

РЕГУЛЯЦИЯ МАЛАТОМ СКОРОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТОВ ДЫХАНИЯ

ЗАГОСКИН П. П., САМАРЦЕВ В. Н.

Государственный медицинский институт, Горький

Основная доля энергии в ткани головного мозга производится за счет митохондриального дыхания, сопряженного с синтезом АТР, при окислении NAD-зависимых субстратов и сукцината, образующихся из глюкозы [1].

Среди NAD-зависимых субстратов, окисляющихся в митохондриях, важная роль принадлежит малату. Этот метаболит, помимо способности окисляться митохондриальной дыхательной цепью, участвует в транспорте восстановительных эквивалентов через малат-аспаратный шунт [2] и активнрует транспорт других NAD-зависимых субстратов, например цитрата [3].

Вместе с тем, остается неизученной возможность регуляции малатом скорости окислительного фосфорилирования при окислении других субстратов в митохондриях мозга.

Целью настоящей работы явилось исследование действия малата на скорость и кинетические показатели окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга при использовании разных субстратов окисления.

Опыты проводили на белых крысах-самцах. Митохондриальную фракцию выделяли из ткани мозга дифференциальным центрифугированием [4]. Среда выделения (в мМ): сахараза—250, трис-НСI—10, ЭДТА—1, рН—7,4. Дыхание регистрировали полярографическим методом с применением открытого платинового электрода сферической формы. Среда инкубации (в мМ): сахараза—250, КСI—15, KH_2PO_4 —20, трис-НСI—5, ЭДТА—0,5, рН—7,4. Субстраты дыхания (в мМ): глутамат—10, сукцинат—5, аскорбат+тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД)—2 и 0,2 соответственно. В опытах с сукцинатом и аскорбатом+ТМФД NADH-дегидрогеназный участок дыхательной цепи ингибировали ротеноном (3 мкМ). Малат, АDP, АТР, 2,4-динитрофенол (ДНФ) в виде водных растворов объемом 0,01 мл добавляли в полярографическую ячейку с помощью микрошприца МШ-10.

Как показано в таблице, добавление в среду инкубации 1 мМ малата приводит к увеличению скорости фосфорилирования АDP (ADP/t) на 45—55% со всеми субстратами. В случае применения сукцината и аскорбата+ТМФД использование малата в качестве субстрата дыхания устранялось ротеноном.

Скорость дыхания в состоянии 3 (V_3) под влиянием малата также увеличивалась, что наиболее отчетливо выявилось в опытах с глутаматом и сукцинатом в качестве субстратов. Малая выраженность последнего эффекта при использовании аскорбата+ТМФД связана,

по-видимому, со значительной долей нефосфорилирующего окисления в состоянии 3, на что указывает относительно низкая величина дыхательного контроля с этим субстратом. Нефосфорилирующее окисление (V_4) со всеми тремя субстратами под действием малата не

Таблица

Влияние малата на скорость дыхания и фосфорилирования ADP в митохондриях мозга при использовании различных субстратов дыхания (концентрация добавленного ADP—300 мкМ, ДНФ—80 мкМ). Скорость дыхания выражалась в нг-атомах O/мин/мг белка, скорость фосфорилирования—в нмоль ADP/мин/мг белка

Субстрат	Исследуемые показатели				
	ADP/t	V_3	V_4	$V_{ДНФ}$	дыхательный контроль
Глутамат	374,4±9,6	86,70±2,04	24,00±1,69	120,40±3,81	3,66±0,28
Глутамат+малат	532,2±44,2*	113,0±6,3*	23,30±1,45	129,1±7,1	4,89±0,36*
Сукцинат	265,2±18,0	84,6±4,4	37,5±1,2	120,80±3,48	2,37±0,14
Сукцинат+малат	383,3±30,5*	103,7±4,4*	40,60±1,97	116,7±4,8	2,69±0,22
Аскорбат+ТМФД	164,0±6,2	131,0±8,2	104,5±6,7	190,7±21,2	1,25±0,025
Аскорбат+ТМФД+малат	253,9±18,5*	148,3±7,5	108,9±4,13	192,8±10,4	1,37±0,024*

Примечание. *—достоверное различие ($p < 0,05$).

