

А. А. Симомян

Влияние липоидо-белковой фракции, выделенной из печени куриного эмбриона, на окислительное фосфорилирование митохондрий

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 20/IV 1965)

Из печени куриного эмбриона удалось выделить отдельную фракцию, 74,5% которой составляют липиды, 25,4% белки и белкоподобные вещества. Выделенная фракция желтого цвета, не растворяется в воде (можно только суспензировать), растворяется в ацетоне, эфире и в других жировых растворителях. По сравнению с другими компонентами гомогената эмбриональной печени, эта фракция легкая и при центрифугировании при 0—3°, 9000×g толстым слоем выделяется на поверхности надосадоочной жидкости.

В печени эмбриона она обнаруживается во второй половине плодной стадии, т. е. с 16—17 дня, сильно увеличивается на 19—21 день и сохраняется на этом уровне у 4—5-дневных цыплят. Количество ее постепенно уменьшается, и у месячных цыплят она не обнаруживается.

Интересно отметить, что окраска печеночной ткани куриного зародыша в течение эмбриогенеза меняется. До 13—14-дневного возраста печень эмбриона имеет такую же окраску, как и у кур, затем она постепенно приобретает желтый оттенок и у 17—18-дневного эмбриона принимает интенсивно желтый цвет, который сохраняется и у 15-дневных цыплят. У месячных цыплят печень принимает свою нормальную окраску. Таким образом, изменение окраски печени эмбриона в течение его развития обуславливается появлением и исчезновением в ней вышеуказанной липоидо-белковой фракции.

С целью выяснения роли этой липоидо-белковой фракции мы поставили перед собой задачу изучить ее влияние на окислительное фосфорилирование митохондрий печени куриного эмбриона. Опыты ставили на эмбрионах кур породы белый леггорн. Для сравнения изучали действие липоидо-белковой фракции также на митохондриях печени кроликов и белых крыс (зрелые животные).

Митохондрии печени выделяли по методу В. П. Скулачева (1). Митохондриальную фракцию инкубировали в течение 1 часа при 26°, в аппарате Варбурга (2). Инкубационная смесь содержала в мкмольях: субстраты окисления — сукцинат или глутамат — 50, фосфата калия —

40. KCl — 100, MgCl₂ — 10, глюкозы — 150, АТФ — 3 и 0,75 мг гексокиназы (Sigma). Митохондрии добавляли в количестве соответствующем 2—3 мг белка. В каждой пробе в реакционную смесь вносили в количестве 7 мг свежую липоидо-белковую фракцию, выделенную из печени эмбриона и суспензированную в 0,25 М сахарозе. Конечный объем инкубационной смеси — 2,4 мл, pH 7,4.

Неорганический фосфат определяли методом Лоури и Лопеза (3). Белок определяли по методу Лоури (4). Количество фосфата и поглощенного кислорода рассчитано на миллиграмм белка.

Проведенные исследования показали, что под действием указанной фракции окислительное фосфорилирование в митохондриях печени эмбриона разобщается, т. е. уменьшается убыль неорганического фосфата, а дыхание усиливается (табл. 1).

Таблица 1

Влияние липоидо-белковой фракции на соотношение окисления и фосфорилирования митохондрий печени куриного эмбриона (субстрат сукцинат)

	Контроль			Липоидо-белковая фракция		
	О мкатома	Р мкатома	Р/О	О мкатома	Р мкатома	Р/О
M ± m	5,62 ± 0,291	8,09 ± 0,515	1,43 ± 0,237	7,91 ± 0,382	5,81 ± 0,113	0,74 ± 0,057
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
T				4,91	4,33	2,90
				P < 0,001	0,005 > P	0,250 > P
					0,001 < P	0,010 < P

Как видно из таблицы, коэффициент соотношения окисления и фосфорилирования в митохондриях печени эмбриона под влиянием этой фракции уменьшился в два раза. Количество фосфата, по сравнению с контролем (пробы без липоидо-белковой фракции), уменьшилось на 2,28 мкатома, а количество поглощенного кислорода, наоборот, увеличилось.

При окислении глутамата в митохондриях печени эмбриона Р/О под действием выделенной фракции снизилось более чем в два раза по сравнению с контролем (табл. 2).

