

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

ՇՆՉԱՌՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ՕՔՍԻԴԱՑԻՈՆ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՑՄԱՆ ԻՆՏԵՆՍԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ՈՒՂԵՂԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐՈՒՄ ԼԵՅԻՏԻՆԻ
ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Մեր նախընթաց աշխատություններում ցույց էր տրվել, որ հավի օնտոգենետիկ զարգացման որոշակի շրջանում սաղմի լյարդում տեղի է ունենում ճարպերի կուտակման և լիպոպրոտեինային ֆրակցիայի առաջացման պրոցես [1, 2]: Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ սաղմի լյարդում ճարպերի կուտակումը և լիպոպրոտեինային ֆրակցիայի կազմավորումը զարգացող օրգանիզմի համար միայն սննդառական նշանակություն չունի: Այն կարևոր ֆիզիոլոգիական, բիոքեմիական գործոն է և, մասնավորապես, նշանակություն ունի էներգետիկ փոխանակության կանոնավորման համար: Այդ ֆրակցիայի համապատասխան քանակների ներկայությամբ բջջում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսը ճեղքվում է՝ շնչառությունը խթանվում է, իսկ ֆոսֆատի էսթերիֆիկացումը՝ դանդաղում: Լիպոպրոտեինային ֆրակցիայի բաղադրության վերաբերյալ հետազոտությունները պարզեցին, որ նրա մեջ մտնում են մեծ քանակությամբ ֆոսֆոլիպիդներ, այդ թվում նաև՝ լեցիտին: Գրականության մեջ տվյալներ կան այն մասին, որ տարբեր ֆոսֆոլիպիդների ներկայությամբ բջջում շնչառությունը և դրա հետ կապված ֆոսֆատի փոխանակությունը ենթարկվում են տարբեր փոփոխությունների: Պետրուշկայի և աշխ. [10, 11] տվյալներով՝ լեցիտինի մասնակցությամբ առնետի լյարդի միտոքոնդրիաներում բարձրանում է շնչառության ինտենսիվությունը: Նման տրվյալների մենք հանդիպում ենք Հաբերմանի [6] և այլ հեղինակների աշխատություններում՝ սպիտակ առնետի լյարդի հոմոգենատների վերաբերյալ:

Ելնելով այն բանից, որ ֆոսֆոլիպիդների մասնակցությամբ հյուսվածքում կապված օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացումը ճեղքվում է և մեր կողմից հայտնաբերված լիպոպրոտեինային ֆրակցիայում մեծ քանակությամբ լեցիտին է պարունակվում, մենք մտածեցինք, որ հավի սաղմի ուղեղի և լյարդի միտոքոնդրիաներում շնչառության և ֆոսֆորիլացման պրոցեսի ճեղքումը կարող է պայմանավորված լինել նաև լեցիտինի ներգործությամբ: Քանի որ գրականության մեջ տվյալներ չկան հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա ֆոսֆոլիպիդների ազդեցության վերաբերյալ, մենք որոշեցինք հետազոտել լեցիտինի ազդեցությունը հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում շնչառության և ֆոսֆատի փոխանակության վրա:

Այդ նպատակով վերցրել ենք հավի 15—17 օրական սաղմեր, սառույցի վրա հանել ամբողջ ուղեղը: Այն ազատել ենք թաղանթից, արյունը մաքրել ֆիլտրի թղթով, որը ներծծված է եղել 0,25 M սախարոզայի լուծույթով: Յուրաքանչյուր փորձի համար անհրաժեշտ է եղել 5—6 գ ուղեղանյութ, որի հա-

