

УДК 577.17

## ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ И МОЗГА В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПОТИРЕОЗА

Э. И. ГАСПАРЯН, О. И. НАЗАРЯН, С. Г. МОВСЕСЯН

У животных с экспериментальным гипотиреозом констатирована прямая зависимость между уровнем снижения общего тироксина сыворотки крови и степенью разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга и печени.

Выявлены некоторые органические и субстратные различия в интенсивности восстановления сопряженного фосфорилирования в митохондриях изученных органов. На фоне бурного проявления разобщающего эффекта гипотиреоза (тиреондэктомия, 15-й день) в них значительно стимулируется АТФ-азная активность.

Сведения об энергетическом балансе клеток в условиях недостаточности тиреоидных гормонов немногочисленны и довольно разноречивы [1—5], что обусловлено в основном условиями проведения эксперимента. Так, Глушаковой и соавт. [2] установлено, что на 16—19-й дни после начала скармливания животным мерказолила (20 мг/100 г веса животного) содержание макроэргов, АТФ в их органах значительно уменьшается. По данным Туракулова и соотр. [4], у тиреоидэктомизированных кроликов на 30—45-й дни после хирургического вмешательства отмечается тенденция к снижению дыхания митохондрий печени. Однако при этом дыхательный контроль—показатель сопряженности процессов переноса электронов и фосфорилирования, а также величины АДФ/О—коэффициента окислительного фосфорилирования—оставались неизменными, т. е. не наблюдалось разобщения окислительного фосфорилирования.

Результаты исследований Медведевой [6, 7] свидетельствуют об отсутствии различий в процессах дыхания и фосфорилирования в митохондриях печени здоровых и гипотиреоидных животных. По Волкову и Глотову [4], тиреоидэктомия, помимо заметного снижения основного обмена, приводит к подавлению поглощения кислорода и эстерификации неорганического фосфата (НФ) митохондриями печени крыс.

Приведенные данные отражают в основном показатели, полученные в один из сроков гипотиреоидного состояния у животных, зачастую при отсутствии достаточной информации по контролю моделируемой ситуации. Вместе с тем известно, что поддержание стационарного гипотиреоидного состояния в эксперименте у животных представляет определенную трудность. Специфическое тестирование степени гипотирео-

за у экспериментальных животных представляет собой фактор чрезвычайной важности, поскольку оно должно быть положено в основу оценки результатов изучения окислительного фосфорилирования.

При скармливании 6-метилтиоурацила (6 МТУ) как в очень ранние, так и в поздние сроки опыта вследствие развития компенсаторных реакций гипотиреоз как таковой может отсутствовать. Согласно данным Романова и соавт. [8], у животных, получавших 6-МТУ, вплоть до 7—8-го дня после начала скармливания тиреостатика гипотиреоз (по показателю белковосвязанного йода) не только еще не наступает, но и, наоборот, имеет место гипертиреоз. Что касается поздних сроков, то и здесь на 2-й и 3-й месяцы у значительной части животных происходит компенсация недостаточности функции щитовидной железы как за счет усиления функции гипофиза [9], так и за счет регенераторной гиперплазии остатков ткани щитовидной железы, если модель создана путем тиреоидэктомии.

Мы задались целью изучить возможные пертурбации сопряженного фосфорилирования в митохондриях печени и мозга при первичном экспериментальном гипотиреозе, моделированном субтотальной тиреоидэктомией и скармливанием мерказолила, в динамике, строго контролируя при этом степень гипотиреоидного состояния у подопытных животных.

*Материал и методика.* Опыты проводились на белых беспородных крысах-самцах весом 150—180 г. Время эксперимента—зимние месяцы года. Как подопытные, так и контрольные животные находились в одинаковых условиях питания и режима вивариума. Всего использовано 36 животных. Контрольная группа—6 животных. Гипотиреоз моделирован: у 18 животных—двусторонней субтотальной тиреоидэктомией, а у других 18-ти—ежедневным скармливанием мерказолила, который вводился в пищевод с помощью изогнутого пищевого зонда в дозе 0,9 мг/100 г веса животного. Продолжительность опытов—60 дней.

