

УДК 612.822.1

ԲԻՈԲԻՄԻԱ

Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

ՕՔՍԻԴԱՑԻՈՆ ՅՈՍՖՈՐԻԼԱՑԻԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ
 ՈՒՂԵՂԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐԻ ՏԱՐԲԵՐ ՅՐԱԿՑԻԱՆԵՐՈՒՄ

(Ներկայացված է Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս Հ. Խ. Բունյաթյանի կողմից 20/XI 1970)

Այժմ արդեն հաստատվել է, որ դիֆերենցիալ ցենտրիֆուգացման սովորական եղանակով բջջային համոզենատից մեկուսացրած միտոքոնդրիանների ֆրակցիան չի կարելի համարել համասեռ (¹⁻³), ինչպես ցույց են տվել Կաֆֆն ու Շենյոբերը (⁴) և ուրիշ հետազոտողներ, միտոքոնդրիանների ելակետային ֆրակցիան սախարոզայի խտության գրադիենտում ցենտրիֆուգելու դեպքում բաժանվում է մի քանի ենթաֆրակցիանների, որոնք իրարից տարբերվում են ոչ միայն ձևաբանական առանձնահատկություններով, չափերով և խտությամբ, այլև ֆերմենտների սպեկտրների բնույթով, ճազարի սրտամկանի համոզենատից անջատված միտոքոնդրիանների բիոքիմիական անհամասեռությունը ցույց է տրվել Նեյֆախի, Սոնախովի և ուրիշների հետազոտություններում (^{5,6})։ Այդ աշխատություններում հայտնաբերվել է նաև, որ միտոքոնդրիանների տարբեր ֆրակցիաններում սերտ կապ գոյություն ունի մի կողմից զլիկոլիդի խթանող նյութերի արտազատման և մյուս կողմից ադենոզին-և-ֆոսֆատի համադրման միջև։

Նախկինում տարբեր հեղինակների (^{7,8}), ինչպես նաև Աթաբեյովայի և Վեկսլերի (⁹) տվյալներով գլխուղեղից անջատված միտոքոնդրիանները նույնպես իրենցից ներկայացնում են հետերոգեն զանգված, բաղկացած են տարբեր ֆրակցիաններից և օժտված ձևաբանական ու ֆունկցիոնալ տարբեր հատկություններով։ Մեր կողմից (¹⁰) ցույց էր տրվել, որ օնտոգենետիկ զարգացման տարբեր ստադիաներում հավի ուղեղից դիֆերենցիալ ցենտրիֆուգացման եղանակով անջատված միտոքոնդրիանների շորս ֆրակցիանները ԱՏՖ-ֆոսֆոհիդրոլազային, ակտիվության, ինչպես նաև օպտիկական հատկությունների տեսակետից միմյանցից տարբերվում են։

Այս աշխատանքում մեր նպատակն է եղել ուսումնասիրել օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման առանձնահատկությունները հավի սաղմի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիանների տարբեր ֆրակցիաններում 2,4-դինիտրոֆենոլի (ԴՆՖ) ազդեցության տակ նրա օնտոգենետիկ զարգացման ընթացքում։

Փորձերը ղրվել են սպիտակ լեզնորեն ցեղի հավերի սաղմի, ինչպես նաև հասուն հավերի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիանների վրա։ Միտոքոնդրիանների անջատումը կատարել ենք 0—2°-ի պայմաններում Մանդելի և աշխատա-

կիցների ⁽¹¹⁾ մեթոդով 0,25M սախարոզայի և 0,02M տրիս-HCl բուֆերի մեջ (pH-7,4): Լվանալուց հետո միտոքոնդրիաները սուսպենդել ենք վերցված քանակին համապատասխանող նույն լուրությի մեջ (M₀ ֆրակցիա): Ելակետային M₀ ֆրակցիայի հետագա ֆրակցիոնացումը կատարվել է «Lourdes» մարկայի ցենտրիֆուգով (տոտոր՝ 9RA) 0°-ում հետևյալ սխեմայով՝

