

УДК 577.3:612.2

А. А. СИМОНЯН, Г. А. ГЕВОРКЯН, Р. А. СТЕПАНЯН, Л. О. ВОСКАНЯН

ВЛИЯНИЕ ДНФ НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

При окислении глутамата и α -кетоглутарата интенсивность дыхания в изолированных митохондриях сердечной мышцы 15-дневных куриных эмбрионов в присутствии 2,4-динитрофенола (ДНФ) заметно повышается, а процесс эстерификации неорганического фосфата по мере развития эмбриона подавляется. При использовании сукцината в качестве субстрата в различные дни развития кур ДНФ несколько подавляет дыхание митохондрий сердца, заметно снижается также уровень эстерифицированного фосфата.

Несмотря на значительные успехи в области регуляции энергетической функции митохондрий, некоторые стороны этого важного и вместе с тем сложного процесса не получили еще достаточного освещения [8, 9]. В этом плане митохондрии сердца имеют свои особенности, отличающие их от митохондрий других тканей. В настоящей работе приведены результаты изучения влияния 2,4-динитрофенола на интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования в изолированных интактных митохондриях сердечной мышцы кур в различные периоды их онтогенетического развития.

Материал и методика. Сердце эмбрионов соответствующего возраста (возраст эмбрионов определяли по срокам инкубации) промывали ледяным раствором 0,15 М КСІ в течение 30 сек. Ткань измельчали специальной давилкой, затем гомогенизировали в течение 30—40 сек в гомогенизаторе Поттера.

Митохондрии (МХ) выделяли в растворе 0,44 М сахарозы-1 ммоль ЭДТА. Ядра выделяли при 2500g, МХ —12000g. Осадок МХ суспендировали в 0,25 М растворе сахарозы—0,02 М трис-НСІ буфере. Чистоту митохондриальной фракции контролировали электронной микроскопией.

Поглощение кислорода МХ сердца определяли манометрическим методом [7] при 26° в течение 45 мин. Инкубационная смесь (2 мл) содержала в мкмольях: субстрат окисления —40 (α -кетоглутарат, глутамат и сукцинат), K_2HPO_4 —30, КСІ—100, $MgCl_2$ —10, глюкозы—150, АГФ—3 и 1 мг кристаллической гексокиназы (Sigma Chem. Co.); ДНФ использовали в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ М. Неорганический фосфат (НФ) определяли по методу Лоури и Лопес [14] в модификации Пелла и Лохмена [16]. МХ добавляли из расчета 4—5 мг белка в пробу. Белок определяли по Лоури и сотр. [15]. Полученные данные рассчитаны на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований, приведенные в табл. 1, показывают, что в контрольных опытах при окислении α -кетоглутарата поглощение кислорода в МХ сердца 20-дневных эмбрионов усиливается по сравнению с 15-дневными. Однако дальнейшего усиления дыхания в митохондриях сердца у 5-дневных цыплят не наблюдается. Процесс эстерификации НФ в различные периоды эмбрионального

развития почти не меняется. Как видно из приведенных данных, по мере развития куриного эмбриона интенсивность свободного дыхания превалирует над фосфорилирующим.

Таблица 1

Влияние ДНФ на интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования в интактных митохондриях сердца кур в онтогенезе при окислении α -кетоглутарата. O и P —в мкатамах/мг белка. $M \pm m$.

Дни развития	Контроль			2,4-динитрофенол		
	ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O
15	$2,66 \pm 0,13$ (8)	$10,96 \pm 0,12$ (8)	$4,05 \pm 0,15$ (8)	$3,25 \pm 0,09$ (8)	$9,36 \pm 0,19$ (8)	$2,87 \pm 0,02$ (8)
20	$3,58 \pm 0,13$ (8)	$10,00 \pm 0,32$ (8)	$2,80 \pm 0,20$ (8)	$3,88 \pm 0,16$ (8)	$7,82 \pm 0,36$ (8)	$2,10 \pm 0,14$ (8)
5-дневные цыплята	$3,56 \pm 0,17$ (8)	$11,91 \pm 0,07$ (8)	$3,12 \pm 0,08$ (8)	$3,62 \pm 0,07$ (8)	$6,69 \pm 0,43$ (8)	$1,84 \pm 0,03$ (8)
Взрослые куры	$5,50 \pm 0,39$ (8)	$17,18 \pm 0,16$ (8)	$3,19 \pm 0,16$ (8)	$5,70 \pm 0,44$ (8)	$11,48 \pm 0,58$ (8)	$2,08 \pm 0,20$ (8)

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что под влиянием ДНФ на 15-й день развития эмбриона количество поглощенного кислорода митохондриями заметно увеличивается, однако в остальные дни в присутствии ДНФ отмечается лишь некоторое усиление дыхания.

При добавлении ДНФ процесс эстерификации НФ подавляется. По мере развития эмбриона и у 5-дневных цыплят разобщение окислительного фосфорилирования проявляется в большей степени. Так, например, по сравнению с контролем, под влиянием ДНФ на 15-й день развития количество эстерифицированного фосфата уменьшается на 15, на 20-й день—на 22, у 5-дневных цыплят—на 44, а у половозрелых кур—на 34%. Соответственно понижается и величина P/O .

