

УДК 616—001.16:591.104+576.311.347+616.831

## ВЛИЯНИЕ ПЕРЕГРЕВАНИЯ И ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНОЛА НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫС

ШАРОВ А. Н., КОЗЛОВ Н. Б.

Наблюдается снижение показателей окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс при нагревании до теплового удара и особенно в постгипертермическом предагональном состоянии. Предварительное введение ионола нормализует состояние окислительного фосфорилирования при действии высокой внешней температуры.

В работах многих исследователей показаны значительные нарушения белкового, углеводного и липидного обменов в условиях перегревания организма [1—4]. В то же время вопрос об изменении энергетического обмена в этих же условиях во многом еще не выяснен. Существующие данные довольно малочисленны, освещают лишь тот или иной аспект этой проблемы и трудно сопоставимы друг с другом, так как в проведенных экспериментах применялись тепловые нагрузки разной продолжительности и интенсивности [5]. Крайне недостаточно исследовано изменение энергетического обмена в ткани мозга, хотя известно, что ЦНС одной из первых реагирует на действие высокой внешней температуры [6, 7].

В предыдущих сообщениях [8, 9] содержались данные об изменении уровня АТФ, АДФ, АМФ и активности АТФазы в ткани мозга крыс при действии высокой внешней температуры. В настоящей работе приводятся сведения о состоянии окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс при перегревании и предварительном введении ионола—антиоксиданта, повышающего устойчивость организма к действию высокой внешней температуры [2, 4].

### Материалы и методы

Опыты проводились на белых беспородных крысах обоего пола массой 150—200 г. Перегревание животных осуществлялось в термостате при температуре 45° и относительной влажности 30—40%. Ионол (3,5-дитретичный бутил, 4-окситолуол) вводили перорально через зонд в виде 1% раствора в рафинированном подсолнечном масле в дозе 100 мг на 1 кг массы за 18 ч до перегревания. Выделение митохондрий

производили методом дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,0001 М ЭДТА и 0,01 М трис-буфер (pH 7,4). Осадок митохондрий мозга однократно промывали средой выделения. Инкубационная среда pH 7,4 содержала в мМ: глутаминовой кислоты—3 или янтарной кислоты—3; сахарозы—200; KCl—20; фосфата калия—5; ЭДТА—0,4; трис-HCl буфера—10. Скорость дыхания в разных состояниях митохондрий определяли полярографически, используя закрытый электрод типа Кларка. В ячейку со средой инкубации последовательно добавляли суспензию митохондрий, ADP (до конечной концентрации 174 мкМ), 2,4-динитрофенол (ДНФ) (до конечной концентрации 20 мкМ). Из данных полярограммы рассчитывали начальную скорость дыхания ( $V_0$ ), дыхательный контроль по Lardy, Wellman ( $DK_n$ ), дыхательный контроль по Chance, Williams ( $DK_w$ ), коэффициент ADP/O, стимуляцию дыхания 2,4-ДНФ и скорость фосфорилирования. добавки ADP ( $ADP/t$  [10, 11].  $V_0$  выражали в нмоль кислорода /мин/мг белка;  $ADP/t$ —в нмоль ADP/мин/мг белка. Белок определяли по методу Lowry [12]. Полярографические исследования проводили при температуре среды 27°.

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные о состоянии окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга при перегревании крыс, а также в постгипертермическом периоде. Перегревание животных до состояния теплового удара (серия 2) приводило к значительному снижению коэффициента ADP/O и уменьшению скорости фосфорилирования  $ADP/t$ . Если в контроле митохондрии фосфорилировали добавленную ADP со скоростью 86,06 нмоль/мин/мг белка (при использовании в качестве субстрата окисления глутаминовой кислоты), то к моменту развития теплового удара этот показатель снижался до 60,7 нмоль/мин/мг белка. Аналогичные изменения ADP/O и  $ADP/t$  наблюдались и в опытах с применением в качестве субстрата окисления янтарной кислоты.

В литературе неоднократно отмечалось, что после взятия из тепловой камеры перегретых до теплового удара животных через некоторое время у них отмечалось кратковременное улучшение состояния—температура тела снижалась до нормальных величин, были выражены рефлексy. некоторые животные могли двигаться, нормализовалась частота дыхания [13, 14]. В таком постгипертермическом состоянии (серия 3) коэффициент ADP/O вновь повышался до уровня контроля, а показатели дыхательных контролей и скорости фосфорилирования (субстрат окисления—глутаминовая кислота) были даже выше контрольных величин.