մար միացրել ենք մի քանի սաղմերի ուղեղներ: Հյուսվածքի հոմոգենացումը կատարել ենք առանց նախնական մանրացման՝ պտտվող տեֆլոնային սանդակով հոմոգենիզատորով, 0,25 M սախարոզայի լուծույթում՝ 1:8 կամ 1:9 հարաբերությամբ: Լուծույթի pH-ը եղել է 7,4: Բջջային ֆրակցիաների անջատումը կատարվել է դիֆերենցիալ ցենտրիֆուգացմամբ Մանդելի և աշխ. [7] եղանակով՝ որոշ ձևափոխումներով: Ուղեղի միտոքոնդրիաների վերջնական նստվածքը, առանց լվացման սուսպենզիայի ենք 0,25 M սախարոզայի լուծույթում՝ 1:1 կամ 1:2 հարաբերությամբ և տեղավորել համապատասխան ինկուբացիոն խառնուրդում (2 մլ): Միտոքոնդրիաների շնչառությունը որոշել ենք մանոմետրիկ եղանակով 26°-ում 30 րոպեի ընթացքում: Անօրգանական ֆոսֆատի որոշման հիմքում ընդունել ենք Լոուրիի և Լոպեզի [8] մեթոդը՝ Սկուլչաշովի [5] և Պիլի-Լոհմենի [12] ձևափոխությամբ:

ԱՏՖ-ազային ակտիվությունը որոշել ենք օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման ուսումնասիրության պայմաններում [13]: Որպես ֆերմենտի ակտիվության չափանիշ ընդունել ենք ինկուբացիոն միջավայրում անօրգանական ֆոսֆատի քանակի ավելացումը, որն առաջացել է ֆերմենտի գործունեության հետևանքով՝ ԱՏՖ-երի ճեղքման հաշվին:

Մեր հետազոտությունները ցույց են տվել, որ միտոքոնդրիաներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա լեցիտինի ազդեցությունը երևան է գալիս սկսած 20—25 մկգ/մլ սահմաններում: Ելնելով այդ տվյալներից, մենք նմուշներում ավելացրել ենք լեցիտինի տարբեր քանակներ՝ 25—150 մկգ/մլ-ում:

Ստացված բոլոր տվյալները հաշվել ենք 1 մգ սպիտակուցի հաշվով [9]:

Փորձերի արդյունքները ցույց են տալիս, որ սաթաթթվի ավելացման դեպքում լեցիտինի ազդեցությամբ հավի սաղմի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիաներում թթվածնի կլանումը դանդաղում է, ընդ որում նրա քանակի ավելացմանը զուգընթաց շնչառության թուլացումը ակնառու է դառնում (աղ. 1): Ավելացված լեցիտինի ներկայությամբ ուղեղի միտոքոնդրիաներում նման դինամիկա դիտվում է նաև անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացման պրոցեսում: Միտոքոնդրիաներում կլանված թթվածնի և անօրգանական ֆոսֆատի նշված տեղաշարժերին համապատասխան՝ փոփոխվում է նաև շնչառության ու էսթերիֆիկացված ֆոսֆատի գործակիցը. ավելացված լեցիտինի քանակին զուգահեռ P/O-ն աստիճանաբար փոքրանում է:

Մեր նախընթաց աշխատություններում ցույց էր տրվել, որ շնչառական տարբեր ազդակներից (2,4-դինիտրոֆենոլ, խոլաթթու, ամիտալ և այլն) հավի սաղմի ուղեղի և լյարդի միտոքոնդրիաներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսը տարբեր սուբստրատների օքսիդացման դեպքում ենթարկվում է տարբեր փոփոխությունների [3, 4]: Ելնելով այդ տվյալներից, մենք փորձարկեցինք լեցիտինի ազդեցությունը ուղեղում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա նաև գլուտամատի ու գամմա-ամինակարագաթթվի օքսիդացման դեպքում:

Հետազոտություններից ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ գլուտամատի օքսիդացման դեպքում լեցիտինի ազդեցությամբ հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում թթվածնի կլանումն ու ֆոսֆատի էսթերիֆիկացումը ճնշվում են և P/O-ն փոքրանում է (աղ. 2): Գլուտամատի օքսիդացման դեպքում լեցիտինի 50 մկգ/մլ քանակից սկսած թթվածնի կլանումը նկատելիորեն դանդաղում է: Մինչդեռ սուկցինատի ներկայությամբ լեցիտինի

Ա Ղ Յ Ո Ւ Ս Ա Կ 1

Լեցիտինի ազդեցությունը հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում
օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա սուկցինատի ավելացման դեպքում
(ΔO և ΔP մկատոմներով)

