

50. S. Watson, C. Remon. *Science*, 163, 693, 1969.
51. C. Williams. *Phil. Mag.*, 32, 313, 1975.
52. J. Wilschut, J. Regts, H. Westernberg, G. Scherphof. *Biochim. Biophys. Acta* 508, 185, 1978.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 7, 1985

УДК 66—577.125.616.3661

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И ОБМЕН ФОСФОЛИПИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

К. Г. АДОНИЦ, К. Г. КАРАГЕЗЯН, Л. М. ОВСЕПЯН, И. Р. СААКЯН,
Т. Д. КАРАПЕТЯН, Э. К. ЗАХАРЯН

Изучены фосфолипидный спектр мембран митохондрий и процессы окислительного фосфорилирования при аллоксановом диабете у крыс. Показано увеличение индивидуальных фосфолипидов во внутренней и уменьшение их количества в наружной мембранах. Отмечено нарушение процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, коррелирующее с тяжестью протекания диабета.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, фосфолипиды, дыхание и окислительное фосфорилирование.

Как известно, при дефиците инсулина наблюдается нарушение содержания компонентов цикла Кребса и обмена фосфолипидов в тканях [17]. Это наиболее отчетливо проявляется при диабетических изменениях фосфолипидного состава крови и тканей [2—4], ферментных систем начальных этапов фосфатидогенеза [1, 5], жирнокислотного состава фосфолипидов [3], связанного со свободнорадикальным перекислением последних [6, 7].

Показано, что мембранные фосфолипиды участвуют в рецепции гормонов, переносе субстратов, в межклеточных и субклеточных взаимодействиях, поэтому незначительные отклонения в их составе, содержании или обмене отражаются на функционировании клетки [13].

Фосфолипидам придается большое значение в регуляции активности ферментных систем дыхательной цепи, встроенных в мембрану митохондрий (Мх): цитохромс-оксидазы, сукцинатдегидрогеназы, НАД-зависимой дегидрогеназы [10, 14].

Однако до настоящего времени нет четкого представления о взаимосвязи между изменениями мембранных фосфолипидов и процессами окислительного фосфорилирования Мх различных органов и тканей при диабете, что в значительной степени обусловлено отсутствием комплексности при изучении этих процессов при данной патологии. Установление такой взаимосвязи может иметь важное значение для выяснения механизмов развития патологии и отработки способов ее терапии.

Материал и методика. Исследования проводили на беспородных крысах обоего пола массой 150—200 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Аллоксановый диабет вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана (15 мг на 100 г массы тела) [14].

Животные отбирались в опыт по истечении 20 дней после введения аллоксана и стабилизации гипергликемического эффекта на уровне 280—300 мг %.

При изучении окислительного фосфорилирования животные были распределены в зависимости от уровня сахара в крови в следующие группы: ДI—диабет средней тяжести (8 крыс)— 350 ± 50 мг %, ДII—тяжелый диабет (7 крыс)— 550 ± 80 мг %.

В качестве контроля использовали интактных животных (15 крыс), у которых уровень сахара в крови в среднем составлял 100 ± 20 мг %. Мх печени выделяли обычным методом дифференциального центрифугирования в среде, состоящей из 0,25 М сахарозы и трис-НСI буфера (рН 7,4) [18]. Для измерения дыхательной и фосфорилирующей активности их инкубировали в среде следующего состава (мМ): сальпроза—100, K_2HPO_4 —15, трис-НСI—1,5 (рН 7,45), КСI—60. Скорости дыхания регистрировали в следующих метаболических состояниях: V_2 —состояние покоя в присутствии субстрата окисления; V_3 —состояние работы под воздействием АДФ (200 мкМ); V_4 —отрегулированное состояние; V_P —состояние разобщенного дыхания в присутствии 2,4-ДНФ (30 мкМ).