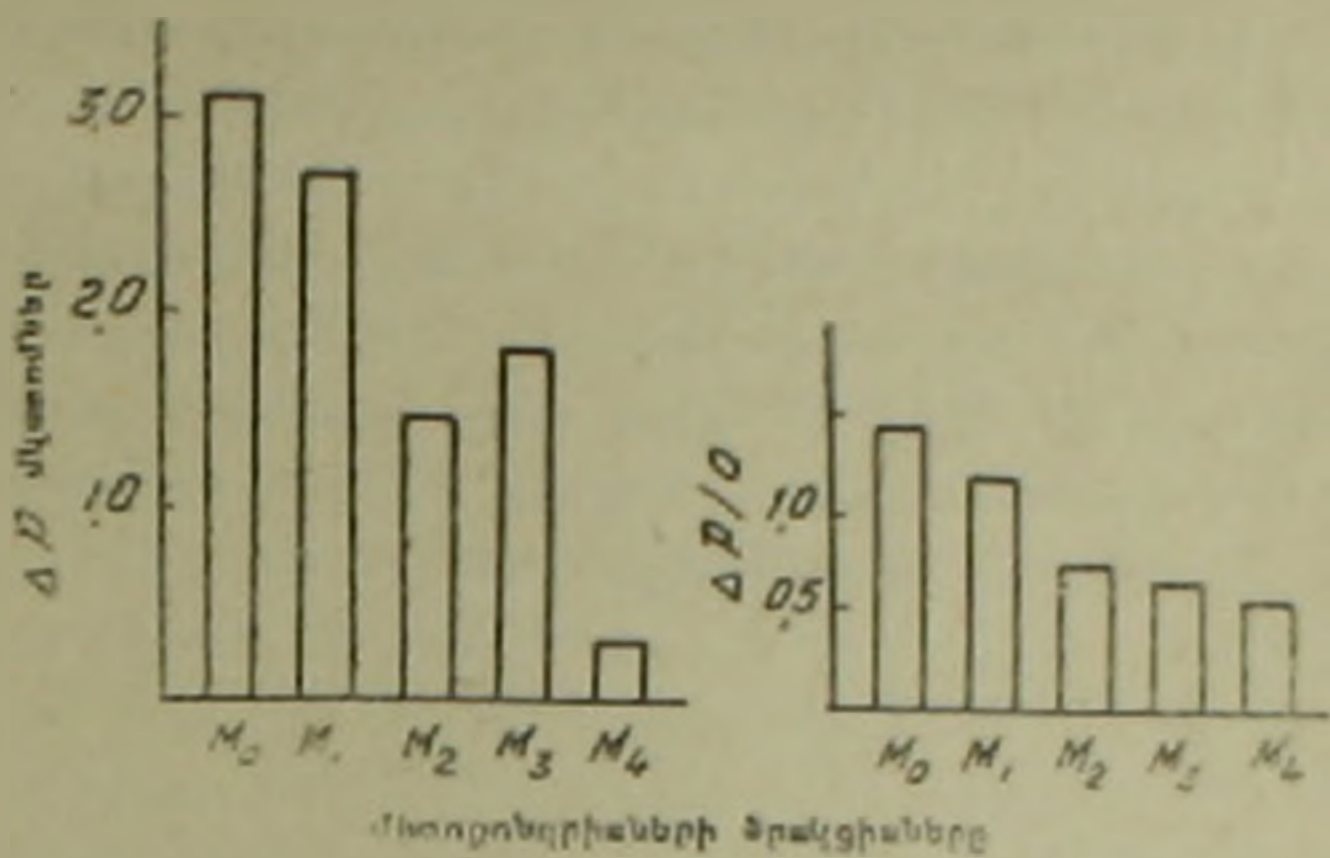
M ₀ ֆրակցիա	
	10000 g. 5 րոպե
Նստվածք (M ₁ ֆրակցիա)	Վերնստվածքային հեղուկ
	23000 g. 5 րոպե
Նստվածք (M ₂ ֆրակցիա)	Վերնստվածքային հեղուկ
	60000 g. 5 րոպե
Նստվածք (M ₃ ֆրակցիա)	Վերնստվածքային հեղուկ
	200000 g. 5 րոպե
Նստվածք (M ₄ ֆրակցիա)	Վերնստվածքային հեղուկ (Խափվել է)