При дальнейшем пребывании перегретых животных вне тепловой камеры температура тела их продолжала снижаться и вновь наблюдалось ухудшение состояния: отмечались исчезновение болевого и ротовичного рефлексов, изменение частоты дыхания и т. д. [13], вслед



Таблица 1

Состояние окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс  
при перегревании

| Серия исследований                                                  | Глутаминовая кислота                                                                   |                                                                                        |                                                                                        |                                                                                         |                                                                                          |                                                                                          | Янтарная кислота                                                                       |                                                                                         |                                                                                          |                                                                                         |                                                                                        |                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                     | V <sub>0</sub><br>M±m                                                                  | ДК <sub>л</sub><br>M±m                                                                 | ДК <sub>ч</sub><br>M±m                                                                 | ADP/0<br>M±m                                                                            | ДНФ<br>M±m                                                                               | ADP/t<br>M±m                                                                             | V <sub>0</sub><br>M±m                                                                  | ДК <sub>л</sub><br>M±m                                                                  | ДК <sub>ч</sub><br>M±m                                                                   | ADP/0<br>M±m                                                                            | ДНФ<br>M±m                                                                             | ADP/t<br>M±m                                                                            |
| Контроль<br>(n=7)                                                   | 11,60<br>±0,89                                                                         | 2,91<br>±0,28                                                                          | 2,74<br>±0,29                                                                          | 2,66<br>±0,16                                                                           | 3,41<br>±0,35                                                                            | 86,06<br>±5,98                                                                           | 37,55<br>±5,06                                                                         | 2,03<br>±0,15                                                                           | 2,35<br>±0,11                                                                            | 2,16<br>±0,09                                                                           | 2,30<br>±0,17                                                                          | 158,71<br>±13,36                                                                        |
| Тепловой удар<br>(n=9)                                              | 13,01<br>±1,12<br>p <sub>1</sub> >0,05                                                 | 2,53<br>±0,19<br>p <sub>1</sub> >0,05                                                  | 2,29<br>±0,11<br>p <sub>1</sub> >0,05                                                  | 2,03<br>±0,14<br>p <sub>1</sub> <0,01                                                   | 3,12<br>±0,13<br>p <sub>1</sub> >0,05                                                    | 60,70<br>±2,22<br>p <sub>1</sub> <0,01                                                   | 49,06<br>±3,77<br>p <sub>1</sub> <0,05                                                 | 1,71<br>±0,08<br>p <sub>1</sub> =0,05                                                   | 2,05<br>±0,06<br>p <sub>1</sub> <0,05                                                    | 1,52<br>±0,07<br>p <sub>1</sub> <0,001                                                  | 2,31<br>±0,08<br>p <sub>1</sub> >0,05                                                  | 121,75<br>±9,46<br>p <sub>1</sub> <0,05                                                 |
| Постгипертермический период<br>(улучшение состояния)<br>(n=7)       | 11,66<br>±1,13<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> >0,05                         | 3,74<br>±0,30<br>p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,01                          | 3,64<br>±0,27<br>p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,001                         | 2,96<br>±0,14<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> <0,001                          | 3,84<br>±0,26<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05                            | 125,80<br>±4,88<br>p <sub>1</sub> <0,001<br>p <sub>3</sub> <0,001                        | 32,64<br>±4,10<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> <0,01                         | 2,20<br>±0,10<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> <0,01                           | 2,66<br>±0,10<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> <0,001                           | 2,11<br>±0,19<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> =0,01                           | 2,45<br>±0,09<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> >0,05                          | 146,92<br>±13,69<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> >0,05                        |
| Постгипертермический период<br>(предиагональное состояние)<br>(n=7) | 14,85<br>±1,16<br>p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> >0,05<br>p <sub>3</sub> >0,05 | 2,07<br>±0,15<br>p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 1,95<br>±0,09<br>p <sub>1</sub> <0,02<br>p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 1,61<br>±0,07<br>p <sub>1</sub> <0,001<br>p <sub>2</sub> <0,02<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 2,19<br>±0,14<br>p <sub>1</sub> <0,001<br>p <sub>2</sub> <0,001<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 46,61<br>±3,82<br>p <sub>1</sub> <0,001<br>p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 38,55<br>±3,11<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,01 | 1,54<br>±0,08<br>p <sub>1</sub> <0,02<br>p <sub>2</sub> <0,001<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 1,70<br>±0,06<br>p <sub>1</sub> <0,001<br>p <sub>2</sub> <0,001<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 1,18<br>±0,05<br>p <sub>1</sub> <0,001<br>p <sub>2</sub> <0,01<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 1,98<br>±0,07<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> <0,01<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 84,61<br>±8,85<br>p <sub>1</sub> <0,001<br>p <sub>2</sub> <0,02<br>p <sub>3</sub> <0,01 |

Примечание. Здесь и в табл. 2 индекс при p обозначает номер серии, с которой производилось сравнение

за этим наступали агония и гибель животных. Наступление предагонального состояния (серия 4) сопровождалось снижением почти всех показателей окислительного фосфорилирования—дыхательных контролей,  $ADP/O$ ,  $ADP/t$  и стимуляции дыхания ДНФ. Скорость фосфорилирования резко снижалась, несмотря на то, что скорость окисления ( $V_0$ ) глутаминовой кислоты увеличилась.