При окислении глутамата уровень поглощения кислорода в изолированных интактных МХ сердечной мышцы постепенно возрастает начиная с 15-го дня эмбрионального развития, достигая максимума у половозрелых кур (табл. 2). Интенсивность эстерификации НФ в присутствии глутамата в различные периоды эмбриогенеза почти не меняется.

Высокий уровень процесса эстерификации НФ наблюдается у взрослых кур. В этих опытах P/O высокое у 15-дневных эмбрионов, у 20-дневных оно заметно понижено.

При окислении глутамата в присутствии ДНФ дыхание в МХ в различные дни развития эмбриона незначительно усиливается, однако эстерификация фосфата несколько подавляется и соответственно уменьшается P/O .

В наших опытах в качестве субстрата окисления мы использовали также сукцинат. Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что в опытах с сукцинатом дыхание МХ в различные дни эмбрионального разви-

Таблица 2
Влияние ДНФ на интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования в интактных митохондриях сердца кур в онтогенезе при окислении глутамата. О и Р—в мкатамах/мг белка. $M \pm m$

Дни развития	Контроль			2,4-динитрофенол		
	О	Р	Р/О	О	Р	Р/О
15	$2,92 \pm 0,02$ (8)	$11,22 \pm 0,20$ (8)	$3,84 \pm 0,05$ (8)	$3,33 \pm 0,06$ (8)	$10,64 \pm 0,24$ (8)	$3,18 \pm 0,05$ (8)
20	$3,15 \pm 0,06$ (8)	$9,36 \pm 0,29$ (8)	$2,97 \pm 0,06$ (8)	$3,24 \pm 0,03$ (8)	$8,21 \pm 0,29$ (8)	$2,53 \pm 0,09$ (8)
5-дневные цыплята	$4,10 \pm 0,20$ (8)	$9,88 \pm 0,23$ (8)	$2,40 \pm 0,05$ (8)	$4,16 \pm 0,17$ (8)	$10,01 \pm 0,65$ (8)	$2,64 \pm 0,13$ (8)
Взрослые куры	$7,32 \pm 0,94$ (8)	$23,46 \pm 1,46$ (8)	$3,23 \pm 0,13$ (8)	$7,87 \pm 0,78$ (8)	$20,44 \pm 1,02$ (8)	$2,61 \pm 0,05$ (8)

Таблица 3
Влияние ДНФ на интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования в интактных митохондриях сердца кур в онтогенезе при окислении сукцината. О и Р—в мкатамах/мг белка. $M \pm m$

Дни развития	Контроль			2,4-динитрофенол		
	О	Р	Р/О	О	Р	Р/О
15	$6,64 \pm 0,69$ (20)	$15,43 \pm 1,13$ (20)	$2,40 \pm 0,05$ (20)	$5,99 \pm 0,83$ (20)	$10,45 \pm 1,80$ (20)	$1,35 \pm 0,18$ (20)
20	$7,29 \pm 0,39$ (16)	$14,98 \pm 0,90$ (16)	$2,05 \pm 0,05$ (16)	$4,68 \pm 0,50$ (20)	$6,44 \pm 0,89$ (20)	$1,27 \pm 0,06$ (20)
5-дневные цыплята	$6,89 \pm 0,14$ (22)	$11,66 \pm 0,60$ (22)	$1,68 \pm 0,07$ (22)	$6,85 \pm 0,50$ (22)	$5,10 \pm 0,58$ (22)	$0,75 \pm 0,03$ (22)
Взрослые куры	$3,36 \pm 0,65$ (6)	$3,98 \pm 0,71$ (6)	$1,19 \pm 0,04$ (6)	$2,98 \pm 0,77$ (6)	$2,44 \pm 0,84$ (6)	$0,38 \pm 0,14$ (6)

тия носит линейный характер. Количество поглощенного кислорода у зрелых кур резко уменьшается по сравнению с эмбрионами. В этих опытах динамика процесса эстерификации фосфата в МХ снижается по ходу развития эмбриона до минимума у кур. Аналогично меняется и Р/О. При окислении сукцината, в отличие от глутамата и α -кетоглутарата, ДНФ несколько подавляет дыхание МХ сердца. Уменьшается также количество эстерифицированного фосфата.

Сопоставляя полученные результаты, следует отметить, что при окислении различных субстратов Р/О в изолированных МХ сердца куриного эмбриона начиная с 15-го дня развития постепенно снижается. Высвобождающаяся в результате интенсивного расщепления промежуточных макроэнергических соединений энергия обеспечивает постоянную температуру ткани и энергетические затраты развивающегося цыпленка. Приведенные данные подтверждают существующее в литературе выска-

зывают о том, что в быстрорастущих тканях окисление слабо сопряжено с фосфорилированием, в них преобладают процессы свободного окисления, обеспечивающие клетки необходимыми для биосинтезов метаболитами [1, 2, 5, 6]. Результаты этих опытов подтверждают наши предыдущие данные, касающиеся окислительного фосфорилирования в тканях мозга и печени куриного эмбриона [4], и указывают на наличие единого типа окислительных процессов в различных тканях развивающегося организма.