Փորձերը		ΔO	ΔP	P/O
Ստուգիչ (առանց լեցիտինի ավելացման)		$3,43 \pm 0,22$ (6)	$5,00 \pm 0,41$ (6)	$1,44 \pm 0,05$ (6)
Լեցիտին, մկգ/մլ	25	$3,38 \pm 0,20$ (5)	$4,86 \pm 0,04$ (5) $T=0,34$ $P>0,500$	$1,45 \pm 0,07$ (5)
	50	$3,08 \pm 0,17$ (5) $T=1,2$ $P>0,200$ $<0,400$	$3,75 \pm 0,51$ (5) $T=2$ $P>0,050$ $<0,160$	$1,19 \pm 0,10$ (5)
	75	$3,23 \pm 0,18$ (6)	$3,06 \pm 0,34$ (6) $T=3,2$ $P>0,005$ $<0,001$	$0,93 \pm 0,11$ (6) $T=4$ $P>0,001$ $<0,005$
	100	$2,89 \pm 0,16$ (6) $T=2$ $P>0,050$ $<0,100$	$2,35 \pm 0,38$ (6) $T=4,7$ $P<0,001$	$0,79 \pm 0,01$ (6) $T=5,4$ $P<0,001$
	125	$2,88 \pm 0,13$ (6)	$1,89 \pm 0,35$ (6) $T=5,7$ $P<0,001$	$0,65 \pm 0,11$ (6) $T=6$ $P<0,001$
	150	$2,96 \pm 0,11$ (6)	$1,47 \pm 0,24$ (6) $T=7,3$ $P<0,001$	$0,49 \pm 0,08$ (6) $T=9$ $P<0,001$

Ա Ղ Յ Ո Ւ Ս Ա Կ 2

Լեցիտինի ազդեցությունը հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում օքսիդացիոն
ֆոսֆորիլացման վրա գլուտամատի ավելացման դեպքում
(ΔO և ΔP մկատոմներով)

Փորձերը		ΔO	ΔP	P/O
Ստուգիչ (առանց լեցիտինի ավելացման)		$3,55 \pm 0,40$ (9)	$1,60 \pm 0,14$ (9)	$2,16 \pm 0,10$ (9)
Լեցիտին, մկգ/մլ	25	$3,57 \pm 0,63$ (4)	$1,57 \pm 0,22$ (4)	$2,22 \pm 0,13$ (4)
	50	$1,95 \pm 0,29$ (6) $T=3$ $P>0,005$	$1,26 \pm 0,10$ (6) $T=2$ $P>0,050$ $<0,100$	$1,50 \pm 0,11$ (6) $T=4$ $P=0,001$
	75	$2,01 \pm 0,14$ (8) $T=3,2$ $P=0,005$	$1,30 \pm 0,08$ (8) $T=2$ $P>0,050$ $<0,100$	$1,49 \pm 0,12$ (8) $T=4,2$ $P<0,001$
	100	$1,55 \pm 0,20$ (8) $T=4,1$ $P<0,001$	$1,10 \pm 0,09$ (8) $T=3$ $P>0,005$ $<0,010$	$1,36 \pm 0,11$ (8) $T=5,3$ $P<0,001$
	125	$1,33 \pm 0,24$ (8) $T=4,4$ $P<0,001$	$1,08 \pm 0,03$ (8) $T=4$ $P=0,001$	$1,16 \pm 0,16$ (8) $T=5,2$ $P<0,001$
	150	$1,12 \pm 0,24$ (8) $T=4,8$ $P<0,001$	$1,05 \pm 0,06$ (8) $T=3,6$ $P>0,001$ $<0,005$	$0,99 \pm 0,18$ (8) $T=5,5$ $P<0,001$

քանակների ավելացմանը զուգընթաց՝ կլանված թթվածնի քանակի պակասեցումն ընթանում է աստիճանաբար:

Լեցիտինի ներկայությամբ սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացումը ճնշվում է նաև դամմա-ամինակարագաթթվի ավելացման դեպքում (աղ. 3):

Աղյուսակ 3

Լեցիտինի ազդեցությունը հավի սաղմի միտոքոնդրիաներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա դամմա-ամինակարագաթթվի ավելացման դեպքում (ΔO և ΔP միատոմներով):

