии 250 μ M АДФ—на

25,6, однако после двухмесячной затравки дыхание уже подавляется на 9,8%, а с АДФ—на 25,5 (36). После трехмесячной затравки скорость дыхания остается приблизительно на том же уровне (без акцентора снижена на 12,8%, а с АДФ—на 19,2) (3в).

Несколько иная картина получается с сукцинатом (рис. 4). Уже после 30-дневной затравки дыхание подавляется на 12,3%, а в присутствии АДФ на 8,3%. После 60 дней скорость дыхания почти не изменяется (снижается на 10,9%), однако при добавлении АДФ замедление дыхания усиливается (снижается на 26,7%). После 90 дней отравления все указанные изменения приходят к норме.



Рис. 4. Скорость дыхания митохондрий мозга с 10 mM сукцината с последующим добавлением 250 μM АДФ и 125 μM ДНФ.

Дыхание митохондрий мозга отравленных животных в присутствии двух субстратов (глутамат+сукцинат) и повышающихся концентраций АДФ (250 μM и 500 μM) представлено на рис. 5—7. Из рисунков видно, что после одномесечного отравления (рис. 5) наблюдается ускорение дыхания митохондрий, после двухмесячного отравления (рис. 6) дыхание замедляется, а после трехмесячного (рис. 7) скорость дыхания приближается к нормальной.



Рис. 5. Скорость дыхания митохондрий мозга после 30-дневной затравки с 5 mM глутамата и 5 mM сукцината с добавлением повышающихся концентраций АДФ и 125 μM ДНФ.

Особый интерес представляют данные о реакции дыхания на добавку повышающихся концентраций АДФ, независимо от исходного уровня дыхания.

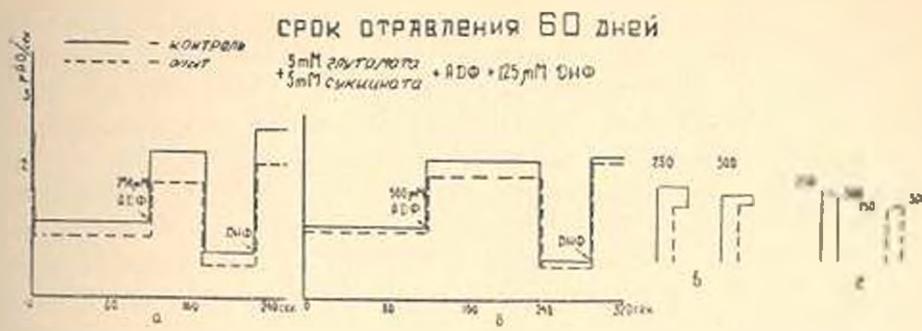


Рис. 6. Скорость дыхания митохондрии мозга после 60-дневной затравки в тех же условиях, как и на рис. 5.

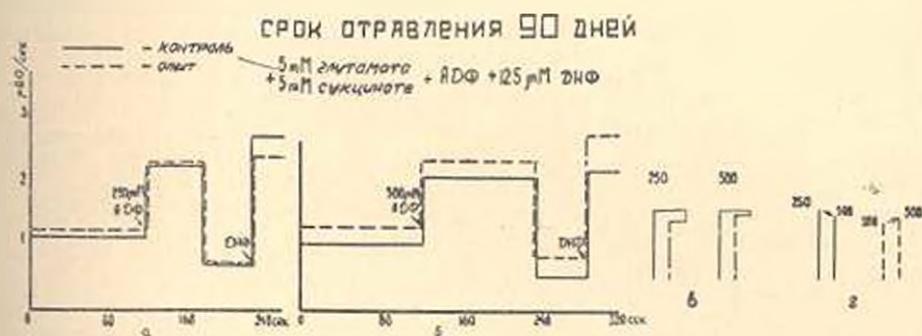


Рис. 7. Скорость дыхания митохондрий мозга после 90-дневной затравки в тех же условиях, как и на рис. 5.

Добавление 250 μ М АДФ вызывает в митохондриях затравленных в течение месяца животных стимуляцию дыхания на 14,8% меньшую, чем у нормальных животных, что видно из рис. 6в, однако в присутствии 500 μ М АДФ картина меняется. Дыхание митохондрий отравленных животных усиливается на 25,6% больше, чем у нормальных. На рис. 6г показано, что если в митохондриях нормальных животных 500 μ М АДФ вызывают стимуляцию дыхания на 9,7% меньшую, чем 250 μ М, то в митохондриях животных после одномесячного отравления, наоборот, большая концентрация АДФ стимулирует дыхание значительно сильнее (на 31,5% больше).

