

- В. Г. и др. Бюлл. экспр. биол. 1980, 89, с. 756. 5. Cooper R. A. J. Supramol. Struct., 1978, 8, 413. 6. Dodge J. T., Mitchel C., Hanahan D. J. Arch. Biochem. Biophys., 1963, 102, 119. 7. Demel R. A., de Kruff B. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 457, 109. 8. Deuticke B., Ruska C. Biochem. Biophys. Acta, 1976, 433, 638. 9. Grunze M., Deuticke B. Biochem. Biophys. Acta, 1974, 356, 125. 10. Stewart J. C. M. Analyt. Biochem., 1980, 104, 10. 11. Shiga T., Maeda N., Suda T., Kon K., Sekiya M. Experientia, 1980, 36, 127. 12. Itzahi A., Gill M. Analyt. Biochem., 1964, 9, 401. 13. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G. A. J. Biol. Chem., 1957, 226, 497.

УДК 612.74+616.127]:576.311.347:599.32

М. И. Агаджанов, С. В. Алисиевич, В. К. Преображенская, В. В. Хаскин

ОКИСЛЕНИЕ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И МИОКАРДА У ГРЫЗУНОВ РАЗЛИЧНОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

Активация метаболизма и увеличение мышечной теплопродукции при действии низкой температуры на организм мелких гомойотермных животных сопровождается качественными изменениями свойств и энергетики мышечных митохондрий. Среди них важную роль играет открытое более 20 лет назад терморегуляторное разобщение окисления и фосфорилирования, увеличивающее выход тепла при окислительных процессах в мышцах [5, 6]. Установлено, что этот механизм усиливается при адаптации животных к холоду и лежит в основе адаптационного увеличения теплового эффекта мышечных сокращений [3, 8, 10]. Изменение энергетической эффективности сократительной деятельности при адаптации к холоду затрагивает не только скелетные мышцы, но и миокард [1], однако состояние окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца животных в этих условиях почти не изучено.

Большинство сведений об изменениях клеточной энергетики мышц при действии холода получено на лабораторных животных, обладающих высокой термической адаптивностью. Необходимо отметить, что трактовка основных результатов, в том числе само признание феномена терморегуляторного разобщения и оценка его физиологической роли в работах разных авторов существенно зависит как от объекта и характера температурных воздействий, так и метода исследований митохондрий. У диких животных эти отношения исследованы недостаточно. Имеются лишь данные о различиях прироста общей теплопродукции, приходящейся на единицу электрической активности скелетных мышц, у северных и южных видов грызунов [2]. В настоящей работе произведено сравнение главных параметров митохондриального окисления в мышцах и миокарде у представителей нескольких видов грызунов при различных воздействиях холода на организм.

Материал и методы

В экспериментах использованы половозрелые самцы нелинейных белых и разводимых серых крыс, относящихся к одному виду *Rattus norvegicus*, и ещё четы-

трех видов грызунов из различных природно-климатических зон, обладающих разной экологической специализацией: хлопковой крысы (*Sigmodon hispidus* Gray et Ord, субтропики Центральной Америки, южные штаты США), монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*, степи и полупустыни Центральной Азии, Тувинской АССР), сибирского лемминга (*Lemmus sibiricus*, субарктическая тундра, Чукотка) и краснощекого суслика (*Citellus Erithrogenus*, Новосибирская обл.). Препараты митохондрий получали от интактных животных, содержащихся в виварии (контроль), и от животных с измененным метаболическим состоянием, для чего применялись следующие воздействия: а) холодовая акклимация—содержание при $4 \pm 1^\circ$ в течение 3—5 недель (белая крыса, хлопковая крыса, песчанка и лемминг); б) острая кратковременная гипотермия—воздушное охлаждение иммобилизованных животных при -15° до ректальной температуры $23-25^\circ$ с последующим отогреванием части животных до нормальной температуры (серые крысы, контрольные и акклимированные к холоду белые крысы); в) стимулированная терморегуляторная реакция—40-минутная экспозиция при $-5-8^\circ$ без фиксации (контрольные и акклимированные к холоду белые крысы, песчанки и лемминги). Суслики исследовались как в состоянии бодрствования перед спячкой (сентябрь), так и во время спячки (декабрь).

