

УДК 577.1611.8

Р. М. НИАЗЯН, О. М. НАЗАРЯН, С. Г. МОВСЕСЯН

ДЕЙСТВИЕ ДЕАМИНО-НАД НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПОЧЕК

Исследовалось влияние Д-НАД на процесс окислительного фосфорилирования в митохондриальной фракции почек в присутствии экзогенных субстратов. Показано, что экзогенные субстраты в отдельности довольно слабо стимулируют процесс окислительного фосфорилирования, а в сочетании с Д-НАД он стимулируется в значительной мере.

Ранее сделанное предположение о том, что Д-НАД в отличие от НАД сравнительно легко проникает в митохондрии и, вовлекаясь в дыхательную цепь, стимулирует процесс окислительного фосфорилирования, подтверждается также в отношении почечной ткани.

Одним из важнейших кофакторов окислительного метаболизма являются пиридиннуклеотидные коферменты—основные посредники между субстратами окисления и дыхательной цепью. В тесной зависимости от соотношения восстановленных и окисленных форм пиридиннуклеотидов находится направленность окислительно-восстановительных процессов.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что как окисленные, так и восстановленные формы экзогенных пиридиннуклеотидов вовсе не проникают или же весьма медленно проникают в митохондрии и не могут должным образом обеспечивать дыхательную активность указанных структур [7, 9, 13—15]. Выяснено, что между внешней и внутренней мембранами митохондрий существует барьер, который лимитирует вход экзогенных пиридиннуклеотидов в митохондрии [10, 17, 18]. Для объяснения механизма окисления цитоплазматического НАДН в митохондриях предложено в основном два механизма: немитохондриальный НАДН может окисляться либо при участии цитоплазматической лактатдегидрогеназы, либо через дыхательную цепь благодаря существованию так называемых «челночных» систем. В качестве таких систем рассматривались α -глицерофосфат-диоксиацетонфосфат, малат-оксалоацетат, ацетоацетат- β -оксибутират, глутамат-оксалоацетат и система SC_0A [8, 11, 12, 17]. Предыдущими исследованиями Мовсесяна и сотр. было установлено [1—4], что Д-НАД играет важную роль как в азотистом, так и в энергетическом обменах. Исследования по окислительному обмену показали, что Д-НАД сильно стимулирует процесс сопряженного фосфорилирования при наличии как эндогенных, так и экзогенных субстратов дыхания и оказывает специфическое действие

на гликолитический процесс в суммарной митохондриальной фракции мозга.

Исследования, проведенные нами в последние годы, показали, что не только окисленная, но и восстановленная форма Д-НАД сильно активирует процесс окислительного фосфорилирования как в мозговой, так и в печеночной тканях [5, 6]. Было установлено, что Д-НАД является природным переносчиком электронов в цепи окисления и функционирует в первом пункте дыхательного фосфорилирования. Он повышает не только общий уровень фосфорилирующего окисления, но и усиливает степень сопряженности. Полученные данные позволили заключить, что экзогенный Д-НАД и его восстановленная форма в отличие от НАД и НАДН сравнительно легко преодолевают мембранный барьер митохондрий и энергично вовлекаются в процесс переноса электронов в дыхательной цепи. На основании этих данных нами было постулировано положение, согласно которому система Д-НАД—Д-НАДН выполняет важную роль в транспорте электронов из цитоплазмы в митохондрии.

В настоящей работе исследовалось действие Д-НАД на окислительное фосфорилирование в почечной ткани.

Материал и методика. Эксперименты проводились на кроликах, содержащихся на обычном пищевом рационе. После декапитации животного быстро извлекали почки и переносили в охлажденный стакан. Освобождали от оболочек, измельчали до гомогенной массы. Гомогенизацию проводили с 9-ю объемами 0,25 М раствора сахарозы (рН 7,4) в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Фракционирование гомогенатов проводили по методу Хогебума и Шнейдера [16, 19]. Гомогенаты центрифугировали на холоде (0—4°C) для удаления ядер при 800—900 g 10 мин. Фракции митохондрий выделяли путем центрифугирования полученной надосадочной жидкости в течение 15 мин (при 11000—12000 g). Окислительное фосфорилирование изучали в инкубационной смеси, содержащей 0,2 мл 0,133 М К-фосфатного буфера (рН 7,4), 0,15 мл 0,2 М трисНСI буфера (рН 7,4), 0,1 мл 0,12 М MgSO₄, 0,1 мл 0,02 М АТФ, 0,1 мл, 0,56 М глюкозы, 1 мг кристаллической гексокиназы и 0,5 мл митохондриальной суспензии. В отдельные пробы добавляли субстраты окисления по 10,0 Д-НАД—1,4 мкмоль. Объем инкубационной смеси доводили сахарозой до 2 мл, инкубировали при 26°C в течение 30 мин в атмосфере воздуха. Дыхание митохондрий измеряли манометрическим способом в аппарате Варбурга. Неорганический фосфат определяли по методу Лоури и Лопеза [19] в модификации Пила и Лохмана.