Из данных, приведенных в табл. 1—3, видно, что при использовании глутамата и α -кетоглутарата в качестве субстратов дыхание в МХ сердца 20-дневных эмбрионов, 5-дневных цыплят и половозрелых кур, по сравнению с контролем, под влиянием ДНФ несколько повышается. Однако в раннем эмбриогенезе, у 15-дневных эмбрионов, активирующее действие ДНФ на дыхание заметнее. В наших предыдущих работах [3] было показано, что влияние ДНФ на процессы окисления и фосфорилирования в МХ печени куриного эмбриона особенно сказывается в первые дни плодного периода развития. В последующие дни это влияние в известной мере нивелируется. Результаты этих опытов и предыдущие наши данные в отношении влияния ДНФ на окислительное фосфорилирование МХ различных тканей кур в эмбриогенезе согласуются с литературными. Так, в опытах Фельдмана и Коха [11] показано, что на самых ранних этапах развития эмбрион кур более чувствителен к разобщителям типа ДНФ и других фенолов. Подавление ДНФ-ом процесса окисления сукцината наблюдали Катъере и сотр. [13].

Известно, что действие ДНФ проявляется на уровне образования нефосфорилированного промежуточного макроэрга [10, 12], об этом свидетельствует отсутствие потребности в НФ для максимальной стимуляции дыхания под действием ДНФ. При этом ДНФ не угнетает дыхание, наоборот, даже активизирует его, с другой стороны, он стимулирует МХ АТФ-азу и тормозит реакции обмена АТФ— P_n , АТФ—АДФ и др. Полученные нами данные в отношении стимулирования дыхания МХ и угнетения процесса фосфорилирования ДНФ-ом в присутствии α -кетоглутарата и глутамата полностью совпадают с литературными. Эти результаты согласуются с нашими предыдущими данными [4], свидетельствующими о стимуляции окислительно-восстановительных процессов, образовании и распаде промежуточных макроэргических соединений в тканях развивающегося организма в конце эмбриональной и в ранней постэмбриональной стадиях.

При использовании сукцината в МХ под действием ДНФ по сравнению с контролем угнетается как дыхание, так и фосфорилирование. При этом по мере развития эмбриона подавление эстерификации НФ ДНФ-ом усиливается.

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Գ. Ա. ԳԵՎՈՐԴՅԱՆ, Ռ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Լ. Հ. ՈՍԿԱՆՅԱՆ

ԴՆՖ-Ի ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՎԻ ՍՐՏԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐԻ
ՕՔՍԻԴԱՑԻՈՆ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՑՄԱՆ ՎՐԱ ՕՆԹՈԳԵՆԵՑՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հետազոտվել է 2,4-դինիտրոֆենոլի (ԴՆՖ) ադպտացիոնը հավի սրտից անջատված միտոքոնդրիանների շնչառության և օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա օնթոգեննյում: Ցույց է տրվել, որ գլուտամատի և α -կետոգլուտարատի ավելացման դեպքում հավի 20 օրական սաղմի, 5 օրական ճտի և սեռահասուն անհատների սրտի միտոքոնդրիանների շնչառությունը ԴՆՖ-ի ադպտացիոնի տակ շնչին չափով աճում է: Նշված սուբստրատների օքսիդացման դեպքում ԴՆՖ-ի ներկայությամբ անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացման պրոցեսը զարգացման տարբեր օրերում օրինաչափ կերպով ճնշվում է:

Սուկցինատի օքսիդացման դեպքում սաղմի զարգացման տարբեր օրերում ԴՆՖ-ի ներկայությամբ շնչառությունը ճնշվում է և համապատասխանաբար պակասում էսթերիֆիկացված ֆոսֆատի քանակը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Джунед Х. Автореф. канд. дисс., М., 1962.
2. Северин С. Е., Скулачев В. П., Киселев Л. Л., Маслов С. П. ДАН СССР, 134, 1468, 1960.
3. Симонян А. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1966.
4. Симонян А. А. Некоторые стороны энергетического обмена в онтогенезе кур. Ереван, 1970.
5. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Изд. АН СССР, 1962.
6. Скулачев В. П., Джунед Х., Байнес А. С. Биохимия, 29, 653, 1964.
7. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., 1951.
8. Bacila M., Campello A., Vlanne C., Voss D. J. Neurochem., 11, 231, 1964.
9. Balazs R., Biesold D., Magyaor K. J. Neurochem., 10, 685, 1963.
10. Chappell J. Biochem. J., 90, 237, 1964.
11. Feldman G. L., Couch J. R. Poultry Sci., 39; 3, 521, 1960.
12. Hemker H. Blochim. Biophys. Acta, 81, 9, 1964.
13. Katyare S. S., Fatterpaker P., Sreenivasan A. Indian J. Biochem., 7, 1, 1, 1970.
14. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
16. Pell J. L., Loughman B. C. Biochem. J., 65, 709, 1957.