В качестве субстратов окисления использовали янтарную кислоту (ЯК—1 мМ), глутаминовую кислоту (ГЛ—6 мМ), а также комплекс ЯК+ГЛ (3 мМ). При регистрации дыхания в присутствии ГЛ к Мх последовательно добавляли АДФ, ЯК и ДНФ. Рассчитывали дыхательный контроль (ДК) по Чаусу и определяли время фосфорилирования АДФ (ТФ). Полученные данные выражали в нг атомов кислорода в сек на мг белка. Белок Мх определяли методом Лоури [16].

Фракционирование индивидуальных фосфолипидов проводили методом одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля марки КСК с использованием системы растворителей хлороформ—метанол—аммиак, 65:35:5. Фосфолипидные пятна идентифицировали с помощью соответствующих свидетелей. Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде 72%-ной хлорной кислоты, а его количество выражали в мкг на 1 мг сухого остатка соответствующей фракции [19]. Выделение митохондриальных мембран осуществляли с помощью осмотического шока в дистиллированной воде с последующим выдерживанием в холодильнике в течение 12 ч при 0°C. В дальнейшем митохондриальную взвесь фракционировали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы при 15000 г [19]. Морфологический контроль чистоты полученных мембран проводили с помощью электронной микроскопии. Статистическую значимость результатов исследований оценивали методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Мх печени контрольных животных характеризуются как прочно сопряженные: умеренные скорости потребления кислорода сопровождаются четким чередованием метаболических состояний под действием АДФ и ДНФ, выраженными показателями ДК.

Нитеисивность окисления ЯК, добавленной или одновременно с ГЛ, или после протекания цикла фосфорилирования АДФ в присутствии ГЛ, практически не отличалась от таковой при окислении только ЯК (табл. 2, 3).

Введение аллоксана вызывало у животных ДI группы активацию дыхания покоя в присутствии ЯК и ЯК+ГЛ по сравнению с контрольными крысами на 46 и 45% соответственно (табл. 1, 2). Скорости дыхания в состоянии V_2 при окислении указанных субстратов у животных ДII группы сходны с контрольными скоростями. При окислении ЯК у животных ДI и ДII скорости активного дыхания снижены на 23 и 53,5%, а при окислении ЯК+ГЛ—на 13 и 54% соответственно.

Таблица 1

Показатели дыхательной и фосфорилирующей активности митохондрий печени в норме и при аллоксановом диабете (субстрат—сукцинат), $\mu\text{г-ат О/сек. мг белка}$

Показатели Группы	V_2	V_3	V_4	V_p	ДК	$\Gamma_{\text{фосф.}}$
Контроль	1.35 ± 0.11	4.15 ± 0.35	1.39 ± 0.11	6.41 ± 0.33	2.97 ± 0.12	15 ± 1.21
Средний диабет Р	1.97 ± 0.15 <0.02	3.2 ± 0.28 <0.1	2.02 ± 0.25 <0.1	3.44 ± 0.17 <0.001	1.50 ± 0.25 <0.001	26 ± 1.31 <0.001
Тяжелый диабет Р	1.46 ± 0.11 >0.5	1.93 ± 0.15 <0.001	1.58 ± 0.18 >0.5	1.91 ± 0.16 <0.001	1.07 ± 0.09 <.001	47 ± 2.32 <0.001

Таблица 2

Показатели дыхательной и фосфорилирующей активности митохондрий печени в норме и при аллоксановом диабете (субстрат—сукцинат+глутамат), $\mu\text{г-ат О/сек. мг белка}$

Показатели Группы	V_2	V_3	V_4	V_p	ДК	$\Gamma_{\text{фосф.}}$
Контроль	1.34 ± 0.10	3.99 ± 0.15	1.32 ± 0.05	1.6 ± 0.65	3.00 ± 0.22	14 ± 0.99
Средний диабет Р	1.91 ± 0.095 <0.01	3.46 ± 0.19 <0.1	2.28 ± 0.047 <0.001	4.4 ± 0.160 <0.001	1.52 ± 0.09 <0.01	25 ± 1.25 <0.001
Тяжелый диабет Р	1.38 ± 0.15 >0.5	1.84 ± 0.15 <0.001	1.58 ± 0.058 <0.02	2.09 ± 0.155 <0.001	1.1 ± 0.21 <0.001	45 ± 2.35 <0.001