изменялась. Дыхательный контроль в присутствии малата проявлял тенденцию к повышению. В то же время малат не влиял на скорость разобщенного ДНФ дыхания ($V_{ДНФ}$).

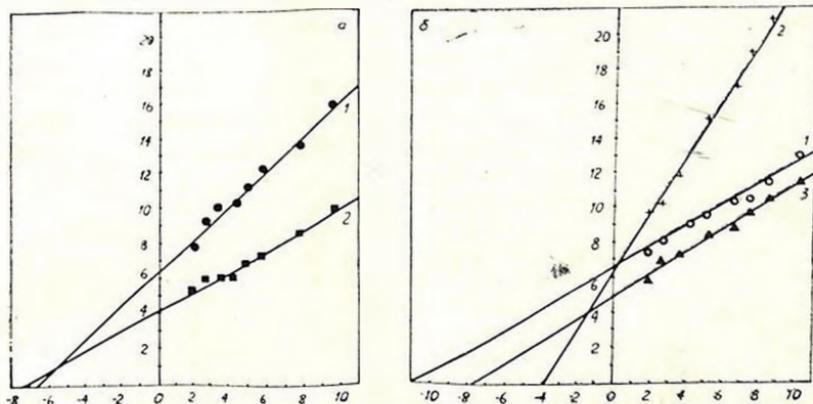


Рис. Влияние малата на кинетику окислительного фосфорилирования. а—глутамат, 10 мМ (1), глутамат, 10 мМ+малат, 5 мМ (2); б—глутамат, 10 мМ (1), глутамат, 10 мМ+АТФ, 2 мМ (2), глутамат, 10 мМ+малат, 5 мМ+АТФ, 2 мМ (3)

Кинетические исследования зависимости скорости фосфорилирования ADP в присутствии и в отсутствие малата показали, что малат значительно повышает величину V без изменения кажущейся K_m для ADP (рисунок, а). Известно, что внемитохондриальный АТФ яв-

ляется конкурентным ингибитором транспорта ADP внутрь митохондрий, осуществляемого адениннуклеотидтранслоказой [5], поэтому избыток АТФ снижает скорость окислительного фосфорилирования [6]. По нашим данным, АТФ повышал кажущуюся K_m для ADP в 3 раза (128 μ М по сравнению с 45 μ М) без изменения V (рисунок б), что свидетельствует о конкурентном ингибировании окислительного фосфорилирования. Добавление малата помимо повышения V , приводило к заметному снижению ингибирующего эффекта АТФ, что выражалось в увеличении K_i с 1,1 до 5,3 мМ. Таким образом, процессы избирательной активации малатом только фосфорилирующего дыхания, не связанного с его окислением, увеличения V кинетики фосфорилирования ADP, а также понижения ингибирующего действия АТФ на этот процесс позволяют предположить, что действие малата при указанных экспериментальных условиях не связано с окислением его как добавочного NAD-зависимого субстрата, а свидетельствует о его регуляторном влиянии на окислительное фосфорилирование.

Среди ферментативных систем, участвующих в регуляции скорости утилизации ADP при окислительном фосфорилировании, ведущее место занимает адениннуклеотидтранслоказа [7—9]. Экспериментально найденный вклад этого переносчика в контроль фосфорилирующего дыхания в зависимости от условий опыта может колебаться от 29 до 50% и более [7, 8]. Теоретически же обосновано, что эта величина может достигать 90% среди всех систем, участвующих в регуляции [9].