В табл. 2 представлены показатели окислительного фосфорилирования в митохондриях головного мозга крыс, которым перед перегреванием вводили ионол. Из приведенных данных видно, что введение ионола животным без последующего перегревания (серия 5) не изменяло состояния окислительного фосфорилирования по сравнению с контролем. Развитие теплового удара у крыс на фоне предварительного введения ионола (серия 6) не сопровождалось снижением показателей окислительного фосфорилирования. Не происходило снижения этих показателей и в постгипертермическом предагональном состоянии (серия 7), более того, наблюдалось увеличение скорости фосфорилирования.

Известно [2, 8], что предварительное введение ионола значительно отделяет момент наступления теплового удара и увеличивает время жизни после взятия из тепловой камеры. Аналогичные результаты наблюдались и в данной работе.

Снижение степени сопряжения окисления с фосфорилированием при одновременном уменьшении количества образующихся молекул АТФ в единицу времени свидетельствовало о значительном нарушении функции митохондрий головного мозга в момент развития теплового удара, а также в постгипертермическом периоде непосредственно перед гибелью животных. Вместе с этим митохондрии мозга не теряли способности осуществлять свободное окисление субстратов. Поглощение кислорода в единицу времени при окислении глутамата и сукцината не изменялось или даже повышалось.

Нарушение процесса окислительного фосфорилирования на высоте гипертермии нельзя, по-видимому, объяснить действием лишь температурного фактора, хотя последнее можно было бы предположить, исходя из липопротендной природы митохондриальных мембран и возможности нарушения фазового состояния липидов. Как было отмечено, через 60—70 мин после взятия животных из тепловой камеры, когда их состояние временно улучшалось, процесс окислительного фосфорилирования нормализовывался. Если температурный фактор являлся причиной нарушения функционального состояния митохондрий, то этот процесс был обратимым.

Привлекает внимание тот факт, что предварительное введение ионола предотвращало нарушение окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга перегреваемых животных. Учитывая антиоксидантное действие ионола, можно полагать, что одной из важнейших причин нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга при перегревании животных, и особенно в постгипертермическом перио-



Таблица 2

Состояние окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс при перегревании после предварительного введения инола

| Серия исследований                                          | Глутаминовая кислота                                |                                                     |                                                    |                                                     |                                                     |                                                       | Янтарная кислота                                    |                                                     |                                                     |                                                     |                                                    |                                                        |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                                                             | $V_0$<br>$M \pm m$                                  | ДК <sub>л</sub><br>$M \pm m$                        | ДК <sub>ч</sub><br>$M \pm m$                       | ADP/O<br>$M \pm m$                                  | ДНФ<br>$M \pm m$                                    | ADP/t<br>$M \pm m$                                    | $V_0$<br>$M \pm m$                                  | ДК <sub>л</sub><br>$M \pm m$                        | ДК <sub>ч</sub><br>$M \pm m$                        | ADP/O<br>$M \pm m$                                  | ДНФ<br>$M \pm m$                                   | ADP/t<br>$M \pm m$                                     |
| Введение инола без последующего перегревания (n=7)          | 11,90<br>$\pm 1,71$<br>$p_1 > 0,05$                 | 3,11<br>$\pm 0,47$<br>$p_1 > 0,05$                  | 3,11<br>$\pm 0,28$<br>$p_1 > 0,05$                 | 2,73<br>$\pm 0,12$<br>$p_1 > 0,05$                  | 3,64<br>$\pm 0,26$<br>$p_1 > 0,05$                  | 91,73<br>$\pm 4,13$<br>$p_1 > 0,05$                   | 35,78<br>$\pm 2,86$<br>$p_1 > 0,05$                 | 2,07<br>$\pm 0,14$<br>$p_1 > 0,05$                  | 2,41<br>$\pm 0,09$<br>$p_1 > 0,05$                  | 1,85<br>$\pm 0,12$<br>$p_1 > 0,05$                  | 2,56<br>$\pm 0,07$<br>$p_1 > 0,05$                 | 132,71<br>$\pm 5,68$<br>$p_1 > 0,05$                   |
| Тепловой удар (n=7)                                         | 15,08<br>$\pm 0,75$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 > 0,05$ | 2,27<br>$\pm 0,08$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 > 0,05$  | 2,83<br>$\pm 0,08$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 < 0,01$ | 2,60<br>$\pm 0,04$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 < 0,01$  | 3,35<br>$\pm 0,28$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 > 0,05$  | 103,07<br>$\pm 3,55$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 < 0,001$ | 37,98<br>$\pm 2,07$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 < 0,05$ | 2,01<br>$\pm 0,05$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 < 0,01$  | 2,39<br>$\pm 0,09$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 < 0,01$  | 1,92<br>$\pm 0,08$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 < 0,01$  | 2,55<br>$\pm 0,10$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 > 0,05$ | 146,43<br>$\pm 11,78$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_2 > 0,05$  |
| Постгипертермический период (преагональное состояние) (n=7) | 12,18<br>$\pm 1,22$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 > 0,05$ | 3,76<br>$\pm 0,34$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,001$ | 3,26<br>$\pm 0,34$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,01$ | 2,59<br>$\pm 0,12$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,001$ | 3,77<br>$\pm 0,34$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,001$ | 115,12<br>$\pm 9,95$<br>$p_5 < 0,05$<br>$p_4 < 0,001$ | 39,65<br>$\pm 3,77$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 > 0,05$ | 2,15<br>$\pm 0,08$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,001$ | 2,39<br>$\pm 0,14$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,001$ | 1,98<br>$\pm 0,13$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,001$ | 2,4<br>$\pm 0,11$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,01$  | 167,51<br>$\pm 15,99$<br>$p_5 > 0,05$<br>$p_4 < 0,001$ |