Результаты и обсуждение. Действие Д-НАД на окислительное фосфорилирование в митохондриях почечной ткани изучали в присутствии различных по своей природе субстратов дыхания (α -КГ, ГК, ЯК, ЯБК)*, которые включаются в дыхательную цепь как на уровне НАД, так и ФАД. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что Д-НАД сам по себе несколько активирует как потребление кислорода, так и эстерификацию неорганического фосфата в прединкубированных (5—10 мин) митохондриях почек за счет усиления эндогенных субстратов дыхания. Ранее нами было показано [5, 6], что эффект Д-НАД на окислитель-

* α -КГ— α -кетоглутаровая кислота, ГК—глутаминовая кислота, ЯК—янтарная кислота, ЯБК—яблочная кислота.

Т а б л и ц а

Действие Д-НАД на окислительное фосфорилирование
в митохондриальной фракции почек

Условия опытов	Убыль неорганического фосфата (ΔP), мкатома	Поглощение кислорода (ΔO), мкатома	P/O
Д-НАД	$0,89 \pm 0,3$	$0,41 \pm 0,01$	—
α -КГ	$1,61 \pm 0,3$	$1,45 \pm 0,04$	1,7
ГК	$1,61 \pm 0,4$	$1,49 \pm 0,04$	1,0
ЯК	$1,69 \pm 0,3$	$1,92 \pm 0,03$	1,0
ЯБК	$1,77 \pm 0,4$	$1,48 \pm 0,02$	1,2
α -КГ+Д-НАД	$3,58 \pm 0,4$	$1,91 \pm 0,03$	2,2
ГК+Д-НАД	$3,35 \pm 0,3$	$1,67 \pm 0,03$	2,0
ЯК+Д-НАД	$3,51 \pm 0,3$	$2,22 \pm 0,03$	1,6
ЯБК+Д-НАД	$4,11 \pm 0,3$	$1,98 \pm 0,03$	2,0

Количество митохондриального белка в каждой пробе составляло в среднем 5,6 мг; число опытов—10.

ное фосфорилирование в митохондриях без предварительной инкубации с высоким эндогенным дыханием выражен гораздо сильнее.

Из приведенных в таблице данных видно, что экзогенные субстраты порознь не особенно эффективно стимулируют поглощение кислорода и утилизацию ортофосфата митохондриями почек. Однако в присутствии Д-НАД их активирующее действие на сопряженное фосфорилирование заметно повышается, причем этот эффект наиболее выражен в случае с ЯБК. Так, например, из полученных результатов видно, что в опытах, поставленных отдельно с Д-НАД и с ЯБК, уровни поглощения кислорода и эстерификации неорганического фосфата сравнительно низки и соответственно составляют 0,41, 0,89 и 1,48, 1,77 мкатома на пробу. При сочетании ЯБК с Д-НАД, как показывают данные, оба процесса заметно усиливаются, причем процесс эстерификации ортофосфата превалирует над поглощением кислорода, в результате чего P/O значительно возрастает. В этих опытах поглощается 1,89 мкатома кислорода и 4,11 мкатома ортофосфата. Данные, приведенные в таблице, показывают, что в пробах с α -КГ, ГК, ЯК в слабой мере интенсифицируется процесс окислительного фосфорилирования, соответственно поглощается 1,45, 1,49, 1,92 мкатома кислорода и 1,61, 1,61, 1,69 мкатома фосфора на пробу. Однако при их комбинации с Д-НАД значительно активизируется процесс сопряженного фосфорилирования. В этом случае уровень потребления кислорода и эстерификации неорганического фосфата достигает соответственно 1,91, 1,67, 2,22 мкатома кислорода и 3,58, 3,35 и 3,51 мкатома ортофосфата на пробу.

Полученные данные дают основание считать, что Д-НАД в почечной ткани является эффективным кофактором окислительного фосфорилирования, что расширяет наши представления об органной специфичности действия указанного динуклеотида.