Փորձերը		ΔO	ΔP	P/O
Ստուգիչ (առանց լեցիտինի ավելացման)		$0,76 \pm 0,04$ (4) $T=0,71$ $P=0,500$	$0,99 \pm 0,17$ (4)	$1,27 \pm 0,18$ (4)
Լեցիտին, մկգ/մլ	25	$0,71 \pm 0,06$ (4) $T=1$ $P > 0,200$ $< 0,400$	$0,90 \pm 0,07$ (4) $T=0,5$ $P > 0,200$ $< 0,400$	$1,31 \pm 0,21$ (4)
	50	$0,66 \pm 0,03$ (4) $T=2$ $P > 0,050$ $< 0,100$	$0,67 \pm 0,02$ (4) $T=1,8$ $P=0,100$	$1,02 \pm 0,01$ (4) $T=1,2$ $P > 0,200$ $< 0,400$
	75	$0,72 \pm 0,03$ (4)	$0,58 \pm 0,16$ (4) $T=2,0$ $P > 0,050$ $< 0,100$	$0,80 \pm 0,26$ (4) $T=1,6$ $P > 0,100$ $< 0,200$
	100	$0,59 \pm 0,03$ (4) $T=3,4$ $P=0,010$	$0,33 \pm 0,05$ (4) $T=7$ $P < 0,001$	$0,56 \pm 0,07$ (4) $T=3,2$ $P > 0,010$ $< 0,025$
	125	$0,58 \pm 0,03$ (4) $T=3,6$ $P > 0,005$ $< 0,010$	$0,23 \pm 0,01$ (4) $T=4,5$ $P > 0,001$ $< 0,005$	$0,40 \pm 0,04$ (4) $T=4,1$ $P > 0,001$ $< 0,005$
	150	$0,62 \pm 0,01$ (4) $T=2,3$ $P=0,050$	$0,25 \pm 0,02$ (4) $T=4,1$ $P > 0,001$ $< 0,005$	$0,40 \pm 0,05$ (4) $T=4$ $P=0,005$

Պետք է նշել, որ այն նմուշներում, որտեղ բացակայում է օքսիդացման աուքստրատը 150 մկգ/մլ լեցիտինի ներկայությամբ, ստուգիչի համեմատությամբ ուղեղի միտոքոնդրիաներում թթվածնի կլանումը փոփոխության չի ենթարկվում (աղ. 4): Այդ պայմաններում գրեթե ոչ մի փոփոխության չի ենթարկվում նաև անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացումը:

Աշխատանքի մի մասը կազմել է լեցիտինի ազդեցության հետազոտությունը ԱՏՖ-ազային ակտիվության վրա: Բերված տվյալներից երևում է, որ լեցիտինի տարբեր քանակների ներկայությամբ հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում ԱՏՖ-ազային ակտիվությունն աստիճանաբար բարձրանում է (աղ. 5):

Այսպիսով, հետազոտություններից ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ լեցիտինի ազդեցությամբ հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսը ճեղքվում է, սակայն շնչառությունը չի խթանվում: Միաժամանակ միտոքոնդրիաներում անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացման պրոցեսն ավելի ուժեղ է ենթարկվում լեցիտինի

Աղյուսակ 4

Լեցիտինի ազդեցությունը հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում
օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա սուկցինատի ավելացման և նրա բացակայության
պայմաններում (ΔO և ΔP մկատմաներով):

Փորձերը	ΔO	ΔP^{**}
Լրիվ ինկուբացիոն խառնուրդ* + 150 մկգ լեցիտին, առանց օքսիդացման սուբստրատի	$0,41 \pm 0,05$ (6)	$0,82 \pm 0,03$ (6)
Լրիվ ինկուբացիոն խառնուրդ առանց օքսիդացման սուբստրատի և լեցիտինի ավելացման	$0,36 \pm 0,02$ (8)	$0,69 \pm 0,04$ (8)

* Ինկուբացիոն խառնուրդը պարունակել է՝ օքսիդացման սուբստրատ՝ 50 մկմոլ, կալիումի ֆոսֆատ՝ 40, KCl—100, MgCl₂—10, գլյուկոզա՝ 150, ԱՏՖ՝ 3 մկմոլ և 0,5—0,7 մգ բյուրեղական հեքսոկինազա (խառնուրդի ծավալը՝ 2 մլ):