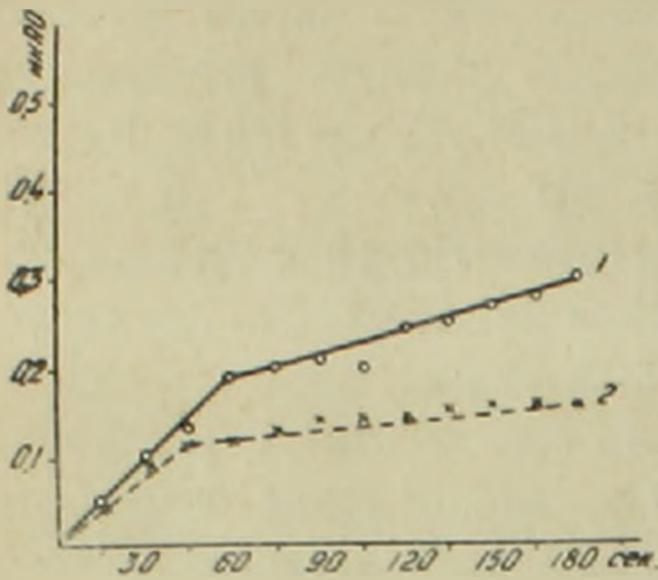
Таблица 2

Влияние липоидо-белковой фракции на окислительное фосфорилирование митохондрий печени куриного эмбриона (субстрат глутамат)

	Контроль			Липоидо-белковая фракция		
	О мкатома	Р мкатома	Р/О	О мкатома	Р мкатома	Р/О
M ± m	2,69 ± 0,211	5,02 ± 0,584	1,82 ± 0,091	3,14 ± 0,068	2,69 ± 0,232	0,84 ± 0,068
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
T				2,00	3,70	9,00
				0,100 > P	0,005 > P	P < 0,001
				0,500 < P	0,001 < P	

Полярнографическое изучение дыхания показало, что в течение первых трех минут инкубации реакционной смеси дыхание митохондрий пе-

чени цыпленка при наличии липоидо-белковой фракции, по сравнению с контрольными пробами, усиливается вдвое (фиг. 1).



Фиг. 1 Полярографическое изучение дыхания митохондрий печени цыпленка и влияние липоидо-белковой фракции на поглощение кислорода (субстрат сукцинат). 1 — Полная инкубационная смесь + липоидо-белковая фракция; 2 — Контроль (полная инкубационная смесь без липоидо-белковой фракции).

В инкубационную смесь входят в мк.мол. ях: сукцината — 25, фосфата калия — 20, KCl — 50, MgCl₂ — 5, глюкозы — 75, АТФ — 1,5 и 0,37 мг гексокиназы. В полярографическую чашку митохондрии добавляли с расчетом на 1—1,5 мг белка. Конечный объем реакционной смеси — 1 мл, инкубирование при 26°.

Исследования показывают, что при тех же условиях опыта под действием липоидо-белковой фракции окислительное фосфорилирование митохондрий кролика (зрелые животные) тоже разобщается, причем более интенсивно (таблица 3). Так, если в контроле P/O составляло 1,12, то при добавлении липоидо-белковой фракции оно снизилось до 0,26 (в 4,3 раза). Сопряженность фосфата уменьшается в 4,5 раза, а дыхание усиливается.

В четвертой таблице приведены данные, показывающие влияние липоидо-белковой фракции на P/O митохондрий печени крыс. В данном случае под действием этой фракции окислительное фосфорилирование также разобщается, при этом в инкубационной среде повышается количество свободного фосфата.

