

Э. Е. МХЕЯН, А. Х. МАШИНЯН

ДЕЙСТВИЕ МОЛИБДЕНА И МЕДИ НА ПРОЦЕСС ДЫХАНИЯ
И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ КРЫС

Изучено действие Mo и Cu на процесс дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях печени белых крыс. Показано, что Mo в количестве 20 и 100 мг/кг живого веса при пероральной заправке в течение 45 дней вызывает заметные нарушения со стороны дыхательной цепи, что проявляется в виде усиления дыхания в присутствии АДФ и подавления эффективности фосфорилирования (коэффициент АДФ/О понижается). Одновременная дача меди в дозе 13 мг/кг веса приводит к нормализации обнаруженных нарушений, подтверждая имеющееся в литературе мнение о благотворном влиянии меди на течение молибденового токсикоза.

В связи с тем, что в Армянской ССР выявлены обогащенные молибденом биогеохимические провинции, большое гигиеническое и токсикологическое значение приобретают исследования, посвященные изучению влияния избыточных количеств молибдена и меди на организм. В литературе имеются данные, свидетельствующие о ряде нарушений со стороны обмена веществ у людей, проживающих в областях с повышенным содержанием молибдена во внешней среде. Установлено, что избыточное поступление молибдена с пищей в организм людей способствует повышению активности ксантиноксидазы, что приводит к увеличению содержания мочевой кислоты в крови, обуславливающей развитие эндемической подагры [6]. Экспериментальные данные, полученные при хроническом отравлении животных, свидетельствуют об угнетении роста и развития костной ткани [10], об усилении выделения меди из организма, в особенности из печени [3, 14], о понижении сульфгидрильных групп крови, способствующем накоплению окисленного глутатиона [2, 15]. О нарушении белкового обмена свидетельствуют отрицательный азотистый баланс, гипопротейнемия и диспротеинемия, наблюдаемые в условиях эксперимента и клиники [2, 20, 21].

Молибденовый токсикоз приводит также к нарушению активности сульфидоксидазы [21, 22], сукциндегидрогеназы [8], холинэстеразы [4], каталазы [2], щелочной фосфатазы печени, почек и костей [10, 24].

В связи с этим было важно изучить состояние генерации энергии в митохондриях печени при молибденовой интоксикации.

В исследованиях использовали митохондрии печени белых крыс весом 150—180 г, находящихся на смешанном питании. Митохондрии

печени выделяли методом дифференциального центрифугирования по Хогбуму и Шнейдеру в 0,25М растворе сахарозы [23]. Дыхание митохондриальной взвеси определяли полярографическим методом [7, 11, 13].

Среда инкубации, примененная нами для митохондрий печени, имела следующий состав: сахароза — 0,25М, KH_2PO_4 — 0,009М, ЭДТА — 0,00025М, трис-НСI буфер — 0,03М (РН=7,4, температура инкубации 26°). В качестве субстратов использовали сукцинат и α -кетоглутарат в количестве 10 мМ на каждую пробу. В качестве акцептора макроэргического фосфата использовали АДФ (фирма «Reanal») в количестве 250 мкМ на каждую пробу. Скорость потребления кислорода митохондриями печени выражали в $\text{мкАО}_2/\text{час}/\text{мг}$ митохондриального белка [5].

Белок определяли по методу Лоури [19]. Эксперименты были проведены на 60 крысах-самцах, которые получали еодные растворы $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и CuSO_4 в количествах, пересчитанных на элементарный молибден и медь из расчета на килограмм живого веса. Все подопытные животные были распределены на 6 групп и соответственно получали: I—Мо в дозе 20 мг/кг, II—Мо в дозе 100 мг/кг, III—Мо—20 мг/кг и Cu—13 мг/кг, IV—Cu в дозе 13 мг/кг, V—Cu в дозе 66 мг/кг ежедневно в течение 45 дней, рег ос при помощи металлического зонда. VI группа микроэлементов не получала и являлась контрольной. Все группы животных находились в одинаковых условиях ухода и содержались на обычном рационе крыс.

Данные о состоянии дыхания и показателей эффективности окислительного фосфорилирования при использовании в качестве субстрата сукцината приведены в табл. 1.