Логично предположить, что действие малата направлено именно на переносчик адениннуклеотидов. Есть основания также считать, что *in vivo* малат участвует в регуляции окислительного фосфорилирования в головном мозгу и печени. Значительное повышение его тканевой концентрации при гипоксии [10, 11], физической нагрузке [12, 13] и действии гормонов [14] служит доводом в пользу последнего утверждения.

EFFECT OF MALATE ON THE REGULATION OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN BRAIN MITOCHONDRIA

ZAGOSKIN P. P., SAMARTSEV V. N.

Medical School, Gorky

The effect of malate on the velocity of oxidative phosphorylation in brain mitochondria of rats was studied with glutamate, succinate and ascorbate with TMPD. It was found that malate increases this process regardless of the substrate type and decreases the inhibiting action of ATP on phosphorylation velocity.

The regulatory effect of malate is supposed to be realized through adenine nucleotide translocase.

1. Jung D. W., Brierley G. P. *Handb. Neurochem.*, v. 3, p. 295—319, 1983.
2. La Noul K. F., Schoolwerth A. C. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 48, p. 871—922, 1979.
3. Patel M. S. *Brain Res.*, v. 98, № 3, p. 607—611, 1975.
4. Еуценко Н. Д.—В кн.: Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прохоровой), с. 29—33, ЛГУ, 1982.
5. Klingenberg M. J. *Membrane Biol.*, v. 56, № 2, p. 97—105, 1980.
6. Davis E. J., Davis-Van Thienen W. I. A. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 233, № 2, p. 573—581, 1984.
7. Tager J. M., Wanders R. J. A., Groen A. K., Kunz W., Bohnensack R., Kuster U., Letko G., Böhme G., Duszyński J., Wojtczak L. *FEBS Lett.*, v. 151, № 1, p. 1—9, 1983.
8. Gellerich F. N., Bohnensack R., Wolfgang K. *Biochim. et biophys. acta.* v. 722, № 2, p. 381—391, 1983.
9. Холоденко Б. Н. *Биофизика*, т. 29, № 3, с. 453—458, 1984.
10. Siesjö B. K. *Brain Energy Metabolism*.—John Wiley and sons; (A. Wiley—Interscience Publication), 1978.
11. Хватова Е. М.—В кн.: Дегидрогеназы в норме и патологии (под ред. Е. М. Хватовой), Горький, мед. институт, 1980.
12. Hanson R. D., Gray R. M., Alberti K. G. M. *M. J. Appl. Physiol. Respir. Environ. and Exercise Physiol.*, v. 51, № 5, p. 1326—1330, 1981.
13. Бобылёва-Кварриеро В., Ларди Г. Тезисы докл. XVI Конференции Федерации европейских биохимических обществ, с. 294, М., 1984.
14. Ларди Г., Бобылёва-Кварриеро В. Тезисы докл. XVI Конференции Федерации европейских биохимических обществ, с. 299, М., 1984.

Поступила 11. I 1986.

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «МЕДИЦИНА» готовится к печати в 1987 г. монография
 Хватовой Е. М., Сидоркиной А. Н., Мироновой Г. В. «Нуклеотиды мозга»
 (метаболизм при кислородном голодании). 13 л.

Монография посвящена актуальной проблеме энергетики мозга в норме и при недостатке кислорода. Представлены современные сведения об особенностях обмена, энергетической и регуляторной функции адениновых и гуаниновых нуклеотидов мозговой ткани. Подчеркнута особая роль гуаниновых нуклеотидов. Разобраны обменные преобразования АМР, ферментативные реакции распада этого нуклеотида и роль аденозина в мозговой ткани. Подводятся итоги многолетних исследований энергетики мозга при разных формах кислородной недостаточности. Определяется роль нуклеотидов в оценке тяжести гипоксии мозга.

Книга представляет интерес для нейрохимиков, биохимиков общего профиля, нейрофизиологов, невропатологов, нейрохирургов, психопатологов и других специалистов, интересующихся проблемами метаболизма мозга.