Данные о дыхании митохондрий животных после двухмесячной затравки представлены на рис. 6. Как видно, добавление 250 μ М АДФ у затравленных животных вызывает стимуляцию дыхания уже на 24,3% меньшую, чем у нормальных (6в), а стимуляция от добавки 500 μ М уже не превышает, а, наоборот, на 18,3% ниже, чем у нормальных животных, с той же концентрацией АДФ.

Как и в предыдущей серии опытов, добавление 500 μ М АДФ к митохондриям нормальных животных вызывает стимуляцию дыхания на 9,9% меньшую, чем 250 μ М АДФ. Однако в случае отравленных животных 500 μ М АДФ стимулирует дыхание почти в одинаковой степени с 250 μ М АДФ.

Данные о дыхании митохондрий мозга крыс с двумя субстратами после трехмесячной затравки приведены на рис. 7. Как видно из рис. 7в, дыхание митохондрий отравленных животных стимулируется от добавки 250 μM АДФ на 21,4% слабее, чем у контрольных, однако 500 μM АДФ оказывают на митохондрию подопытных животных такой же эффект, что и на нормальных. В нормальных митохондриях от добавления 500 μM АДФ дыхание стимулируется на 13,4% меньше, чем от 250 μM АДФ, а в митохондриях отравленных животных большая концентрация акцептора фосфата все же вызывает усиление дыхания на 15,4% больше, чем его меньшая концентрация (7г).

Незначительные изменения дыхательного контроля и величины Р/О представлены в таблице.

Таблица

Изменение дыхательного контроля (ДК) и коэффициента Р/О после различных сроков затравки

Срок затравки	+10 mM глутамата				+10 mM сукцината				+5 mM глутамата + 5 mM сукцината + 250 μM АДФ				+5 mM глутамата + 5 mM сукцината + 500 μM АДФ			
	Р/О		ДК		Р/О		ДК		Р/О		ДК		Р/О		ДК	
	К	О	К	О	К	О	К	О	К	О	К	О	К	О	К	О
30 дней	2,4	2,5	3,7	3,7	2,5	2,5	2,9	2,5	2,4	2,4	3,8	3,0	2,4	2,1	4,7	4,6
60 дней	2,9	3,1	3,6	3,1	2,7	2,9	3,3	3,3	2,7	2,7	3,2	3,2	2,6	2,6	3,5	3,4
90 дней	2,6	2,6	3,7	2,9	2,3	2,3	3,2	2,9	2,5	2,6	3,2	3,2	2,9	2,8	3,8	2,8

Добавление 2,4-дигрофенола почти во всех случаях как у контрольных, так и у отравленных животных вызывает стимуляцию дыхания, аналогичную реакции митохондрий на АДФ.

Обсуждение. Как известно, глюкоза является основным субстратом для мозговой деятельности и в манометрических исследованиях значительно ускоряет дыхание препаратов мозговой ткани. Однако полярографически нам не удалось получить стимуляцию дыхания митохондрий мозга в присутствии глюкозы. Аналогичные данные приводят Сактор и др. [16]. По мнению Ди-Пиетро и Веннхоузе [13], выделенные из мозга митохондрии, обладают слабой активностью в отношении окисления глюкозы. Эта активность может быть значительно увеличена добавлением надосадочной фракции гомогената.

После одномесячной затравки как эндогенное дыхание, так и дыхание с глюкозой снижаются соответственно на 29,9 и 22,6%. В дальнейшем эндогенное дыхание несколько нормализуется, а дыхание с глюкозой остается низким. Такое подавление скорости дыхания говорит о повышении сопряженности процессов окисления и фосфорилирования. Однако это повышение сопряженности является начальным проявлением разобщения, результатом блокирования пути использования энер-

гии на эндогенные, внутримитохондриальные нужды и увеличения ее выхода в виде АТФ. При дальнейшем усилении действия ингибитора сопряженность окислительного фосфорилирования еще более снижается. На этой стадии блокируется уже перенос энергии на АТФ и поток электронов устремляется по свободному пути, скорость дыхания поэтому повышается. В более выраженных случаях действия ингибитора скорость дыхания подавляется за счет нарушения переноса электронов по всем путям дыхательной цепи, включая и свободный путь.