Показатели дыхательной и фосфорилирующей активности митохондрий печени
в норме и при аллоксановом диабете (субстрат—глютамат). мг-ат О/сек. мг белка

Таблица 3

Показатели Группы	Гл					ЯК					
	V _o	V ₂	V ₄	ЛК	T _{фосф.}	V _{як}	V ₂	V ₄	V _p	ЛК	T _{фосф.}
Контроль	0.80±0.09	2.13±0.05	0.87±0.09	2.54±0.22	22±1.9	1.82±0.05	4.1±0.054	1.63±0.03	5.09±0.22	2.71±0.61	23±1.9
Средний диабет р	0.80±0.095	0.92±0.049 <0.001	0.92±0.02 >0.5	1±0.09 <0.001	50±2.1 <0.001	1.30±0.06 <0.001	1.94±0.063 <0.001	1.45±0.12 <0.25	2.01±0.15 <0.001	1.34±0.20 <0.001	35±1.8 <0.001
Тяжелый диабет р	1.01±0.021 <0.05	1.04±0.021 <0.001	1.04±0.021 0.1	1±0.09 <0.001	50±1.91 <0.001	1.27±0.031 <0.001	1.86±0.055 <0.001	1.42±0.09 <0.1	1.99±0.17 <0.001	1.31±0.22 <0.001	38±1.94 <0.001

Содержание фосфора в митохондриях и их мембранах при аллоксановом диабете,
мкг на 1 мг сухой фракции суммарных и индивидуальных фосфолипидов

Таблица 4

Показатели	Митохондриальная фракция		Наружная мембрана митохондрий		Внутренняя мембрана митохондрий		
	контроль	диабет	контроль	диабет	контроль	диабет	
Неидентифицированные фосфолипиды р	1.33±0.09	2.18±0.09 <0.001	1.26±0.06	0.71±0.02 <0.001	1.08±0.06	1.92±0.20 <0.01	
Лизофосфатиды р	1.23±0.03	2.43±0.04 <0.001	1.43±0.09	2.10±0.09 <0.001	0.69±0.02	1.35±0.13 <0.001	
Сфингомиелины р	2.21±0.08	3.06±0.07 <0.001	2.07±0.01	0.96±0.09 <0.001	1.19±0.05	2.12±0.21 <0.01	
Фосфатидилхолины р	3.68±0.11	4.53±0.12 <0.002	3.51±0.15	1.43±0.08 <0.001	2.82±0.08	3.45±0.15 <0.01	
Фосфатидилсерины р	1.83±0.12	3.78±0.09 <0.001	1.74±0.06	1.13±0.05 <0.001	1.38±0.04	3.38±0.15 <0.001	
Фосфатидилэтаноламины р	2.02±0.06	3.23±0.12 <0.001	1.29±0.09	1.05±0.04 <0.5	2.42±0.13	3.80±0.19 <0.001	
Кардиолипиды р	2.95±0.13	3.97±0.12 <0.001	1.73±0.10	1.27±0.09 =0.01	2.56±0.13	4.34±0.25 <0.001	
Общее количество		15.25	23.18	13.03	8.75	12.14	20.36

Скорость дыхания отрегулированного состояния у животных Д1 группы при использовании ЯК увеличивается на 42%, у животных ДII группы изменяется незначительно, при окислении ЯК+ГЛ увеличивается на 72 и 20% соответственно.

Скорость разобщенного дыхания у животных ДI и ДII групп угнетается на 44 и 70%, а при использовании ЯК+ГЛ—на 28 и 66% соответственно. Изменение скоростей дыхания сопровождается снижением показателей эффективности фосфорилирования, о которых судили по величинам ДК и Тф, по мере нарастания тяжести патологического процесса ДК уменьшается по сравнению с нормой на 50 и 64%, параллельно удлиняется Тф от 14—26" до 45—17" у животных ДI и ДII соответственно.