Окисление и фосфорилирование в митохондриях мышц конечностей и миокарда белых, серых, хлопковых крыс и сусликов после указанных воздействий измеряли полярографически с помощью ячейки с открытым вращающимся платиновым электродом на полярографе LP-7 [4]. Митохондрии выделяли из охлажденных гомогенатов тканей дифференциальным центрифугированием с повторным отмыванием в среде следующего состава (здесь и ниже в ммоль): 100 сахарозы, 180 KCl, 100 трис, 10 ЭДТА, 5 MgCl₂, 1 АДФ, а также 0,5% сывороточного альбумина. Состав среды инкубации: 300 маннитол, по 10—трис, KCl и K₂HPO₄, 6 сукцинат натрия или 1,2 глутамат натрия; pH среда 7,4, температура инкубации 25° . АДФ в ходе опыта добавляли в количестве 100 или 200 мкмоль. Регистрировали скорости потребления кислорода во 2, 3 и 4-м метаболических состояниях, рассчитывали скорость фосфорилирования, а также коэффициент АДФ:О и величину дыхательного контроля (ДК). Белок суспензии митохондрий определяли по Лоури. Скорость окисления и фосфорилирования выражали в нанogramм-атомах кислорода или фосфора на 1 мг белка за минуту.

У контрольных и акклимированных к холоду белых крыс, песчанок и леммингов, подвергнутых холодовой экспозиции, исследовали также соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях скелетных мышц по потреблению кислорода в микрореспирометрах Варбурга и убыви неорганического фосфата в присутствии глюкозы и гексокиназы [5]. Митохондрии выделяли без повторного отмывания в среде состава: 100 KCl, 50 трис, по 1—MgCl₂, ЭДТА и АДФ. Инкубацию вели в течение 40 минут при температуре 26° в среде, содержащей 100 KCl, 5 MgCl₂, 10 K₂HPO₄, 60 глюкозы, 20 сукцината, 2 АДФ, а также 0,2 мг/мл кристаллической гексокиназы и около 0,4 мг/мл белка митохондрий; pH среды 7,4. Фосфор определяли по Лоури и Лопецу в модификации В. П. Скулачева [5].

Результаты и обсуждение

Основные параметры митохондриального окисления, полученные с помощью полярографической техники у интактных животных, представлены в табл. 1. В большинстве вариантов средние значения V_2 и V_4 были практически равны между собой— $V_4/V_2=0,9-1,15$, поэтому приводится только V_2 и, соответственно, ДК по Ларди (по [4]). Показатели дыхания и фосфорилирования у белых и серых крыс, относящихся к одному биологическому виду, различаются незначительно. Можно указать лишь на более высокий дыхательный контроль мышечных митохондрий и несколько большую интенсивность фосфорилирующего окисления сердечных митохондрий серых крыс. К этому уровню близки и данные, характеризующие бодрствующего

краснощекого суслика. Обращает на себя внимание низкое значение АДФ:О в скелетной мышце суслика. Хлопковая крыса резко выделяется высокими скоростями окисления и фосфорилирования, в 2,5—3 раза превышающими уровень, отмеченный у двух других видов.

В табл. 1 приведены данные, относящиеся только к варианту использования сукцината в качестве субстрата окисления. Во всех случаях замена сукцината на глутамат приводит к уменьшению скорости окисления во втором метаболическом состоянии V_2 . Несколько слабее уменьшается V_3 , и сравнительно мало изменяется скорость фосфорилирования V_{ϕ} . Поэтому величины ДК и АДФ:О при окислении глутамата больше, чем при окислении сукцината. Наиболее чувствительны к смене субстрата мышечные митохондрии хлопковой крысы, где отношение глутамат:сукцинат (Г/С) для V_2 составляет 0,33, для V_{ϕ} —0,82, и сердечные митохондрии серой крысы, где Г/С для V_2 —0,23, для V_{ϕ} —0,5. У суслика особенно заметно влияние субстрата окисления на АДФ:О: в мышце при окислении сукцината коэффициент равен 1,3, а при окислении глутамата—2,3; в миокарде соответственно 1,6 и 2,8.