** Ազատ ֆոսֆատի քանակը:

Աղյուսակ 5

Լեցիտինի ազդեցությունը հավի սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիաներում
ԱՏՖ-ֆոսֆոհիդրոլազային ակտիվության վրա

Փորձերը		ΔP մկատմաներով
Ստուգիչ		$2,69 \pm 0,13$ (6)
Լեցիտին, մգ/մլ	50	$2,72 \pm 0,15$ (5) $T=0,15$ $P<0,500$
	100	$2,87 \pm 0,16$ (5) $T=0,90$ $P>0,200$ $P<0,400$
	150	$3,03 \pm 0,16$ (6) $T=1,7$ $P>0,100$ $P<0,200$

ազդեցությանը, քան թթվածնի կլանումը, որի հետևանքով P/O-ն փոքրանում է: Այդ պրոցեսում մակրոէրգերի արագ քայքայմանը նպաստում է նաև ԱՏՖ-ազայի ակտիվության բարձրացումը:

Հայկական ՄՍՀ

ԳԱ Բիոքիմիայի ինստիտուտ

Ստացված է 1.X 1968 թ.

А. А. СИМОНЯН

ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЫХАНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА
КУРИНОГО ЭМБРИОНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛЕЦИТИНА

Резюме

В наших предыдущих исследованиях было показано, что в конце онтогенетического развития куриного эмбриона в ткани печени имеет

Место процесс накопления жиров и образования липопротеиновой фракции [1, 2]. Одновременно в присутствии этой фракции в опытах *in vitro* в митохондриях мозга и печени сопряженное окислительное фосфорилирование разобщается. Исследования по изучению содержания липопротеиновой фракции выявили большое количество фосфолипидов, в том числе и лецитинов. В литературе имеются данные [10, 11] о разобщающем действии лецитинов в процессе дыхания и окислительного фосфорилирования. Однако аналогичных данных в тканях развивающегося куриного эмбриона нет. Мы задались целью изучить влияние различных количеств лецитина на интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования, а также на АТФ-фосфогидролазную активность в митохондриях мозга 15—17-дневных куриных эмбрионов.

Результаты, полученные из опытов, показывают, что при добавлении различных субстратов окисления (янтарная кислота, глутамат, гамма-аминомасляная кислота) под влиянием лецитина (25—150 мкг/мл) процесс сопряженного окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга куриного эмбриона разобщается, однако дыхание не стимулируется. При добавлении лецитина угнетение процесса сопряжения неорганического фосфата превалирует над поглощением кислорода митохондриями, результатом чего является постепенное уменьшение коэффициента Р/О. Интенсивному распаду макроэргов в присутствии лецитина способствует и повышение активности АТФ-азы.

Գ Ր Ա Շ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

1. Симосян А. А. Известия АН АрмССР (сер. биол.), т. 18, 11, 1965.
2. Симосян А. А. ДАН АрмССР, т. 41, 5, 1965.
3. Ս ի մ ո ն յ ա ն Ա. Ա. Օրգանական ֆոսֆորիլացումը հավի սաղմի ուղեղի և լյարդի միտոքոնդրիաներում էմբրիոնալ ընթացքում և հետազոտման շրջանում: Թեկնածուական դիսերտացիա, Երևան, 1966:
4. Симосян А. А. Биологический журнал Армении, XX, 4, 1967.
5. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Изд. АН СССР, М., 1962.
6. Habermann E. Naturwissenschaften, 18, 429, 1954.
7. Mandel P., Borkowski S., Harth S. T., Mardell R. J. Neurochem., 8, 126, 1961.
8. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
10. Petrushka E., Quastel J. H., Scholefield P. G. Canadian J. of biochemistry and physiology, 37, 8, 989, 1959.
11. Petrushka E., Quastel J., Scholefield P. G. Canadian J. of biochemistry and physiology, 37, 8, 975, 1959.
12. Pell J. L., Loughman B. C. Biochem. J., 65, 709, 1957.
13. Slater E. C. Internat. symposium on enzyme chem., Tokyo—Kyoto, 230, 1957.