Ստացված միտոքոնդրիաների համապատասխան ֆրակցիաները սուսպենդել ենք 0,25M սախարոզայի և 0,02M տրիս-HCl բուֆերում: Միտոքոնդրիաների մաքրությունը հետազոտել ենք ֆազակոնտրաստային միկրոսկոպով ⁽¹²⁾: Ուղեղի միտոքոնդրիաների շնչառությունը որոշել ենք Վարբուրգի մանոմետրիկ եղանակով: զազային ֆազան եղել է մթնոլորտային օդը: Անօրգանական ֆոսֆատը որոշել ենք լոուրիի և լոպեյի մեթոդով: Ստացված տվյալները հաշվել ենք 1 մգ սպիտակուցի հաշվով, որը որոշել ենք ըստ լոուրիի և աշխ.:

Կատարված հետազոտություններից ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ հավի 13 օրական սաղմի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիաների չորս տարբեր ֆրակցիաներն օժտված են շնչառական տարբեր ակտիվությամբ (աղ. 1): Ելակետային (M₀) ֆրակցիայի համեմատությամբ կլանված թթվածնի քանակն զգալիորեն պակասել է M₄ ֆրակցիայում: Դեֆ-ի ներկայությամբ շնչառության աճը կոնտրոլի (առանց Դեֆ-ի նմուշների) համեմատությամբ M₀ ֆրակցիայում կապվել է մոտ 39, իսկ M₄-ում՝ 47%: Միտոքոնդրիաների մյուս ֆրակցիաներում Դեֆ-ը շնչառությունը չի խթանել և այն մնացել է կոնտրոլի մակարդակին:

Անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացման պրոցեսը համեմատաբար ինտենսիվ ընթացել է M₂ և M₃ ֆրակցիաներում: Այսպես, միտոքոնդրիաների ելակետային (M₀) ֆրակցիայում էսթերիֆիկացված ֆոսֆատի քանակը կազմել է 4,3 մկատոմ 1 մգ սպիտակուցին, իսկ M₂ և M₃ ֆրակցիաներում այն համապատասխանաբար հասել է 5,1 և 5,3-ի: Միտոքոնդրիաների M₄ ֆրակցիայում անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացումը, M₀-ի համեմատությամբ, ավելի դանդաղ է ընթանում: Միաժամանակ աղյուսակում բերված տվյալներից երևում է, որ Դեֆ-ի ներկայությամբ սաղմի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիաների ելակետային, ինչպես նաև մնացած ֆրակցիաներում ան-

որդանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացումը, բացառությամբ M_1 ֆրակցիայի. ճնշվում է, Սակայն ֆոսֆատի էսթերիֆիկացման արգելակումը բոլոր ֆրակցիա



Նկ. 1. էսթերիֆիկացված անօրգանական ֆոսֆատի թանակի և P_2O_5 -ի մեծության տարբերությունը կոնտրոլի համեմատությամբ 'ԻՆՖ' ի ազդեցության տակ չափված 13 սրական սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիանների տարբեր ֆրակցիաներում

Աղյուսակ 1

'ԻՆՖ'-ի ազդեցությունը չափված 13 սրական սաղմի ուղեղի միտոքոնդրիանների տարբեր ֆրակցիաների օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա: Օքսիդացման սուբստրատ՝ սաթաթթու:

$$M \pm n$$

Միտոքոնդրիանների ֆրակցիաները	Կոնտրոլ			ԻՆՖ		
	0	p	P 0	0	p	P 0
M_0	$2,25 \pm 0,01$ (4)*	$4,30 \pm 0,10$ (4)	$1,90 \pm 0,04$ (4)	$3,12 \pm 0,04$ (4)	$1,29 \pm 0,20$ (4) $P < 0,001$	$0,41 \pm 0,07$ (4) $P < 0,001$
M_1	$2,25 \pm 0,03$ (4)	$4,34 \pm 0,18$ (4)	$1,92 \pm 0,08$ (4)	$2,25 \pm 0,04$ (4)	$1,65 \pm 0,28$ (4) $P < 0,001$	$0,72 \pm 0,10$ (4) $P < 0,001$
M_2	$2,33 \pm 0,05$ (4)	$5,10 \pm 0,10$ (4)	$2,19 \pm 0,10$ (4)	$2,51 \pm 0,22$ (4)	$3,66 \pm 0,32$ (4) $P > 0,010$	$1,46 \pm 0,10$ (4) $P < 0,005$
M_3	$2,68 \pm 0,12$ (4)	$5,39 \pm 0,08$ (4)	$2,01 \pm 0,01$ (4)	$2,57 \pm 0,07$ (4)	$3,56 \pm 0,47$ (4) $P < 0,010$	$1,38 \pm 0,14$ (4) $P < 0,005$
M_4	$1,16 \pm 0,07$ (4)	$2,30 \pm 0,09$ (4)	$1,38 \pm 0,25$ (4)	$2,45 \pm 0,22$ (4)	$2,01 \pm 0,04$ (4) $P < 0,025$	$0,82 \pm 0,06$ (4) $P > 0,050$