Полярнографическая техника позволяет выявить некоторые сдвиги энергетики изолированных митохондрий под влиянием предшествующих воздействий на организм, связанных с термозависимым изменением общего метаболизма. Мышечные митохондрии белых крыс в состоянии гипотермии не отличаются по изученным параметрам от митохондрий нормотермических животных, а сердечные митохондрии обнаруживают значительное повышение скорости окисления V_2 —на 70, V_3 —на 55% ($p < 0,01$), фосфорилирования—на 58% ($p < 0,01$) и заметный сдвиг в предпочтении субстрата окисления: отношение Г/С для V_2 уменьшается почти вдвое. Митохондрии мышц и сердца серых крыс и акклиматизированных к холоду белых крыс практически не изменяют параметров окисления и фосфорилирования в состоянии гипотермии. Отогревание после гипотермии заметно стимулирует фосфорилирующее окисление в мышечных и сердечных митохондриях белых крыс: V_3 возрастает соответственно на 47 и 64% ($p < 0,001$), а ДК мышечных митохондрий увеличивается до 2,6. Подобный эффект совершенно отсутствует у серых крыс. Длительная акклиматизация белых крыс в условиях постоянной низкой температуры не повлияла на интенсивность окисления в мышечных митохондриях, но повысила окислительную активность митохондрий миокарда на 78% ($p < 0,001$). Однако отогревание после гипотермии акклиматизированных к холоду белых крыс не только не стимулирует окисления, но даже нивелирует адаптационный прирост V_3 в митохондриях миокарда. Холодовая акклиматизация хлопковых крыс не оказала влияния на окисление в митохондриях обеих тканей, но привела к некоторому увеличению скорости фосфорилирования в мышечных митохондриях (до 482 ± 34 на $\text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, т. е. на 29% выше контроля, $p < 0,05$) и к соответствующему увеличению АДФ:О. В состоянии зимней спячки у краснощекого суслика уменьшена потенциальная окислительная активность мышечных и сердечных митохондрий—соответственно до уров-

ней 61 и 53% от состояния бодрствования перед спячкой ($p < 0,001$). Этот сдвиг сопровождается существенным повышением сопряженности окисления и фосфорилирования в мышцах.

Таблица 1

Окисление и фосфорилирование в митохондриях скелетных мышц и миокарда интактных животных (полярнографический метод, на $\text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$)

Животные	n	V_2	V_3	$V\phi$	АДФ:О	ДК
Скелетная мышца						
Белая крыса	10	$41,5 \pm 1,9$	$81,4 \pm 5,2$	$150,9 \pm 9,5$	$1,84 \pm 0,06$	$1,92 \pm 0,04$
Серая крыса	6	$37,8 \pm 2,0$	$100,0 \pm 5,0$	$161,4 \pm 9,4$	$1,76 \pm 0,05$	$2,38 \pm 0,05$
Хлопковая крыса	9	$89,4 \pm 9,1$	$229,0 \pm 31,1$	$373,3 \pm 23,6$	$1,59 \pm 0,20$	$2,56 \pm 0,09$
Краснощ. суслик	10	$55,9 \pm 5,2$	$95,8 \pm 9,1$	$125,4 \pm 17,4$	$1,30 \pm 0,11$	$1,80 \pm 0,06$
Миокард						
Белая крыса	10	$48,5 \pm 5,0$	$91,8 \pm 9,8$	$156,7 \pm 16,1$	$1,74 \pm 0,12$	$1,73 \pm 0,06$
Серая крыса	9	$63,2 \pm 5,6$	$126,7 \pm 12,2$	$197,2 \pm 9,3$	$1,66 \pm 0,11$	$1,76 \pm 0,09$
Хлопковая крыса	7	$141,5 \pm 19,8$	$290,9 \pm 38,3$	$498,4 \pm 39,0$	$1,82 \pm 0,20$	$1,95 \pm 0,07$
Краснощ. суслик	10	$69,6 \pm 8,9$	$129,1 \pm 13,5$	$191,2 \pm 10,1$	$1,60 \pm 0,07$	$2,00 \pm 0,10$

Примечание. Субстрат—сукцинат; $t 25^\circ$.