де, является перекисное окисление липидов митохондриальных мембран. В мозговой ткани перегретых животных непосредственно перед гибелью наблюдается значительное накопление липидных гидроперекисей [15], что является важным фактором нарушения процесса окислительного фосфорилирования [16].

## INFLUENCE OF HYPERTHERMIA ON OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN RAT BRAIN MITOCHONDRIA AND PROTECTIVE EFFECT OF IONOL

SHAROV A. N., KOZLOV N. B.

Chair of Biochemistry, Medical School, Smolensk

A decrease in parameters of oxidative phosphorylation in rat brain mitochondria has been detected on heating the animals to the heat-stroke and especially in post-hyperthermic preagonal state. Preliminary injection of Ionol lowers the sensitivity of this process to the action of high external temperature.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов Н. Б.—В кн.: Патобиохимия и патогистология перегревания организма (под ред. Н. Б. Козлова), Смоленск, с. 3—13, 1978.
2. Забросаева Л. И.—В кн.: Некоторые вопросы патобиохимии и гистопатологии перегревания (под ред. Н. Б. Козлова), Смоленск, с. 33—41, 1970.
3. Козлов Н. Б., Стунжас Н. М., Аленина Т. В. Биохимия животных и человека, Киев, 4, 22—28, 1980.
4. Шепелев А. П. Вопросы мед. химии, 22, 47—51, 1976.
5. Султанов Ф. Ф. Гипертермия (компенсация и недостаточность) (под ред. А. Х. Бабаевой), Ашхабад, Ылым, 224 с., 1978.
6. Граменицкий Е. М. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, 44, 6, 54—59, 1963.
7. Цишинатти Н. Т., Левицкая А. В. Клинич. медицина, 38, 12, 87—91, 1960.
8. Козлов Н. Б., Шаров А. Н. Укр. биохим. ж., 52, 696—699, 1980.
9. Шаров А. Н.—В кн.: Новые методы диагностики и лечения (под ред. Н. Б. Козлова), Смоленск, с. 103—106, 1980.
10. Ивков Н. Н., Панченко Л. Ф.—В кн.: Структура и функция биологических мембран (под ред. Ю. А. Владимиров и Л. Ф. Панченко), М., с. 94—103, 1971.
11. Дедухова В. И., Мохова Е. Н. Биол. науки, 4, 129—137, 1971.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
13. Козлов Н. Б. Укр. биохим. ж., 33, 248—252, 1961.
14. Козлов Н. Б.—В кн.: Некоторые вопросы патобиохимии и гистопатологии перегревания (под ред. Н. Б. Козлова), Смоленск, с. 3—7, 1970.
15. Козлов Н. Б., Забросаева Л. И., Лейтман М. Б. Вопросы мед. химии, 26, 130—133, 1980.
16. Владимиров Ю. А., Суслова Т. Б., Оленев В. И.—В кн.: Митохондрии. Транспорт электронов и преобразование энергии, М., Наука, с. 109—125, 1976.

Государственный медицинский институт, Смоленск

Поступила 3.XII 1981