Таблица 3

Влияние липоидо-белковой фракции на соотношение окисления и фосфорилирования митохондрий печени кролика (субстрат сукцинат)

	Контроль			Липоидо-белковая фракция		
	О мккатома	Р мккатома	P/O	О мккатома	Р мккатома	P/O
M ± m	7,16 ± 0,308 (4)	8,02 ± 0,247 (4)	1,12 ± 0,014 (4)	4,00 ± 0,251 (4)	1,13 ± 0,318 (4)	0,26 ± 0,060 (4)
T				8 P < 0,001	17 P < 0,001	11 P < 0,001

Вторая часть работы посвящена изучению действия липоидо-белковой фракции на аденозинтрифосфатазную (АТФ-азную) активность. Для изучения активности фермента брали следующую инкубационную смесь: 1,4 мл 0,25 М сахарозы, 0,2 мл АТФ (20 мг АТФ в 1 мл), 0,2 мл суспензии митохондрий (которая соответствует 1—2 мг белка), и в каждой пробе по 0,2 мл 7 мг липоидо-белковой фракции. Конечный объем смеси — 2 мл, pH 7,4. Инкубацию проводили при 26°. Крите-

рием активности фермента служило увеличение неорганического фосфата в среде после 30-минутной инкубации.

Опыты показывают, что под влиянием липоидо-белковой фракции АТФ-аза печеночных митохондрий эмбриона, по сравнению с контроль-

Таблица 4

Влияние липоидо-белковой фракции на соотношение окисления и фосфорилирования митохондрий печени крысы (субстрат сукцинат)

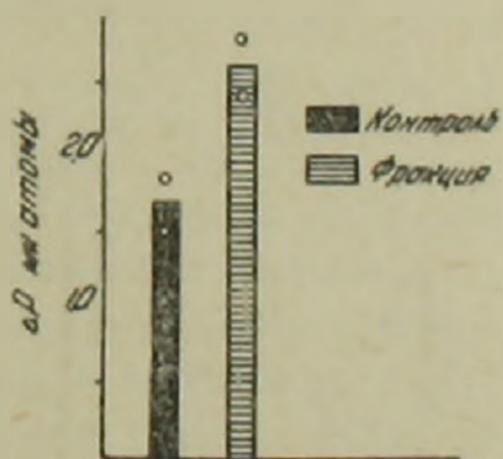
	Контроль			Фракция		
	О мкатома	Р мкатома	Р/О	О мкатома	Р* мкатома	Р/О
$M \pm m$	$3,73 \pm 0,173$	$0,69 \pm 0,041$	$0,19 \pm 0,007$	$3,90 \pm 0,384$	$0,37 \pm 0,042$	—
(n)	(4)	(4)	(4)	(6)	(6)	
(**)	21	17	27	10	9	

* Количество свободного фосфата в инкубационной среде.

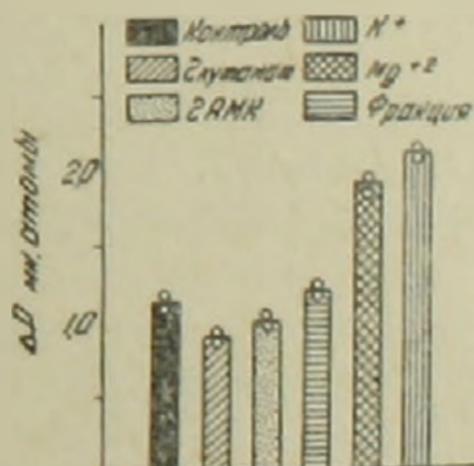
** Статистическая достоверность данного ряда.

ными пробами, активируется почти на 50 процентов (фиг. 2). Больше всех повышается активность АТФ-азы митохондрий печени кроликов. Например, в контрольных опытах под действием фермента количество отщепившегося от АТФ фосфата составляло всего лишь 0,58 мкатома, тогда как при добавлении липоидо-белковой фракции оно достигало 2,19 ($P < 0,001$). Такое повышение активности фермента под влиянием липоидо-белковой фракции наблюдается и в митохондриях печени крысы (фиг. 3).

Для сравнения липоидо-белковой фракции, которая, как показывают наши исследования, является сильным активатором АТФ-азы, мы одновременно изучили и другие активаторы: γ -аминомасляную кислоту (ГАМК), глутамат, K^+ и Mg^{2+} (фиг. 3). В каждой пробе опыта брали в мкмолях: ГАМК или глутамата — 50, KCl — 100 и $MgCl_2$ — 10.



Фиг. 2. Влияние липоидо-белковой фракции на АТФ-азную активность митохондрий печени куриного эмбриона.