Таблица 1
Влияние Мо и Си на интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс (субстрат—сукцинат)

Контроль	$M \pm m$	Субстратное дыхание	Дыхание в присутствии АДФ	ДК	АДФ/О	Число наблюдений
		$11,24 \pm 0,44$	$23,30 \pm 0,658$	$3,07 \pm 0,053$	$1,69 \pm 0,034$	12
Мо 20 мг/кг	$M \pm m$ Р	$12,31 \pm 0,55$ $>0,1 < 0,2$	$32,89 \pm 0,61$ $<0,001$	$3,22 \pm 0,063$ $>0,5 < 0,1$	$1,34 \pm 0,04$ $<0,001$	14
Мо 100 мг/кг	$M \pm m$ Р	$13,17 \pm 0,68$ $>0,2 < 0,05$	$30,71 \pm 0,714$ $<0,001$	$3,06 \pm 0,075$ —	$1,26 \pm 0,023$ $<0,001$	10
Мо 20 мг/кг Си 13 мг/кг	$M \pm m$ Р	$12,17 \pm 0,53$ $>0,2 < 0,3$	$25,98 \pm 0,804$ $>0,02 < 0,05$	$2,78 \pm 0,043$ $<0,001$	$1,61 \pm 0,044$ $>0,1 < 0,2$	10
Си 13 мг/кг	$M \pm m$ Р	$14,52 \pm 0,74$ $<0,01$	$23,77 \pm 0,81$ $>0,6 < 0,7$	$2,42 \pm 0,0726$ $<0,001$	$1,3 \pm 0,058$ $<0,001$	6
Си 66 мг/кг	$M \pm m$ Р	$9,24 \pm 0,48$ $>0,01 < 0,02$	$13,48 \pm 0,49$ $<0,001$	$1,72 \pm 0,056$ $<0,001$	$1,17 \pm 0,042$ $<0,001$	8

Как видно из таблицы, митохондрии печени контрольных крыс при наличии субстрата поглощают $11,24 \pm 0,44$ $\text{мкАО}_2/\text{час}/\text{мг}$ белка. Добав-

ление АДФ усиливает дыхание почти в 2 раза, при этом дыхательный контроль (ДК) составляет $3,07 \pm 0,753$, а эффективность фосфорилирования, т. е. коэффициент АДФ/О— $1,67 \pm 0,034$, что в основном соответствует литературным данным [1, 9, 18]. У крыс, получавших 20 мг/кг молибдена в течение 45 дней, субстратное дыхание не нарушается, в то время как интенсивность дыхания при добавлении АДФ усиливается на 41% ($32,89 \pm 0,61$ против $23,3 \pm 0,65$ контрольной величины). Одновременно статистически достоверно понижается АДФ/О при неизменной величине дыхательного контроля. Аналогичная картина наблюдается в митохондриях крыс, получавших молибден в количестве 100 мг/кг веса. Однако как показывают данные, приведенные в табл. 1, эффективность фосфорилирования угнетается сравнительно сильнее. Понижение коэффициента АДФ/О при усилении дыхания под действием АДФ, в особенности когда не меняется ДК, свидетельствует о том, что акцепторная роль АДФ не нарушается. Наблюдаемое понижение эффективности фосфорилирования (АДФ/О), по всей вероятности, можно связать с усиленным гидролизом АТФ путем возможной активации АТФ-азной системы или других гидролитических реакций. Известно, что токсическое действие молибдена объясняется обеднением медью тканей организма. С этой точки зрения представляло интерес изучение совместного действия Мо и Си. Результаты, полученные у этой группы животных (табл. 1), показывают, что субстратное дыхание у них почти не нарушается. Не страдает также эффективность фосфорилирования несмотря на некоторое понижение ДК, что, по всей вероятности, является специфическим действием меди. Действительно, в митохондриях печени животных, получавших только 13 мг/кг меди, наблюдается некоторое повышение субстратного дыхания ($14,52 \pm 0,74$ против $11,24 \pm 0,44$ контрольной величины). Одновременно отмечается некоторое угнетение дыхания под действием АДФ и заметное снижение ДК и АДФ/О, т. е. отмечается тенденция к разобщению, что более наглядно проявляется у животных, получавших медь в дозе 66 мг/кг веса. У этой группы животных угнетается субстратное дыхание, резко понижается сродство дыхательной цепи к АДФ, в результате чего понижается ДК и эффективность фосфорилирования АДФ/О ($1,17 \pm 0,042$ против $1,67 \pm 0,034$ контрольной величины). Таким образом, существующее мнение, будто соответствующие количества меди могут сглаживать проявление молибденового токсикоза, нашими данными вполне оправдывается при употреблении в качестве субстрата сукцината.

Однако следует указать на необходимость нахождения правильного соотношения молибдена и меди, о чем свидетельствует действие меди на ДК во взятом нами соотношении.