* Փորձերի թանակը:
 Ինկուբացման տեղությունը 30 րոպե 36°C-ում, մթնոլորտային օդի պայմաններում:
 Ինկուբացիոն խառնուրդը (2 մլ) պարունակել է (մկմոլ-հրաժ)՝ օքսիդացման սուբստրատ՝ սաթաթթու՝ 50, K_2HPO_4 ՝ 40, KCl ՝ 100, $MgCl_2$ ՝ 10, զլյուկոզա՝ 150, ԱՏՖ՝ (Reanal)՝ 3 և 0, 76 մկ բյուրեղական Նեքսոկինազա (Sigma Chemical Co.): Տարբեր ֆրակցիաներից միտոքոնդրիաններն ափսոսաբար են 2-3 մկ սպիտակուցի հաշվով: Ինկուբացիան կանգնեցրել ենք 6 մկ 3,3 % -ոց էոքսիդացախաթթվով:

ներում միանման դինամիկայով չի ընթանում: 1 զծագրում բերված տվյալները ցույց են տալիս, որ M_0 -ից մինչև M_4 ֆրակցիան ԴՆՖ-ի՝ ֆոսֆատի էսթերիֆիկացման պրոցեսը արգելակող հատկությունը օրինաչափորեն թուլանում է: Ինչպես նրանում է բերված զծագրից, օքսիդացման և ֆոսֆորիլացման հարաբերության գործակցի մեծությունը ԴՆՖ-ի ներկայությամբ, կոնտրոլի համեմատությամբ, նույնպես ենթարկվել է նման օրինաչափության:

Շնչառության, օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսներում 2,4-դինիտրոֆենոլի ներկայությամբ վերը բերված տեղաշարժերը որոշ փոփոխություններով երևան են գալիս նաև հասուն հավերի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիանների շորս տարրեր ֆրակցիաներում (աղ. 2):

Աղյուսակ 2

ԴՆՖ-ի ազդեցությունը հասուն հավերի ուղեղի միտոքոնդրիանների տարրեր ֆրակցիաներում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա: Օքսիդացման սուբստրատ՝ սալաթթու: $M \pm m$

Միտոքոնդրիանների ֆրակցիաները	Կոնտրոլ			ԴՆՖ		
	0	P	P/0	0	P	P/0
M_0	1.51 ± 0.03 (6)	3.32 ± 0.57 (6)	2.20 ± 0.28 (6)	1.66 ± 0.10 (6) $P > 0.100$	0.42 ± 0.14 (6) $P < 0.001$	0.25 ± 0.09 (9) $P < 0.001$
M_1	1.64 ± 0.14 (10)	1.56 ± 0.35 (10)	0.95 ± 0.10 (10)	1.23 ± 0.14 (10) $P = 0.100$	0.17^* (10)	—
M_2	1.65 ± 0.09 (5)	2.62 ± 0.30 (5)	1.59 ± 0.30 (5)	1.62 ± 0.07 (8)	0.97 ± 0.18 (8) $P = 0.001$	0.60 ± 0.01 (8) $P > 0.010$
M_3	2.26 ± 0.09 (5)	3.15 ± 0.22 (5)	1.40 ± 0.22 (5)	2.14 ± 0.01 (10)	2.47 ± 0.30 (10) $P = 0.100$	1.15 ± 0.14 (10) $P > 0.400$
M_4	1.93 ± 0.24 (4)	1.72 ± 0.14 (4)	1.12 ± 0.05 (4)	2.49 ± 0.01 (4) $P < 0.005$	1.63 ± 0.17 (4)	0.65 ± 0.08 (4)