Одинаково низкий уровень дыхания с глюкозой в течение всех сроков затравки говорит об особой стабильности, малой изменчивости этого показателя.

Скорость дыхания с глутаматом (4 состояние) мало отличается от эндогенного дыхания, однако в присутствии акцентора фосфата (3 состояние) дыхание усиливается в 2,3 раза. С сукцинатом дыхание в состоянии 4 идет значительно интенсивнее, чем с глутаматом в тех же условиях, и по скорости равно дыханию с глутаматом в состоянии 3. При переходе митохондрий с сукцинатом в состояние 3 дыхание усиливается в 1,7 раза. Таким образом, с сукцинатом митохондрии должны вести себя по законам 3-го состояния митохондрий, когда в транспорте водорода и электронов участвует большее число субединиц дыхательной цепи, а с глутаматом—по законам 4-го состояния с меньшим числом переносчиков. Согласно данным ряда авторов, ингибиторы дыхания сильнее подавляют дыхание митохондрий в состоянии 3 [3, 12]. Поэтому следовало ожидать, что при таком развитии нарушения аппарата сопряжения сначала будет подавляться дыхание с сукцинатом, как более интенсивно дышащим субстратом, а затем уже с глутаматом. И, действительно, в наших опытах после однемесячной затравки дыхание с сукцинатом подавляется на 12,3%, в то время как с глутаматом, наоборот, усиливается на 55,3%. Справедливость этого подтверждается и положением, что субстрат, окисляющийся более интенсивно, вызывающий большую скорость дыхания, создает большую нагрузку на дыхательную цепь, что быстрее приводит к исчерпанию их функциональных возможностей, подавлению дыхания [1]. Повышение же скорости дыхания с глутаматом есть проявление более мягкого действия разобщителя, перехода электронов на свободный путь окисления.

В пользу наших данных о различной скорости окисления сукцината и глутамата митохондриями под действием разобщителя свидетельствуют и данные Линн и Броун [15]. Было показано, что митохондрии способны аккумулировать сукцинат лучше, чем другие анионы цикла Кребса, и поэтому на перемещение накопленного сукцината требуется больше фосфата, чем на перемещение других органических анионов (глутамат и др.). При создании условий, вызывающих конкуренцию между сукцинатом и фосфатом за входение в митохондрии (добавление разобщающего агента или избытка фосфата), окисление сукцината подавляется. Предполагается, что это подавление является результатом относитель-

ного вытеснения сукцината из митохондрий с помощью фосфата. Таким образом, тот факт, что разобщающий агент подавляет быстрое дыхание с сукцинатом и стимулирует слабое дыхание, наблюдаемое с глутаматом, авторы объясняют различной проницаемостью различных анионных субстратов в митохондрии.

При дальнейшем действии хлоропреновой затравки (два и три месяца), наблюдавшаяся вначале разница сглаживается, дыхание как с одним, так и с другим субстратами подавляется, причем с глутаматом на 12,3%, а с сукцинатом на 10,9. Однако добавление АДФ, т. е. создание большей функциональной нагрузки на дыхательную цепь сильнее проявляет возникающие нарушения, дыхание подавляется соответственно на 25,2 и 26,7%. После трехмесячного отравления эти изменения менее выражены, особенно с сукцинатом, где они приходят к норме.

Интересны данные, полученные с повышающимися концентрациями акцентора фосфата. Как видно из рис. 5г, 6г и 7г, в митохондриях нормальных животных большая концентрация АДФ вызывает во всех случаях одинаковое замедление дыхания. Очевидно, 500 μ М АДФ создают концентрацию, превышающую оптимальную, происходит «торможение субстратом», наступает «парадоксальная фаза». Аналогичный феномен на митохондриях печени был показан А. В. Николаевой [7], Гомазковым и др. [2].