Как показано в табл. 3, при окислении НАД-зависимого субстрата ГЛ выявлено снижение V_2 только при тяжелой форме диабета, тогда как состояние активного дыхания характеризуется падением потребления O_2 на 58% у животных ДI группы, а у животных ДII нарушается на 51%. Последовательное добавление ЯК приводит лишь к усилению скоростей дыхания, не способствуя повышению эффективности процессов окислительного фосфорилирования.

В табл. 4 приводятся результаты сравнительного анализа спектров фосфолипидов мембран Мх. Введение аллоксана сопровождается заметным увеличением количества фосфолипидов внутренней мембраны с 12,44 до 20,36%, из индивидуальных фосфолипидов лизофосфатиды увеличились на 95%, фосфатидилсерин на 144%, сфингомиелины на 78% и т. д.

В наружной мембране наблюдается противоположная картина: суммарное количество фосфолипидов снижается с 13,03 до 8,75%, в частности, лизофосфатиды понизились на 60%, сфингомиелины на 54%, монофосфоинозитиды на 44% и т. д.

Как было отмечено выше, фосфолипидам придается большое значение как факторам, участвующим в регуляции активности ферментных систем дыхательной цепи. Особое внимание уделяется кардиолипинам, и если фосфатиднахолин и фосфатидилэтаноламин сравнительно легко удаляются из Мх и состава оксидоредуктаз, то кардиолипины, напротив, оказываются прочно связанными с ними и не удаляются даже под воздействием сильных органических растворителей [10, 11]. Показано, что отщепление кардиолипидов сопровождается торможением активности цитохромоксидазы, они необходимы также для стабилизации и активности сукцинатдегидрогеназы, функционирования глутаматдегидрогеназы, для структурной организации НАДН-дегидрогеназы [14]. Кроме того, Мх содержат полный набор ферментов для синтеза кардиолипина [9].

Выявленное нами увеличение количества фосфолипидов во внутренней мембране, видимо, связано с перераспределением фосфолипидного пула, ибо известно, что между микросомами, в которых синтезируются фосфолипиды, и мембранами Мх происходит постоянный обмен, осуществляемый без нарушения целостности мембран [20]. Обнаруженное

нами увеличение в 1,5 раза количества кардиолипидов, очевидно, направлено на поддержание работы Мх при диабете.

В условиях малоэффективной работы цикла Кребса при данной патологии в связи с резким ограничением потребления основного субстрата окисления—глюкозы накопление фосфолипидов, вероятно, сопровождается одновременным и интенсивным вовлечением их в тканевые окислительные процессы в качестве потенциальных источников энергии. Дефицит глюкозы приводит к повышенному сгоранию липидов с поступлением в цикл Кребса большого количества ацетил-КоА (Ац-КоА). Избыток Ац-КоА влияет на тканевые регуляторные системы. Во-первых, происходит торможение декарбоксилирования пирувиноградной кислоты [12], в результате чего Ац-КоА, образующийся из липидов, перекрывает поток Ац-КоА, источником которого являются углеводы. Во-вторых, увеличение этого ацтла в совокупности с появлением другого ацила—пропионил-КоА (за счет окисления жирных кислот) приводит к появлению малонил-КоА и метилмалонил-КоА, легко переходящих в сукцинил-КоА, который выступает в роли энергетического субстрата. Действительно, в условиях данной патологии ЯК имеет преимущество перед ГЛ как энергетически более выгодный субстрат окисления. Усиленный липолиз, кроме того, ведет к росту уровня восстановленных пиримидиннуклеотидов, что в свою очередь затрудняет окисление ГЛ, способствуя преимущественному окислению ЯК по сравнению с НАД-зависимыми субстратами, что подтверждается данными настоящей работы.