Контроль гипотиреоидного состояния у подопытных животных осуществлялся путем определения в сыворотке крови общего тироксина с помощью диагностического набора РЕЗ-0-МАТ41125 (исследования проводились Айвазян Е. в лаборатории радиометрических исследований Института рентгенологии и онкологии МЗ АрмССР).

Подопытных животных забивали путем декапитации на 15, 30 и 60-й дни эксперимента. Ткань изучаемых органов после размельчения и гомогенизации подвергали дифференциальному центрифугированию в рефрижераторной центрифуге К-24. Гомогенизацию тканей проводили в девятикратном объеме 0,25 М раствора сахарозы (рН 7,4).

Выделение митохондрий из ткани мозга проводили по методу Броди и Байн [10] в модификации Палладина и Кирсенко [11]. Митохондрии печени выделяли по методу Хогбума и сотр. [12, 13]. Окислительное фосфорилирование изучали в инкубационной среде, содержащей 0,2 мл 0,133 М К-фосфатного буфера (рН 7,4), 0,15 мл 0,2 М трис-НСl буфера (рН 7,4), 0,1 мл 0,12 М MgSO<sub>4</sub>, 0,1 мл 0,02 М АТФ, 0,1 мл 0,56 М глюкозы, 1 мг кристаллической гексокиназы фирмы «Сигма» и 0,5 мл митохондриальной суспензии (это соответствует примерно 500 мг свежей ткани). Субстратами окисления служили  $\alpha$ -кетоглутарат ( $\alpha$ -КГ) и сукцинат, которые добавлялись в инкубационную жидкость в количестве 26 мкмоль. Объем реакционной смеси довели до 2 мл 0,25 М раствором сахарозы и инкубировали при 26° в течение 30 мин в аппарате Варбурга. Неорганический фосфат определяли по методу Лоури и Лопеса [14] в модификации Пила и Лохмана [15].

Активность АТФ-азы определяли в инкубационной среде, состоящей из 0,2 мл суспензии митохондрий, 0,1 мл 0,2 М трис-НСl буфера (рН 7,4), 0,2 мл 0,125 М КСl, 0,1 мл 0,12 М  $MgSO_4$  и 0,2 мл 0,036 М АТФ. Объем инкубационной смеси доводили до 2 мл добавлением 0,25 М раствора сахарозы. Инкубацию проводили при 26° в течение 30 мин. После осаждения белков 5% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) (конечная концентрация) в супернатанте определяли количество НФ. Об активности АТФ-азы судили по приросту НФ в инкубационной жидкости.

*Результаты и обсуждение.* Данные, приведенные в таблице, показывают, что как в митохондриях мозга, так и в митохондриях печени в опытах с субтотальной тиреоидэктомией во все изучаемые нами сроки имеет место разобщение окислительного фосфорилирования. При этом резко страдает как процесс потребления кислорода, так и процесс эстерификации НФ. Степень выраженности данного нарушения, как видно из таблицы, находится в тесной зависимости не только от срока гипотиреоидного состояния, но и от природы субстрата окисления. Так, на 15-й день постоперационного периода в митохондриях мозга и печени на фоне частичного блокирования поглощения кислорода полностью ингибируются процессы утилизации НФ и синтеза АТФ. Следует отметить, что подавление потребления кислорода как в мозге, так и в печени значительно более рельефно выявляется в опытах с  $\alpha$ -кетоглутаратом. В последующие сроки эксперимента наблюдается градуальное восстановление способности митохондрий к сопряженному фосфорилированию. При этом дыхательная активность их проявляет тенденцию к нормализации в более поздние сроки опыта, чем процесс фосфорилирования НФ. Тем не менее даже на 60-й день после тиреоидэктомии как количество потребляемого митохондриями кислорода, так и убыль НФ не достигают контрольного уровня. Особенно медленно восстанавливается процесс эстерификации НФ.