Ни одно из описанных изменений фосфорилирующего окисления не сопровождается достоверным уменьшением АДФ:О и, следовательно, не позволяет говорить о каком-либо терморегуляторном или адаптационном разобщении окисления и фосфорилирования. Этот результат вынудил нас обратиться к методике, которая сегодня уже считается устаревшей, но с помощью которой эффект уменьшения сопряжения в мышцах адаптированных к холоду животных многократно воспроизводился [5, 8, 10, 11]. Результаты представлены в табл. 2. У адаптированных белых крыс в состоянии терморегуляторной стимуляции метаболизма отчетливо регистрируется повышение дыхания мышечных митохондрий (на 59%, $p < 0,001$) и существенное уменьшение Р:О, что подтверждает данные вышеуказанных работ. Однако у монгольской песчанки и сибирского лемминга подобное изменение отсутствует. Скорость фосфорилирования в мышечных митохондриях песчанки, как и у хлопковых крыс при адаптации к холоду возрастает (на 25%, $p < 0,05$). Для митохондрий лемминга характерна весьма высокая дыхательная и фосфорилирующая активность при сравнительно низком Р:О и их независимость от температурных воздействий на организм. Таким образом, возможность регуляторных изменений соотношения окисления и фосфорилирования в мышцах при действии холода не отвергается, т. к. согласуется с некоторыми другими биохимическими и физиологическими данными, имеет аналогию в виде энергетически лабильных митохондрий бурой жировой ткани и, наконец, подкрепляется методикой, принципиальная адекватность которой не оспаривалась [6, 10, 13].

Действительно, как видно из данных, полученных манометрическим методом, охлаждение акклимированных к холоду белых крыс

Таблица 2

Влияние терморегуляторной теплопродукции на окисление и фосфорилирование в мышечных митохондриях контрольных и акклимированных к холоду животных (манометрический метод, на $\text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$; субстрат—сукцинат, температура 26°)

Животные		Контроль		Терморегуляторная реакция			
		О	Р	Р/О	О	Р	Р/О
Белая крыса	12/9	$39,5 \pm 2,2$	$47,8 \pm 2,6$	$1,24 \pm 0,11$	$61,4 \pm 4,7$	$42,9 \pm 3,3$	$0,70 \pm 0,14$
Монгольская песчанка	8/3	$56,4 \pm 2,8$	$74,5 \pm 5,0$	$1,32 \pm 0,16$	$66,8 \pm 6,8$	$93,9 \pm 7,1$	$1,0 \pm 0,17$
Сибирский лемминг	6/5	$124,3 \pm 10,8$	$102,7 \pm 12,8$	$0,93 \pm 0,17$	$133,6 \pm 13,8$	$105,0 \pm 17,4$	$0,78 \pm 0,19$

Примечание. Отличие от контроля достоверно, $p < 0,05$.

вызывает отчетливое уменьшение Р:О и увеличение уровня нефосфорилирующего окисления (табл. 2). Впрочем, и полярографические данные свидетельствуют о сравнительно высокой реактивности митохондриальной энергетики у белых крыс в условиях температурных воздействий. Отогревание после гипотермии сопровождается заметным повышением дыхательной и фосфорилирующей активности мышечных и сердечных митохондрий. Акклимация к холоду приводит к значительной энергизации митохондрий миокарда и резко изменяет их реакцию на дополнительное острое охлаждение, а мышечные митохондрии делает нечувствительными к такому воздействию. Одно из возможных объяснений этого заключается в том, что при длительной холодовой акклиматизации возрастает мощность средств температурного гомеостаза, но уменьшается толерантность организма в состояниях, когда он все же нарушается [12, 14]. В большей мере это относится к энергетике сердца. Вероятно, у акклимированных белых крыс острая гипотермия, которая достигается труднее и за существенно большее время, чем у контрольных животных, приводит к более значительным альтерациям митохондрий миокарда, которые отчасти сохраняются и после прекращения действия холода.

У других исследованных животных энергетическое состояние митохондрий более стабильно и гораздо меньше изменяется под влиянием экспериментальных воздействий на организм. Можно заключить, что существенные изменения энергетики митохондрий при действии низкой температуры, а именно—интенсификация окисления и уменьшение его сопряженности с фосфорилированием в мышцах присущи лишь животным с хорошо выраженной метаболической адаптацией. У диких животных со специфической видовой реактивностью такие изменения либо отсутствуют (серая крыса, сибирский лемминг), либо приобретают противоположную направленность, приводя к увеличению сопряженности, связанной с сохранением ведущей роли АТФ-зависимых термогенных процессов (хлопковая крыса, монгольская песчанка) или с минимизацией окисления при зимней спячке (краснощекий суслик).

Институт физиологии СО АМН СССР,
г. Новосибирск, Ереванский
медицинский институт

Поступила 10/V 1990 г.