* Ազատ ֆոսֆատի բաժանակը:

ԴՆՖ-ը մեղքում է սաղմի. ինչպես նաև հասուն հավերի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիաններում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսը: Սակայն միտոքոնդրիանների տարրեր ֆրակցիաներում պրոցեսը միանման չէ: Հայտնի է, որ միտոքոնդրիաններում օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացումը սերտորեն կապված է ԱՏՖ-ֆոսֆոհիդրոլազայի ակտիվության հետ: Միաժամանակ պարզվել է, որ ԴՆՖ-ը խթանում է ֆերմենտի ակտիվությունը: Կարծիք է հայտնվում, որ այդ գործոնի ազդեցության տակ խթանվում է օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման ենթադրվող որևէ միջանկյալ նյութի քայքայումը (նման արսենատի ազդեցությանը զրիկոլիդի վրա): Լուծիսը և Լիսլմանը (¹³) ցույց են տվել, որ ԴՆՖ-ի ազդեցությամբ քիչներում օքսիդացման և ֆոսֆորիլացման կապակցվածու-

թյունը խախտվում է և միջավայրում խիստ կերպով բարձրանում է ադենոզին-երկֆոսֆատի մակարդակը, որն իր հերթին խթանում է ուղեղի միտոքոնդրիաների շնչառությունը: Մեր փորձերում ԴՆՖ-ի ներկայությամբ զգալիորեն խթանվում է հավի ուղեղի միտոքոնդրիաների ԱՏՖ-ազայի ակտիվությունը (¹⁰): Մակայն այդ ազդեցությունը միտոքոնդրիաների տարբեր ֆրակցիաների ֆերմենտի վրա միանման չէ: Մ₁-ից մինչև Մ₄ ֆրակցիան ԴՆՖ-ի ԱՏՖ-ազան ակտիվացնող հատկությունը ակնառու մեծանում է: Ինչպես երևում է, սաղմի և հասուն հավերի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիաների տարբեր ֆրակցիաներում ԴՆՖ-ի ներկայությամբ օրսիդացիոն ֆոսֆորիլացման ճեղքման տարբեր մակարդակը սերտորեն կապված է ԱՏՖ-ազայի ակտիվ ներգործության հետ: Բերված տվյալները հաստատում են, որ հավի օնտոգենեզում ուղեղի միտոքոնդրիաների տարբեր ֆրակցիաները հետերոգեն են և իրարից տարբերվում են ոչ միայն ֆունկցիոնալ, ձևաբանական և օպտիկական հատկություններով (¹¹), այլև շնչառական թույնների նկատմամբ ունեցած տարբեր ազդեցությամբ: Այդ անհամասեռությունը հավի օնտոգենեզում, ուղեղի զարգացման տարբեր փուլերում ընդհանուր գծերով նույնն է:

Հավական ՍՍՀ գիտությունների ակադեմիայի
բիոբիմիայի ինստիտուտ

А. А. Симонян

Особенности окислительного фосфорилирования в различных фракциях митохондрий мозга

В онтогенезе кур изучалось влияние ДНФ (2,4-динитрофенол) на окислительное фосфорилирование в различных фракциях митохондрий, выделенных из мозговой ткани. Результаты исследований показывают, что четыре фракции (М₁—М₄) митохондрий, выделенных из мозга 13-дневных эмбрионов, а также зрелых кур, обладают различной дыхательной активностью. В присутствии ДНФ дыхание особенно стимулируется в фракции М₄ (20000 g). Во всех выделенных фракциях митохондрий под влиянием ДНФ угнетается процесс эстерификации неорганического фосфата. Однако этот процесс во всех фракциях протекает неодинаково. Результаты исследований показывают (рис. 1), что угнетение ДНФ-ом процесса эстерификации фосфата от фракции М₁ до М₄ постепенно падает. Такая же закономерность наблюдается в величине коэффициента соотношения окисления и фосфорилирования. Вышеприведенные сдвиги в процессах дыхания и окислительного фосфорилирования под влиянием ДНФ у 13-дневных эмбрионов, с некоторыми изменениями, отмечаются также в различных фракциях митохондрий, выделенных из мозговой ткани зрелых кур.