Фиг. 3. АТФ-азная активность митохондрий печени крысы и влияние глутамата, ГАМК, K^+ , Mg^{2+} и липоидо-белковой фракции на активность фермента.

Опыты показали, что под действием ГАМК, глутамата и K^+ АТФ-аза печеночных митохондрий кроликов и крыс не активируется.

Влияние Mg^{2+} на активность АТФ-азы в митохондриях кроликов сравнительно слабее, чем у крыс. Эти исследования показывают, что под влиянием липоидо-белковой фракции по сравнению с Mg^{2+} активность фермента митохондрий печени кроликов повышается почти вдвое

Вышеуказанные факты говорят также о том, что АТФ-аза в одной и той же ткани у разных животных проявляет не одинаковые свойства, в пользу этого свидетельствуют и наши прежние исследования по изучению ферментативной активности различных органов цыпленка (5).

Выводы. Проведенные нами исследования показывают, что в печени куриного эмбриона с середины плодной стадии образуется определенная липоидо-белковая фракция, которая сохраняется и у 4—5-дневного цыпленка. Затем ее количество исчезает у цыплят в одномесечном возрасте. По своему химическому составу основную часть этой фракции составляют липиды. При активном действии выделенной фракции окислительное фосфорилирование в митохондриях печени куриного эмбриона разобщается. Такое же влияние оказывает эта фракция и на митохондрии печени кроликов и крыс. Выделенная липоидо-белковая фракция интенсивно активирует АТФ-азу митохондрий печени эмбриона и митохондрий печени кроликов и крыс.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Հավի էմբրիոնի լյարդից անջատված լիպոիդո-սպիտակուցային ֆրակցիայի ազդեցությունը միտոքոնդրիաների օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա

Հավի սաղմի լյարդի հումոդենատը $0-3^{\circ}$ -ի սլայմաններում մինչև $9000 \times g$ արագությամբ ցենտրիֆուգելիս մենք անջատել ենք մի լիպոիդո-սպիտակուցային ֆրակցիա՝ Այդ ֆրակցիան սաղմի լյարդում երևան է գալիս էմբրիոնային պարզացման պտղային շերտանի երկրորդ կետից, այսինքն՝ 16—17-րդ օրից և սկսում է շատանալ 15—21-րդ օրային պահպանվում է նաև ճտի գուրս գալուց հետո մինչև նրա 4—5 օրական հասակը, այնուհետև աստիճանաբար սլակասում է և մեկից մեկ ու կես ամսական ճտերի մոտ իր պատվերանում:

Այդ ֆրակցիայի բիմիական կազմի ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ նրա 74,5% -ը կազմում են լիպիդներ, իսկ 25,4% -ը՝ սպիտակուցներ և սպիտակուցանման նյութեր: Լիպոիդո-սպիտակուցային ֆրակցիայի ազդեցության տակ հավի էմբրիոնի լյարդի միտոքոնդրիաների օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացումը ճեղքվում է՝ էսթերիֆիկացված ֆոսֆատի քանակը սլակասում է, իսկ շնչառությունը ուժեղանում: Այդ ֆրակցիայի համանման ազդեցություն դիտվում է նաև ճագարների և սպիտակ առնետների (հասուն կենդանիների) լյարդի միտոքոնդրիաների վրա: Լիպոիդո-սպիտակուցային ֆրակցիայի մանակցությամբ ինտենսիվ ակտիվանում է ինչպես հավի էմբրիոնի, այնպես էլ ճագարների և սպիտակ առնետների լյարդի միտոքոնդրիաների ազենոպինարիֆոսֆատազան:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Վ Ա Ն ՈՒ Ք Յ ՈՒ Ն

¹ В. П. Скулачев, Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи М., 1962. ² В. В. Умбрейт, Р. Х. Буррис, Дж. Ф. Штауффер, Манометрические методы изучения тканевого обмена, М., ИЛ., 1951. ³ О. Лоури, Ж. Лотез J. Biol. Chem., 162, 42, 1946. ⁴ О. Лоури и др., J. Biol. Chem., 193, 265, 1951. ⁵ А. А. Симонян, «Изв. АН Арм. ССР», сер. биол., 4, 1964.