Наконец, цифры, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что в скорости восстановления фосфорилирующего окисления в митохондриях изученных нами тканей имеется и некоторое органическое различие: процесс утилизации НФ в присутствии  $\alpha$ -КГ в митохондриях печени во все сроки эксперимента протекает более интенсивно, чем в соответствующих органах мозга.

Изменения в количестве потребляемого кислорода, а также в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга и печени, в частности эстерификации НФ, наблюдаются и в модели гипотиреоза, индуцированного медикаментозно. Однако здесь на 15-й день после начала скормливания мерказолила потребление кислорода митохондриями печени и мозга не только не снижается, но и, наоборот, несколько активируется, особенно в опытах с  $\alpha$ -КГ. В последующие сроки эксперимента наблюдается некоторое подавление дыхания митохондрий мозга и печени. Что касается динамики изменений эстерификации НФ в различные сроки скормливания мерказолила, то на 15-й день на фоне некоторого усиления процесса потребления кислорода вопреки ожиданиям утилизация НФ как в митохондриях мозга, так и в митохондриях печени заметно ослабевает. В более поздние сроки опыта отмечается

Таблица

Поглощение кислорода и убыль неорганического фосфата (НФ) в митохондриях мозга и печени при первичном экспериментальном гипотиреозе, индуцированном субтотальной тиреоидэктомией и скормливанием мерказолила. Жмотомы на пробу

Субстраты	Контроль			Дни экспериментов								
				15-й			30-й			60-й		
	ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O
М о з г												
α-КГ	4,17±0,2	12,86±0,1	2,75	—	—	—	—	—	—	—	—	—
α-КГ (тиреоидэктомия)	—	—	—	3,6±0,01	0,6	0,17	3,2±0,2	1,9±0,04	0,6	4,3±0,07	3,59±0,06	0,83
сукцинат	5,78±0,15	9,59±0,2	1,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
сукцинат (тиреоидэктомия)	—	—	—	2,45±0,1	0,3	0,12	3,5±0,09	1,7±0,01	0,5	4,8±0,15	3,76±0,09	0,78
α-КГ (мерказолил)	—	—	—	5,6±0,1	9,2±0,2	1,64	4,2±0,1	2,3±0,1	0,54	3,7±0,07	0,40±0,01	0,1
сукцинат (мерказолил)	—	—	—	6,3±0,06	8,6±0,1	1,36	4,7±0,1	1,9±0,1	0,4	4,9±0,1	0,8±0,01	0,16
П е ч е н ь												
α-КГ	4,19±0,17	10,43±0,1	2,48	—	—	—	—	—	—	—	—	—
α-КГ (тиреоидэктомия)	—	—	—	3,2±0,07	0,9	0	3,0±0,1	1,8±0,06	0,5	4,0±0,04	6,2±0,1	1,55
сукцинат	5,52±0,15	9,44±0,2	1,71	—	—	—	—	—	—	—	—	—
сукцинат (тиреоидэктомия)	—	—	—	2,35±0,1	0,7	0	3,4±0,06	1,6±0,01	0,47	4,5±0,05	3,65±0,2	0,81
α-КГ (мерказолил)	—	—	—	5,0±0,1	8,7±0,12	1,74	3,9±0,16	2,0±0,07	0,51	3,2±0,1	0,6	0
сукцинат (мерказолил)	—	—	—	5,9±0,08	8,4±0,08	0,42	4,2±0,13	1,3±0,07	0,3	3,8±0,2	0,5	0

более наглядное или же полное ингибирование этого процесса, параллельно со снижением дыхания митохондрий. На 60-й день утилизация НФ почти полностью прекращается, т. е. наступает разобщение окислительного фосфорилирования, в результате чего P/O снижается до нуля.

Динамический контроль уровня общего тироксина в сыворотке крови из обеих подопытных групп и сопоставление полученных при этом показателей с показателями уровня энергопродукции позволили с уверенностью говорить о решающей роли степени гипотиреоидного состояния в разобщении процесса энергопродукции. Так, в опытах со скормливанием мерказолила, когда содержание общего тироксина в сыворотке подопытных животных на 15, 30 и 60-й дни равно соответственно  $8,68 \pm 0,4$ ,  $6,87 \pm 0,4$  и  $5,64 \pm 0,5$  мг% (против  $12,33 \pm 0,07$  мг% в контроле), максимальная степень разобщения окислительного фосфорилирования наблюдается на 60-й день, т. е. когда в сыворотке показатели общего тироксина наиболее низкие.