Иная картина наблюдается при употреблении в качестве субстрата α -кетоглутарата. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что субстратное дыхание у крыс, получавших молибден в дозе 20 мг/кг веса, по сравнению с контролем заметно повышается ($11,79 \pm 0,49$ против $7,045 \pm 0,39$ контрольной величины). Добавление АДФ приводит к

усилению дыхания аналогично контролю, между тем как при субстрате сукцинате добавление АДФ вызывает заметное повышение дыхания, по сравнению с контролем (табл. 1). При заметном понижении АДФ/О ДК достоверно повышается. Интересно, что у крыс, получавших молибден, и при употреблении в качестве субстрата сукцината мы не отмечали существенных изменений со стороны ДК при значительном отклонении со стороны АДФ/О, что, по всей вероятности, является проявлением специфического действия молибдена на дыхательную цепь.

Таблица 2

Влияние Мо и Си на интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс (субстрат — α -кетоглутарат)

		Субстратное дыхание	Дыхание в присутствии АДФ	ДК	АДФ/О	Число наблюдений
Контроль	$M \pm m$	$7,045 \pm 0,39$	$17,04 \pm 0,72$	$2,56 \pm 0,06$	$2,13 \pm 0,077$	12
Мо 20 мг/кг	$M \pm m$ P	$11,79 \pm 0,48$ <0,001	$23,69 \pm 0,72$ <0,001	$2,97 \pm 0,08$ <0,001	$1,625 \pm 0,029$ <0,001	11
Мо 100 мг/кг	$M \pm m$ P	$11,09 \pm 0,5$ <0,001	$19,38 \pm 0,79$ <0,05 >0,02	$2,83 \pm 0,11$ <0,05 >0,02	$1,7 \pm 0,03$ <0,001	11
Мо 20 мг/кг	$M \pm m$ P	$10,55 \pm 0,51$ <0,001	$17,45 \pm 0,67$ —	$2,57 \pm 0,06$ —	$1,62 \pm 0,036$ <0,001	10
Си 13 мг/кг	$M \pm m$ P	$8,18 \pm 0,34$ >0,1 <0,05	$14,64 \pm 0,789$ >0,1 <0,05	$2,08 \pm 0,0045$ <0,001	$1,74 \pm 0,083$ <0,001	9
Си 66 мг/кг	$M \pm m$ P	$10,96 \pm 0,43$ <0,001	$13,96 \pm 0,66$ >0,01 <0,02	$2,005 \pm 0,22$ <0,05 >0,02	$1,75 \pm 0,0746$ <0,01	6

Аналогичная картина наблюдается и при даче молибдена в дозе 100 мг/кг веса, только в данном случае дыхание в присутствии АДФ подавляется более заметно. Интересные данные получены при совместном введении животным молибдена в дозе 20 мг/кг и меди в дозе 13 мг/кг. Как видно из табл. 2, интенсивность дыхания в присутствии АДФ в митохондриях печени этих животных несколько нормализуется ($17,45 \pm 0,67$ против $17,04 \pm 0,72$ контрольной величины), что наблюдается и в отношении ДК. Однако степень фосфорилирования остается при этом низкой. По-видимому, молибденовый токсикоз блокирует 1-й пункт сопряжения, и этот блок сохраняется даже при даче меди. Интенсивность дыхания митохондрий у животных, получавших только медь в дозе 13 и 66 мг/кг, аналогична картине, наблюдаемой при сукцинате, т. е. отмечается почти полное подавление стимулирующего действия АДФ на интенсивность поглощения кислорода, что, естественно, отражается на величинах ДК и АДФ/О.

Таким образом, на основании приведенных данных можно прийти к заключению, что молибденовый токсикоз, вызванный введением вышеуказанных количеств молибдена, приводит к нарушению генерации АТФ.

Выводы

1. Ежедневная затравка молибденом крыс в дозе 20 и 100 мг/кг в течение 45 дней приводит к выраженному подавлению окислительного фосфорилирования.

Соответствующие дозы меди (13 и 66 мг/кг) подавляют субстратное дыхание и понижают выход макроэргов.

2. Одновременная дача меди с молибденом в основном нормализует дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени крыс.

Кафедра общей гигиены,
Кафедра общей и клинической
химии Ереванского медицинского
института

Поступила 17/III 1972 г.

