

УДК 577.158.4+678.048.4

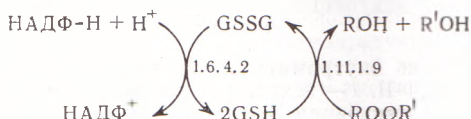
БИОХИМИЯ

А. М. ГЕРАСИМОВ, А. Б. КАПИТАНОВ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО

ОКИСЛЕНИЕ И НАДФ-Н-ЗАВИСИМОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ВНУТРИМИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЛУТАТИОНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 18 VI 1973)

В матриксе митохондрий (м.х.) животных и растительных клеток присутствует фермент глутатионпероксидаза (1.11.1.9), использующий в качестве субстрата H_2O_2 и гидроперекиси органических соединений. Добавление очищенного фермента к суспензии м.х. тормозит индуцируемое глутатионом (GSH) набухание этих частиц ⁽¹⁾, вызывает сокращение набухших м.х. в присутствии АТФ ^(1, 2), повышает фосфорилирующую способность дигитониновых субмитохондриальных фрагментов ⁽³⁾. Наличие глутатионредуктазы (1.6.4.2) в м.х. ⁽⁴⁾ позволяет предполагать существование в них альтернативного пути окисления НАДФ-Н и субстратов НАДФ-зависимых оксидоредуктаз по следующей схеме:



Несмотря на присутствие GSH в м.х. ^(5, 6) возможность функционирования данной ферментной редокс-системы GSH ставилась под сомнение ⁽⁷⁾ и предполагалось, что гидроперекиси липидов, образующиеся во внутренней мембране м.х., разрушаются цитохромами.

Ранее нами было установлено, что в м.х. печени крыс имеется чувствительный к перекисному окислению липидов фонд низкомолекулярных тиолов ⁽⁸⁾. Данная работа доказывает, что наибольшую часть небелковых тиолов м.х. составляет глутатион, восстановление которого при помощи НАДФ-Н или субстратов НАДФ-зависимых дегидрогеназ тормозит перекисное окисление липидов митохондриальных мембран.

М.х. печени крыс выделяли на среде, содержащей 0,3 M сахарозу, 20 mM трис-HCl-буфер (pH 7,5), 1 mM ЭДТА, 0,005% бычий сывороточный альбумин. Определение общих тиолов проводили амперометрическим титрованием ⁽⁹⁾, после инкубации м.х. в течение 2 мин. с 0,1% тритоном X-100. Содержание небелковых тиолов в экстракте разрушенных детергентом м.х. определяли амперометрически ⁽⁹⁾ в 0,1 M трис-HClO₄-буфере (pH 7,5) или с реактивом Элмана ⁽¹⁰⁾ после осаждения белка 0,26 M HClO₄ и нейтрализации раствора. Малоновый диальдегид — продукт свободнорадикального распада перекисей липидов исследовали по Таппел и Залкин ⁽¹¹⁾, белок — методом Лоури с предварительной обработкой м.х. 0,5% дезоксихолатом и 0,1 N NaOH. Концентрация белка м.х. в пробе во всех опытах составляла 4—5 мг/мл. При проведении экспериментов в атмосфере аргона реактивы насыщались инертным газом, и все операции, начиная с экстракции тиолов, проводились в пробирках с притертыми пробками. Использовались реактивы: GSH, глутатионредуктаза, диамид (N,N,N',N'-тетраметилазоформамид), трис-(оксиметил)-аминометан, 5,5-дитиобис-(2-нитробензойная) кислота, бычий сывороточный альбумин фирмы «Calbiochem», изоцитрат фирмы «Nutritional Biochemicals Corporation»,

глутамат фирмы «Chemapol», НАДФ-Н фирмы «Boehringer M.», дезоксихолат фирмы «Merk», тритон X-100 фирмы «Schuchart», остальные — «Решим».

Для идентификации GSH использованы два подхода: 1) окисление внутримитохондриальных низкомолекулярных тиолов диамидом, который, согласно литературным данным, предпочтительно окисляет GSH (¹²), и 2) восстановление окисленных диамидом тиолов безбелкового экстракта м.х. при помощи НАДФ-Н в присутствии дрожжевой глутатионредуктазы, имеющей абсолютную специфичность к GSH (¹³).