Однако, несмотря на избыток энергетических метаболитов, в результате усиленного окисления последних в клетке накапливаются недоокисленные продукты, протоны, развивается гипоксическое состояние. Поток водородов и электронов перекрывает окислительные возможности дыхательной цепи [8]. Более того, при диабете имеет место активация перекисного окисления липидов в мембранных структурах Мх с последующим нарушением в них липид-липидных и липид-белковых взаимодействий [7].

Весь этот комплекс метаболических сдвигов ведет к нарушению обменно-структурных особенностей Мх, проявляющемуся в снижении скоростей активного и разобщенного дыхания, падении ДК, изменении Тф, что свидетельствует о торможении АТФ-синтезирующей функции Мх. По мере усиления патологического процесса происходит углубление указанных нарушений.

Таким образом, можно полагать, что изменения, происходящие в энергетических процессах печени при диабете, обусловлены молекулярными повреждениями, имеющими в своей основе нарушение взаимодействий между фосфолипидами и белками мембран, глубина и характер которого коррелируют с тяжестью заболевания.

ՈՔՍԻԴԱՏԻՈՆ ՅՈՍՅՈՐԻՍՑՄԱՆ ԵՎ ՅՈՍՅՈՐԻՊԻԳՆԵՐԻ ՓՈՆԱՆԱԿՄԱՆ
ՈՒՍՈՐԿՆԱՍԻՐՈՒՄԸ ԼՅԱՐԻԻ ՄԻՏՈՔՈՆԿԵՐԻԱՆՆԵՐՈՒՄ
ԱՂՔՍԱՆԱՅԻՆ ՇԱՔԱՐԱՍԻՏԻ ԺԱՐՄԱՆԱԿ

Կ. Գ. ԱԴՈՆՏ, Կ. Գ. ԿԱՐԱԳԵՅԱՆ, Լ. Մ. ՕՎՍԵՊՅԱՆ,
Ի. Բ. ՏԱԿՅԱՆ, Տ. Դ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Է. Կ. ՉԱԿԻԱՐՅԱՆ

Ռեսուլտատները են միտոքոնդրիաների թաղանթների ֆոսֆոլիպիդային ապակտորը և օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսները առնետները մոտ ալտր-ստանդարտի շաքարախտի ժամանակ: Հայտնաբերվել է ինդիվիդուալ ֆոսֆոլիպիդների ավելացում՝ ներքին և նրանց քանակի նվազեցում՝ արտաքին թաղանթներում: Եզվել է շնտուրված և օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսների խանգարում, որը կոնկրետացվում է շաքարախտի ընթացքի ծանրության հետ:

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AND EXCHANGE
OF PHOSPHOLIPIDS IN THE LIVER MITOCHONDRIA
DURING ALLOXANE DIABETES

K. G. ADONTS, K. G. KARAGEGYAN, L. M. OVSEPYAN,
I. B. SAAKYAN, T. D. KARAPETYAN, E. K. ZAKHARYAN

Phospholipid spectrum of mitochondria membranes and the processes of oxidative phosphorylation during alloxane diabetes of rats are investigated. The individual phospholipids increase in interior membranes and their quantity decrease in external ones are shown. The respiration and oxidative phosphorylation processes disturbance is noted, which is correlated with the diabetes proceed heaviness.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бадалян М. Г., Карагезян К. Г. Изменения активности некоторых ферментов фосфатидогенеза при сахарном диабете. Киев, 1983.
2. Карагезян К. Г. Биолог. ж. Армении, 21, 28, 1968.
3. Карагезян К. Г., Аширханян О. М., Аширханян Л. Т. Вопросы биохимии мала, 7, 150. Ереван, 1972.
4. Карагезян К. Г. Роль фосфолипидов в жизнедеятельности организма. Ереван, 1972.
5. Карагезян К. Г., Вартамян Г. С., Бадалян М. Г. Бюлл. экпер. и биол. мед., 90, 679, 1980.
6. Карагезян К. Г., Вартамян Г. С., Паносян Г. А. Бюлл. экпер. и биол. мед., 92, 35, 1981.
7. Карагезян К. Г., Овсепян Л. М., Адонц К. Г. Вопросы мед. химии, 28, 56, 1982.
8. Кондрашова М. И. Биофизика сложных систем и радиационных нарушений. М., 1977.
9. Ляхович В. В. Научн. докл. высшей школы. Биол. науки, 2, 36, 1976.
10. Awasthi J. C., Chuang E., Keenan E., Crane E. L. Biochem and Biophys Res Commun, 39, 822, 1970.
11. Berezney R., Awasthi J. C., Crane E. L. Bioenergetics, 1, 457, 1970.
12. Bryta J., Laleski J., Kubica A. Acta biochim polon, 21, 159, 1974.
13. Haghes R. C., Sharon N. Nature, 274, 637, 1978.
14. Zahler W. L., Fletscher S. Ibid., 2, 209, 1971.