Է. Ե. ՄԵԼՅԱՆ, Հ. Խ. ՄԱՇԻՅԱՆ

ՄՈԼԻԲԴԵՆԻ ՈՒ ՊԴՆՁԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՇՆՁԱՌՈՒԹՅԱՆ ԵՎ
ՕՔՍԻԴԱՑԻՈՆ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՑՄԱՆ ՎՐԱ՝ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ
ՄԻՏՈՔՈՆՈՐԻԱՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ և փ ու մ

Աշխատանքում պոլյարոգրաֆիկ եղանակով հետազոտվել է պղնձի ու մոլիբդենի ազդեցությունը լյարդի միտոքոնդրիաններում շնչառության և օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա:

Փորձերը դրվել են սպիտակ առնետների վրա, որոնց տրվել է մոլիբդեն՝ 20 մգ/կգ, 100 մգ/կգ քաշին և պղնձ՝ 13 մգ/կգ ու 66 մգ/կգ քաշին per oral ճանապարհով, 45 օրվա ընթացքում: Պարզվել է, որ մոլիբդենը խթանում է շնչառության պրոցեսը ԱԴՖ-ի առկայությամբ՝ սուկցինատի օքսիդացման դեպքում (41%-ով՝ ստուգիչ փորձերի համեմատությամբ) և իջեցնում է ԱԴՖ-ի ու թթվածնի հարաբերության գործակիցը (24%-ով՝ ստուգիչի համեմատությամբ): Գրեթե նմանատիպ խանգարումներ շնչառական շղթայի կողմից ներկատվում են, երբ իբրև սուբստրատ օգտագործվում է α -կետոգլուտարատը, սակայն շնչառության և ֆոսֆորիլացման էֆեկտիվության տեղաշարժերը թույլ են արտահայտված:

Հետաքրքիր արդյունքներ են ստացվել մոլիբդենով և պղնձով միաժամանակ թունավորելիս: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ շնչառության ինտենսիվության աճը ԱԴՖ-ի առկայությամբ, ինչպես սուկցինատի, այնպես էլ α -կետոգլուտարատի օքսիդացման դեպքում, նորմալանում է: Նույնը կարելի է ասել և շնչառական ստուգիչի մասին: Սակայն ֆոսֆորիլացման աստիճանը մնում է փոքր-ինչ ցածր թվերի վրա, հատկապես α -կետոգլուտարատի օքսիդացման դեպքում:

Ստացված արդյունքներից կարելի է եզրակացնել, որ մոլիբդենային թունավորման ժամանակ (վերը նշված քանակներով) առաջանում է ԱՏՖ-ի գեներացիայի խանգարում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аветисян Л. А. Дисс. канд. Ереван, 1970.
2. Акопян О. А. Материалы II итоговой научной конференции Института гигиены труда и проф. заболеваний, посвященной вопросам гигиены труда и проф. патологии. Ереван, 1964.
3. Войнар А. И. В кн.: Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека. М., 1953, стр. 71.
4. Григорян М. С. Труды Ереванского зооветеринарного института, в. 26. Ереван, 1964, стр. 35.
5. Дмитриев О. А. Вестник Ленинградского университета, 1966, 9, стр. 79.
6. Ковальский В. В., Яровая Г. А., Шмавов Д. М. Общая биология, 1961, 22, стр. 179.
7. Кондрашова М. Н. В сб.: Структура и функция митохондрий. М., 1967, стр. 120.
8. Малеванная Е. М. Дисс. канд. Киев, 1963.
9. Романова И. Н. Биохимия, 1971, 6, 36, стр. 1119.
10. Скоблин А. П., Белоус А. М. В кн.: Микроэлементы в костной ткани. М., 1968, стр. 35.
11. Соцкий О. П. Дисс. канд. Ереван, 1970.
12. Arrington L. R., Davis G. K. J. Nutrition, 1953, 51, 2, 295.
13. Chance B., Williams G. R. J. Biol. Chem., 1955 (a), 217, 213. J. Biol. Chem., 1955 (b), 217, 409.
14. Dick A. T. Australian Vet. J., 1952, 28, 2.
15. Gray L. F., Daniel L. G. J. Nutrition, 1954, 1, 43.
16. Halverson A. W., Phifer J. H., Monty K. J. J. Nutrition, 1960, 1, 71, 95.
17. Johnson H. Z., Miller R. F. J. Nutrition, 1963, 81, 271.
18. Laudahn Z. Physiol. Chem., 1960, 318, 3—6, 186.
19. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. Z., Rande R. J. J. Biol. Chem., 1951, 193, 1, 265.
20. Miller R. F., Price N. O. Virginia J. Sci., 1957, 8, 266.
21. Mills C. F., Monty K. J. et al. J. Nutrition, 1958, 65, 1, 129.
22. Siegel L. M., Monty K. J., Dick A. T. J. Nutrition, 1961, 74, 2, 167.
23. Schneider W. C., Hogeboom G. H. Ann. Rev. Biochem., 1956, 25, 201.
24. Van Reen R., Williams M. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1956, 63, 1.