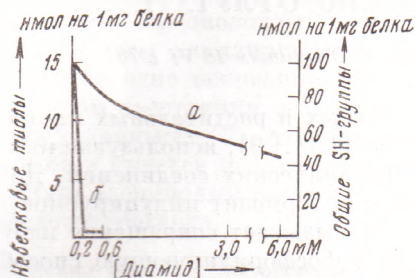


Рис. 1

Рис. 1. Влияние диамида на общие и небелковые тиолы митохондрий печени крыс. Среда инкубации: 0,3 М сахараза, 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА; время инкубации 10 мин., 22°. *а* — общие, *б* — небелковые тиолы

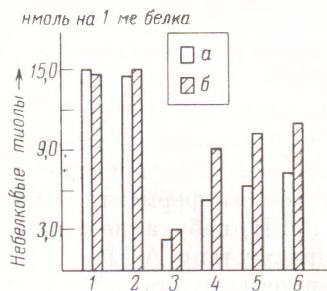


Рис. 2

Рис. 2. Восстановление внутримитохондриальных небелковых дисульфидов экзогенным НАДФ-Н. 1 — исходный уровень (среда инкубации та же, что и на рис. 1); 2 — инкубация 20 мин. с 3 мМ НАДФ-Н; 3 — инкубация 2 мин. с 0,4 мМ диамидом; 4—6 — после диамида добавлен НАДФ-Н и инкубация 5, 10 и 15 мин. соответственно. *а* — инкубация при 22°, *б* — при 30°

Установлено, что в высоких концентрациях диамид эффективно окисляет как небелковые тиолы, так и сульфгидрильные группы белков м.х. печени крыс (рис. 1). Полное исчезновение низкомолекулярных тиолов суспензии м.х. без сколько-нибудь заметного снижения уровня сульфгидрильных групп белков при использовании малых количеств диамида отчасти объясняется способностью данного вещества окислять НАДФ-Н прямым взаимодействием и тем самым исключать глутатионредуктазную реакцию.

Для полного окисления небелковых сульфгидрильных групп м.х. требуется несколько больший избыток диамида по отношению к содержанию митохондриального GSH (5 мол. на 1 моль GSH), чем в случае целых клеток (¹²). Как было показано Косовым и сотрудниками (^{12, 14}), окисление внутриклеточного GSH диамидом и азоэстером приводит к серьезным изменениям структуры мембран и метаболизма клетки, обозначенным авторами как «катастрофа отсутствия GSH». Представляется перспективным применение диамида в качестве окислителя небелковых тиолов как экспериментальный подход для изучения роли GSH в функционировании м.х. Возможность восстановления окисленных диамидом небелковых тиолов при добавлении в среду НАДФ-Н (рис. 2) позволила предположить, что этот эффект опосредован внутримитохондриальной глутатионредуктазной реакцией.

Прямое доказательство присутствия GSH в м.х. было получено при использовании дрожжевой глутатионредуктазы для восстановления низкомолекулярных веществ, экстрагированных из этих субклеточных частиц и окисленных диамидом (рис. 3). Из общего количества небелковых тиолов м.х. печени крыс, составляющего 10—15 нмол. на 1 мг белка, $\frac{2}{3}$ приходится на GSH.

Бефод и Эдин ⁽⁵⁾ и Реджистер с сотрудниками ⁽⁶⁾ не обнаружили изменений уровня GSH во фракции м.х. печени при стрессе или содержании крыс на малобелковой диете. Динамика уровня внутримитохондриального GSH при «окислительном» стрессе до настоящего времени не изучалась. Изложенные ниже результаты исследования взаимосвязи перекисного окисления липидов и ферментной редокс-системы GSH указывают на важную для м.х. метаболическую роль этого трипептида в процессах, сопровождающихся образованием перекисных соединений. Диамид, окисляя GSH, дол-

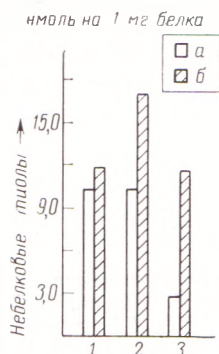


Рис. 3

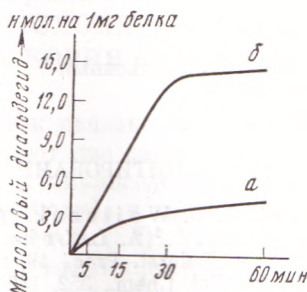


Рис. 4

Рис. 3. Регенерация полностью окисленных диамидом небелковых тиолов экстракта митохондрий при помощи дрожжевой глутатионредуктазы. 1 — исходный уровень тиолов экстракта; 2 — экстракт инкубирован 10 мин. при 22° с 10 мМ НАДФ-Н и 2 ед. глутатионредуктазы; 3 — окисленный диамидом (0,8 мМ) экстракт инкубирован как и в случае 2. а — газовая фаза — воздух, б — аргон