При отравлении животных митохондрии повреждаются, чувствительность понижается, повышается их «порог возбудимости». Поэтому меньшая концентрация АДФ стимулирует дыхание в митохондриях отравленных животных значительно слабее, чем в нормальных митохондриях, причем ослабление дыхания наиболее выражено после 60-дневной затравки (6в). Большая концентрация АДФ с митохондриями животных после месячной затравки значительно сильнее (на 31,5%) стимулирует дыхание, чем 250 μ М АДФ (5в), так как на поврежденные митохондрии 500 μ М АДФ уже не оказывают тормозящего эффекта. После двух- и трехмесячной затравки эта разница в стимуляции дыхания нормальных и отравленных митохондрий различными концентрациями АДФ уменьшается. После трехмесячного отравления, наряду с нормализацией скорости дыхания, возвращается к нормальной и реакция митохондрий на 500 μ М АДФ. Данные о величине Р/О (см. табл.) показывают, что динамика изменений этого показателя соответствует изменениям скорости дыхания после различных сроков затравки животного.

О некотором нарушении сопряженности окислительного фосфорилирования говорит и снижение дыхательного контроля. Однако нормальная реакция изучаемых митохондрий на воздействие 2,4-динитрофенола свидетельствует в пользу сохранности, целостности механизма переключения дыхания с фосфорилирующего пути на свободное дыхание.

Таким образом, при хроническом хлоропреновом отравлении после одномесечной затравки происходит некоторое разобщение процессов окислительного фосфорилирования, которое еще более усиливается после двухмесячной затравки, а после трехмесячной приходит к норме.

Однако это разобщение незначительное, оно показывает направленность изменений в дыхательной цепи. Об этих изменениях возможно судить только по некоторому изменению скорости дыхания, так как величина P/O практически не меняется.

Наши данные не совпадают с данными В. Г. Мхитаряна [5] о значительном подавлении дыхания мозговой кашицы после хлоропренового отравления, а также с данными ряда авторов [4, 8], показавших сильное разобщение окислительного фосфорилирования в мозгу под действием ионизирующей радиации. Эта разница легко объяснима, если учесть, что указанные исследования проводились с помощью монометрического метода Варбурга, при котором ткань попадает в условия, значительно отличающиеся от физиологических. Эти жесткие условия способствуют выявлению имеющегося повреждения и затрудняют процессы восстановления.

Полирографический метод в значительной мере лишен этих недостатков, ткань находится в условиях значительно более близких к физиологическим. Поэтому данные, полученные этим методом, вернее отражают состояние процессов окислительного фосфорилирования в мозгу.

Очевидно окислительное фосфорилирование в мозгу обладает мощными компенсаторными механизмами, реализация которых и обуславливает выживаемость организмов как при значительных дозах облучения, так и при длительном хлоропреновом отравлении.

Кафедра биохимии
Ереванского медицинского института

Поступило 11.VI 1966 г.

Մ. Ի. ԱՂԱԶԱՆՈՎ

ՕՔՍԻԴԱՅՄԱՆ ևՎ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՅՄԱՆ ՓՈԽԱՐԱԲԵՐՈՒՅՑՈՒՆԸ ՔԼՈՐՈԳՐԵՆՈՎ
ԹՈՒՆԱՎՈՐՎԱԾ ԱՌՆՏՆՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ ՄԵՏՈՔՈՆԳՐԻԱՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու լ մ

Տվյալ աշխատության մեջ նպատակ ենք ունենել պոլյարոգրաֆիկ եղանակով պարզել հյուսվածքային շնչառությունը և օքսիդացուցիչ ֆոսֆորիլացումը քլորոպրենոլ թունավորված առնետների ուղեղի միտոքոնդրիաներում: Ճույշ է տված, որ միամսյա քլորոպրենային թունավորումից հետո էնդոգեն շնչառությունը, շնչառությունը գլյուկոզայի և սաթաթթվի ներկայությամբ ճնշվում է, իսկ գլուտամինաթթվի հետ, բեդակատակը, ակտիվանում է:

Նրկամսյա թունավորումից հետո շնչառությունը ճնշվում է բոլոր վերը նշված նյութերի հետ և վերադառնում նորմայի՝ եռամսյա թունավորված առնետների մոտ:

Օքսիդացուցիչ ֆոսֆորիլացումը միամսյա թունավորումից հետո մասնակի փեղհրվում է, որը խորանում է երկամսյա թունավորվածների մոտ, իսկ եռամսյա թունավորումից հետո, ֆոսֆորիլացման պրոցեսը լրիվ վերականգնվում է: Սակայն այդ փոփոխությունները անհշան են արտահայտված, շնչառության