Ռ. Մ. ՆԱԶՅԱՆ, Օ. Մ. ՆԱԶԱՐՅԱՆ, Ս. Գ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ

ԴԵԱՄԻՆՈ—ՆԱԴ-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՕՔՍԻԴԱՑԻՈՆ
ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՑՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԻ ՎՐԱ ՆՐԻԿԱՄԱՅԻՆ
ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱԿԱՆ ՖՐԱԿՑԻԱՅՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է Դ-ՆԱԴ-ի ազդեցությունը օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսի վրա երիկամային հյուսվածքի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում, իրենց բնույթով տարբեր շնչառական սուբստրատների առկայության պայմաններում (α -ԿԳԹ, ԳԹ, ՍԹ, ԽԹ), որոնք ընդգրկվում են շնչառական շղթայի մեջ ինչպես ՆԱԴ-ի այնպես էլ ՖԱԴ-ի մակարդակով: Նախկինում կատարված հետազոտությունները ցույց էին տվել, որ Դ—ՆԱԴ-ը ուժեղ կերպով խթանում է օքսիդացմանը զուգակցված ֆոսֆորիլացման պրոցեսը ուղեղի և լյարդի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում ինչպես էնդոզեն, այնպես էլ էկզոզեն սուբստրատների առկայության պայմաններում և ցուցաբերում է սպեցիֆիկ ազդեցություն պրիկոլիտիկ պրոցեսի վրա: Հետևաբար եզրակացվեց, որ Դ—ՆԱԴ—Դ—ՆԱԴ-Ի սիստեմը ունի կարևոր նշանակություն էլեկտրոնների տրանսպորտի մեջ՝ հիալոպլազմայից դեպի միտոքոնդրիաներ:

Երիկամային հյուսվածքի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում կատարված ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ Դ—ՆԱԴ-ը բավական ցայտուն կերպով ակտիվացնում է էկզոզեն սուբստրատների օքսիդացումը և նրան համալուծ ֆոսֆորիլացման պրոցեսը այն դեպքում, երբ նշված սուբստրատները առանձին-առանձին համեմատաբար թույլ են խթանում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսը: Ստացված արդյունքները հիմք են տալիս եզրակացնելու, որ Դ—ՆԱԴ-ը երիկամային հյուսվածքում նույնպես հանդիսանում է օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման արդյունավետ կոֆակտոր, որը և ընդարձակում է մեր պատկերացումները նշված դինուկլեոտիդի ազդեցության օրգանային յուրահատկությունների վերաբերյալ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мовсесян С. Г., Манасян Р. Ф. Вопросы биохимии мозга Ереван, 3, 51, 1967.
2. Мовсесян С. Г., Камалян Р. Г. ДАН АрмССР, 47, 81, 1968.
3. Мовсесян С. Г. Докт. дисс., Ереван, 1968.
4. Мовсесян С. Г., Мирзоян Р. А., Бунятыан Г. Х. ДАН АрмССР, 49, 98, 1969.
5. Мовсесян С. Г., Խազյան Ր. Մ. Биологический журнал Армении, 26, 7, 1973.
6. Խազյան Ր. Մ., Սրգանձյան Մ. Գ., Мовсесян С. Г. Биологический журнал Армении, 27, 2, 1974.
7. Brody T. M., Bain J. A. J. Biol. Chem., 195, 685, 1952.
8. Boxer G. E., Devlin T. M. Science, 134, 1495, 1965.
9. Chance B., Theorell B. J. Biol. Chem., 234, 3044, 1959.
10. Cammer W., Moore C. L. Arch. Biochem. Biophys., 134, 290, 1970.
11. Devlin T. M., Bedel B. M. J. Biol. Chem., 235, 2134, 1960.
12. Estabrook R. W., Sacktor B. J. Biol. Chem., 23, 1014, 1958.
13. Greenspan M. D., Purvis J. L. Biochem. Biophys. acta, 99, 191, 1965.
14. Greenspan M. D., Purvis J. L. J. Biol. Chem., 234, 11, 1968.

15. Grunnet N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 4, 1970.
16. Hogeboom G. H., Schnelder W. C., Pallade G. H. J. Biol. Chem., 191, 111, 1948.
17. Klingenberg M. FEBS Letters 6, 145, 1970.
18. Lehninger A. B. J. Biol. Chem. 190, 1951.
19. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem. 162, 421, 1946.
20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randell R. J. J. Biol. Chem. 19, 265, 1951.