Рис. 4. Влияние диамида на индуцируемое аскорбатом перекисное окисление липидов митохондрий. а — инкубация митохондрий при 30° с 3 мМ аскорбатом, б — до внесения аскорбата митохондрии инкубированы 10 мин. с 0,25 мМ диамидом, пересажены и суспендированы в среде сахара — трис без ЭДТА

жен снижать устойчивость митохондриальных мембран к перекисному окислению липидов. Действительно, в м.х., обработанных диамидом, значительно стимулируется аскорбат-зависимое накопление малонового диальдегида (рис. 4). С другой стороны, индуцируемое Fe^{2+} перекисное окисление ли-

Таблица 1

НАДФ-Н-зависимое восстановление небелковых тиолов митохондрий при перекисном окислении липидов

Добавки	Небелковые тиолы (%) от исходного уровня)	Малоновый диальдегид (нмол/мг)
50 μM Fe^{2+}	47	6,2
+3 мМ НАДФ-Н	76	4,4
+10 мМ изоцитрат	55	4,5
+10 мМ изоцитрат + 1 мМ НАДФ	93	4,4
+10 мМ глутамат	62	4,0
+10 мМ глутамат + 1 мМ НАДФ	82	4,5

Примечание. Инкубация 30 мин. при 30° в среде сахара — трис без ЭДТА.

пидов сопровождается снижением уровня небелковых тиолов м.х. (табл. 1). НАДФ-Н, так же как субстраты НАДФ-зависимых митохондриальных дегидрогеназ, регенерируют GSH посредством глутатионредуктазной реакции. Понижение концентрации малонового диальдегида при этом можно объяс-

нить уменьшением доли перекисей, разрушающихся по свободнорадикальному пути, катализируемому негеминовым железом и гемопротеидами. В системе *in vitro* полному проявлению антиокислительной функции митохондриальной редокс-системы GSH препятствует пространственная разобщенность локализованной в матриксе глутатионпероксидазы и добавленных в среду инкубации инициаторов образования гидроперекисей, наличие мембранного барьера проницаемости для экзогенных субстратов и пиридиннуклеотидов (¹⁵) и низкая, сравнительно со скоростями реакций перекисного окисления, активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ. В клетке восстановление перекисей, образующихся на внешней поверхности мембраны м.х., может осуществляться, вероятно, за счет GSH и ферментов цитозоля (^{16, 17}).

Второй Московский государственный
медицинский институт
им. Н. И. Пирогова

Поступило
15 VI 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. Neubert, A. B. Wojtczak, A. L. Lehninger, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 48, 1651 (1962).
- ² A. L. Lehninger, J. Biol. Chem., 237, 946 (1962).
- ³ A. L. Lehninger, Federat. Proc., 19, 952 (1960).
- ⁴ L. Flohe, W. Schlegel, Hoppe-Seyler's Zs. Physiol. Chem., 352, 1401 (1971).
- ⁵ H. Barford, E. Eden, Austral. J. Exp. Biol., 34, 269 (1956).
- ⁶ D. A. Stoun, R. L. McCartney et al., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 112, 334 (1963).
- ⁷ E. G. Нгусай, P. J. O'Brien, Arch. Biochem. and Biophys., 147, 14 (1971).
- ⁸ Л. Ф. Панченко, А. Б. Капитанов, А. М. Герасимов, IV Международн. Биофизич. конгресс (тез. секц. докл.), М., 1972, IX—XV секции, стр. 67.
- ⁹ Р. Д. Озрина, М. Н. Кондрашова и др., Сборн. Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, «Наука», 1967, стр. 71.
- ¹⁰ J. Sedlak, R. H. Zindsay, Anal. Biochem., 25, 192 (1968).
- ¹¹ A. L. Tappel, H. Zalkin, Arch. Biochem. and Biophys., 80, 326 (1959).
- ¹² T. Zehavi-Willner, E. M. Kosower et al., Biochim. et biophys. acta, 228, 245 (1971).
- ¹³ E. Racker, J. Biol. Chem., 217, 855 (1955).
- ¹⁴ R. Wax, E. Rosenberg et al., J. Bacteriol., 101, 1092 (1970).
- ¹⁵ K. F. La Noue, J. R. Williamson, Metabolism, 20, 119 (1971).
- ¹⁶ C. Little, P. J. O'Brien, Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 145 (1968).
- ¹⁷ R. E. Pinto, W. Bartley, Biochem. J., 112, 109 (1969); 115, 449 (1969).