15. Lazakov V. Proc. Soc. Exptl. Biol., **54**, 411, 1946.
16. Lowry O. H., Rosebough N. J., Farr A. J. J. Biol. Chem., **193**, 265, 1951.
17. Sanadek G., Eder H. A. Amer. J. Med., **66**, 843, 1974.
18. Schnelder W. C. J. Biol. Chem., **170**, 259, 1948.
19. Shanaltman C., Erlich W., Greenwald J. W. J. Cell. Biol., **32**, 719, 1957.
20. Wojtczak L., Brunska J. Zbroyka J. Ibid., **219**, 41, 1971.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 7, 1985

УДК 557.151.05+576.311.347.05

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ КУР ПУРИННУКЛЕОТИДАМИ И НУКЛЕОЗИДАМИ

Г. Г. БАТИКЯН, А. А. СИМОНЯН

Исследовалось действие различных пуридиннуклеотидов и нуклеозидов на активность лактатдегидрогеназы в изолированных митохондриях и цитоплазме мозга и печени кур. Показано, что некоторые пиридиннуклеотиды аденинового, гуанинового и инозинового ряда по-разному действуют на активность НАД- и НАДН-зависимых лактатдегидрогеназ мозга и печени.

Ключевые слова: куры, лактатдегидрогеназа, нуклеотиды, НАД, НАДН

В настоящее время имеется обширный экспериментальный материал, посвященный исследованию кинетики реакций, катализируемых лактатдегидрогеназой (ЛДГ), и действия соединений, являющихся компонентами НАД [9, 10]. Хорошо изучен НАД-связывающий центр ЛДГ [6—8, 12]. Предполагается, что подавление активности ЛДГ нуклеотидами аденинового ряда усиливается по мере приближения структуры ингибиторов к строению молекулы НАД [5]. Определенный интерес представляют данные, касающиеся ингибирующего действия низких концентраций гуанидиннуклеотидов, ИТР и АТР на активность ЛДГ. Выявлено, что в отличие от АТР и ИТР, ГТР и ГДР не способны связываться с активным центром ЛДГ и, следовательно, конкурировать с пиридиннуклеотидами.

В настоящей работе представлены данные о действии некоторых эффекторов пуридиннуклеотидного и нуклеозидного ряда на общую активность ЛДГ в зависимости от использованного кофактора НАД и НАДН в изолированных митохондриях и цитоплазме мозга и печени кур.

Материал и методика. Опыты проводили на мозге и печени половозрелых кур породы леггорн. После декапитации птиц извлекали мозг и печень, гомогенизировали в 0,25 М растворе сахаразы в гомогенизаторе типа Поттера. Дифференциальное центрифугирование проводили по методу Броди и Бебина [7] в модификации Палладина и Кирсенко [4]. Ядерную фракцию печени и мозга осаждали при 900 и 1000 g, а митохондрии—при 9000 и 18000 g соответственно. Выделенные митохондрии разрушали трехкратным замораживанием и оттаиванием для получения растворимой фракции (в тексте она условно названа митохондриями). С этой целью разрушенные оргanelлы центрифугировали при 70000 g, 0—4° в течение 1 часа. Надосадочную жидкость, после осаждения митохондриальной фракции, центрифугировали в тех же условиях для получения цитоплазмы.