Что касается тиреодэктомированных животных, то и здесь наблюдается аналогичная закономерность: полное ингибирование процесса утилизации НФ и синтеза АТФ наступает на 15-й день опыта, когда в сыворотке подопытных животных уровень общего тироксина снижается по сравнению с контролем почти в два раза. В последующие сроки (30-й день) количество общего тироксина в сыворотке тиреодэктомированных животных постепенно возрастает, достигая к 60-му дню уровня примерно на 15% ниже контрольного. Соответственно в эти сроки наблюдается градуальное восстановление способности митохондрий к сопряженному фосфорилированию, однако эффект торможения окислительного фосфорилирования снимается лишь частично, и энергетическая эффективность этого процесса продолжает оставаться на низком уровне. Это позволяет предполагать наличие в структуре митохондрий не только функциональных, но и органических нарушений.

Принимая во внимание тесную связь АТФ-азы с механизмом окислительного фосфорилирования, мы задались целью в последующих опытах изучить сдвиги в активности этого комплексного фермента на одной из стадий выраженного проявления разобщающего эффекта гипотиреоза, вызванного субтотальной тиреодэктомией. Полученные результаты показали, что спустя 15 дней после двусторонней субтотальной тиреодэктомии в митохондриях мозга и печени значительно повышается АТФ-азная активность. Это наводит на мысль, что одной из причин разобщения сопряженного фосфорилирования при гипотиреозе является стимуляция митохондриальной АТФ-азы.

Совокупность результатов, полученных в ходе проведенных исследований, позволяет заключить, что при гипотиреозе значительно нарушаются соотношение и взаимосвязь процессов окисления и фосфорилирования как в митохондриях печени, так и особенно мозга. Степень разобщения сопряженного фосфорилирования в митохондриях изучаемых органов находится в прямой зависимости от степени гипотиреоидного состояния.

При гипотиреозе, индуцированном субтотальной тиреоидэктомией, имеют место некоторые органические и субстратные различия в интенсивности восстановления фосфорилирующего окисления в митохондриях печени и мозга: в присутствии  $\alpha$ -КГ процесс эстерификации в митохондриях печени восстанавливается со значительно большей скоростью, чем в аналогичных органоидах мозга.

На фоне бурного проявления эффекта разобщающего действия гипотиреоза (15-й день после тиреоидэктомии) значительно повышается активность митохондриальной АТФ-азы, что может иметь тесную связь с механизмом нарушения сопряженности окисления и фосфорилирования.

Выявленные данные могут иметь практическое значение, в частности для объяснения многообразия клинических проявлений со стороны центральной нервной системы и печени в условиях тиреоидной недостаточности у больных. Они могут внести ясность в понимание патогенетических основ гипотиреоидного состояния и методов лечения его.

Институт биохимии АН АрмССР,  
НИИ общей гигиены МЗ АрмССР

Поступило 8.VIII 1977 г.

**ՕՔՄԻԴԱՑԻՈՆ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՑԻՈՒՄԸ ՈՒՂԵՂԻ ԵՎ ԼՅԱՐԴԻ  
ՄԻՏՈՔՈՆՏՐԻԱՆԵՐՈՒՄ ԷՔՍՊԵՐԻՄԵՆՏԱԼ  
ՀԻՊՈԹԻՐԵՈԶԻ ԺԱՄԱՆԱԿ**

Է. Ի. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Օ. Ի. ՆԱԶԱՐՅԱՆ, Ս. Գ. ՄՈՎՍԻՍՅԱՆ