Մ. Ի. Ազաշանով, Ս. Վ. Ալիսիկ, Վ. Կ. Պրեպրոմենակյա, Վ. Վ. Խասկիե

ԿՄԱԽՔԱՅԻՆ ՄԿԱՆՆԵՐԻ ԵՎ ՍՐՅԱՄԿԱՆԻ ՕՔՍԻՊԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ՅՈՍՅՈՐԻԱՏՈՒՄԸ
ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻՈՒՄՆԵՐՈՒՄ ՏԱՐՔԵՐ ԻՎՈՂՈԳԵԱԿԱՆ ՄԱՆՍԱԳԻՏԱՑՈՒՄ ՈՒՆԵՑՈՂ ԿՐՍՈՂՆԵՐԻ
ՄՈՏ ՑԱՄԸ ԶԵՐՄԱՏԻՋԱՆՆԵՐԻ ԱԶԻԵՑՈՒՅՑԱՆ ՏԱԿ

Աշխատանքում արվում է միտոքոնդրիումային օքսիդացման հիմնական ցուցանիշների համեմատումը մկաններում և սրտամկանում կրծողների տարբեր ներկայացուցիչների մոտ օրգանիզմի վրա տարբեր շերմային ազդեցությունների ժամանակ, Բացահայտված է, որ միտոքոնդրիումների շերմային և կան փոփոխությունները՝ օքսիդացման ինտենսիֆիկացումը և նրան զուգորդված ֆոսֆորիլացման նվազումը մկաններում բնորոշ է միայն լավ ար-

տահայտված նյութափոխանակային հարմարողականությունը օժտված կենդանիների մոտ:

Վայրի կենդանիների մոտ, որոնք ունեն սպեցիֆիկ տեսակային ռեակտիվություն, այդպիսի փոփոխությունները կամ բացակայում են (մոխրագույն առնետ, սիրիլյան լեմինգ), կամ ունեն հակառակ ուղղորդվածություն, բերելով զուգորդման մեծացման, որը կապված է ATP-կախված ջերմագեն պրոցեսների պահպանման հետ (բամբակային առնետ, և այլն), կամ օբսիդացման նվազման հետ ձմեռային քնի ժամանակ:

M. I. Aghadjanov, S. V. Alisievich, V. K. Preobrazhenskaya, V. V. Haskin

Oxidation and Phosphorylation in Skeletal and Heart Muscle Mitochondria in Rodents of Various Ecological Specification Under the Effect of Low Temperature

The comparison of the main parameters of mitochondrial oxidation in muscles and myocardium in the representatives of the several types of rodents under various cold effects have been carried out. It was established that essential changes in mitochondria energetics under the effect of low temperature which means intensification of oxidation and decrease in its accompaniment to the phosphorylation in the muscles are usual for the animals with well expressed metabolic adaptability.

In the wild animals with specific type reactivity either there was a lack of such changes (gray rat, siberian lemming), or they had an opposite direction which brought to the increase of accompaniment connected with the maintenance of ATP-dependent thermogene processes (cotton rat, mongolic sandy), or with the minimizing of oxidation during winter sleep (rephase gopher).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алюхин Ю. С., Пчеленко М. Д. Физiol. ж. СССР, 1979, 65, II, с. 1620.
2. Баженов Ю. И. Термогенез и мышечная деятельность при адаптации к холоду. Л., 1981.
3. Иванов К. П., Пчеленко М. Д. ДАН СССР, 1978, 240, I, с. 227.
4. Кондрашева М. Н., Ананенко А. А. В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., I, 1973.
5. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962.
6. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
7. Скулачев В. П., Маслов С. П. Биохимия, 1960, 25, 6, с. 1058.
8. Скулачев В. П., Маслов С. П., Сивкова В. Г., Калининченко Л. П., Маслова Г. М. Биохимия, 1963, 28, I, с. 70.
9. Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду. Новосибирск, 1975.
10. Хаскин В. В. Успехи физиол. наук, 1976, 7, I, с. 24.
11. Хаскин В. В., Синдаровская И. Н. Физiol. ж. СССР, 1972, 58, I, с. 108.
12. Хлебович В. В. Акклиматизация животных организмов. Л., 1951.
13. Behrens U. A., J. Himms-Hagen. Blomembr., 1977, 9, 41.
14. Webster A. G. F. Physiological effect of exposure. In Environmental Physiology. Ed. by D. Robertshaw, Univ. Park Press, Baltimore, 1974, 33.