Նրկկողմանի սուբտոտալ թիրեոէկտոմիայով և մերկազուրի կերակրմամբ առաջացված հիպոթիրեոզի ժամանակ խախտվում են օքսիդացիոն և ֆոսֆորիլացման պրոցեսների կապը և հարաբերությունը, ինչպես ուղեղի, այնպես էլ լյարդի միտոքոնդրիաներում: Հաստատված է, որ ուղեղի կապ գոյություն ունի էքսպերիմենտալ կենդանիների արյան շիճուկում պարունակվող ընդհանուր թիրոքսինի քանակի իջեցման և օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման ճեղքման աստիճանի միջև: Սուբտոտալ թիրեոէկտոմիայի ժամանակ դիտվել է օրգանային և սուբստրատային որոշ տարբերություններ օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման ինտենսիվության մեջ՝ ուղեղի և լյարդի միտոքոնդրիաներում: Ապացուցվել է, որ  $\alpha$ -ԿԳ-ի ներկայությամբ անօրգանական ֆոսֆատի էթերիֆիկացման պրոցեսը լյարդի միտոքոնդրիաներում վերականգնվում է շատ ավելի մեծ արագությամբ, քան ուղեղի համանման կառուցվածքներում:

Պարզվել է, որ հիպոթիրեոզի օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսը ճեղքող ազդեցության բուռն արտահայտման ֆոնի վրա նշանակալից չափերով բարձրացնում է միտոքոնդրիաներում ԱՏՖ-ազային ակտիվությունը, որն, ըստ երևույթին, սերտ առնչություն ունի օքսիդացիոն և ֆոսֆորիլացման համալուծ պրոցեսի խանգարման մեխանիզմի հետ:

Ստացված արդյունքները լույս են սփռում հիպոթիրեոզի ժամանակ ուղեղի և լյարդի կողմից դրսևորվող կլինիկական ախտանշանների մեկնաբանման հարցի վրա և հիմք տալիս բուժական նոր ու ռացիոնալ մեթոդներ որոշելու թիրեոիդային անբավարարության ժամանակ:

# OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIA OF BRAIN AND LIVER DURING EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM

E. I. GASPARIAN, O. I. NASARIAN, S. G. MOVSESSIAN

In animals suffering from experimental hypothyroidism a direct correlation has been established between the reduction of total serum thyroxin and the degree of uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria of brain and liver. Certain organ and substrate differences have been observed on the intensity of the recovery of coupled phosphorylation in mitochondria of the studied organs. Beside an intensive uncoupling effect, hypothyroidism also produces a significant stimulation of mitochondrial ATP-ase activity on the 15-th day of thyroidectomy.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. ГлушакOVA Н. Е., Таранович Г. Л., Лагуто Ф. М. Проблемы эндокринологии и гормонотерапии, 10, 6, 24—27, 1964.
2. Туракулов Я. Х. Вестн. АМН СССР, 8, 28—40, 1969.
3. Туракулов Я. Х., Мирахмедов А. К., Львович Н. А., Хусаинова Ф. Биохимия, 2, 349—355, 1970.
4. Волков М. С., Готов Н. А. Укр. биохим. журн. (на укр. яз.), 40, 431, 1968.
5. Chatagner F., Gautheron D. Biochim., Biophys. Acta, 41, 544—545, 1960.
6. Медведева Г. И. Биохимия, 34, 4, 741—744, 1969.
7. Медведева Г. И. Проблемы эндокринологии, 15, 4, 60—64, 1969.
8. Романов Ю. А., Касавина Б. С., Блохин А. Н., Кремли С. М. Бюлл. экспериментальной биологии и медицины, 62, 10, 95—98, 1966.
9. Алешин Б. В., Демиденко Н. С. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, 30, 5, 31—42, 1953.
10. Brody T. M., Bain J. M. J. Biol. Chem., 195, 685, 1952.
11. Палладин А. В., Кирсенко О. В. Биохимия, 26, 365, 1961.
12. Hogeboom G. H., Schneider W. G., Pallade G. H. J. Biol. Chem., 172, 619, 1910.
13. Hogeboom H. H., Schneider W. G., Stiebich M. J. J. Biol. Chem., 196, 111, 1952.
14. Lowry H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., J. 162, 421, 1946.
15. Peel J. L., Lohman B. C. Biochem. J. 65, 709, 1957.