

Член-кореспондент НААН України С. Д. Мельничук, В. С. Морозова,
С. В. Хижняк, В. М. Войціцький

Показники окисного фосфорилування мітохондрій кардіоміоцитів щурів за умов штучного гіпобіозу

(Представлено академіком НАН України С. В. Комісаренком)

Досліджено дихальну і фосфорилуючу активність мітохондрій кардіоміоцитів щурів за умов штучного гіпобіозу. При використанні двох субстратів окиснення (сукцинату та малату) показано зниження швидкості поглинання кисню мітохондріями. Встановлено часткове роз'єднання процесу спряження окиснення і фосфорилування при використанні малату і не виявлено такого при використанні сукцинату. Ці дані, а також результати з визначення активності ферментів дихального ланцюга дають змогу припустити переключення мітохондрій кардіоміоцитів на сукцинатний тип тканинного дихання, який реалізується при різних стрес-реакціях, у тому числі за умов дослідження.

Життєдіяльність організмів забезпечує сукупність процесів перетворення енергії, що відбуваються в клітинах організму. Значну роль в цьому відіграють енергоперетворюючі мембрани, а саме внутрішні мембрани мітохондрій, за рахунок функціонування спеціальних ферментних систем (оксидоредуктаз), які формують електронтранспортний (дихальний) ланцюг, а також зворотної H^+ -АТФази [1, 2].

Мітохондрії — є основними споживачами кисню і виробниками більшої частини енергії в клітині. Важливу роль при переході тварин до стану зимової сплячки (гібернації) відіграють процеси, що відбуваються в мітохондріях [3]. Встановлено, що ізольовані мітохондрії кардіоміоцитів гібернуючих тварин мають значно знижену порівняно з мітохондріями гоміотермних тварин швидкість дихання у всіх метаболічних станах. Водночас, у тварин-гібернантів, на відміну від інших ссавців, при зниженні температури до 7 °С зберігається судинна авторегуляція, серце зберігає здатність до скорочення [4].

Мітохондрії чутливі до будь-якого впливу, особливо до кисневої недостатності. Первинною їх реакцією є пригнічення окисного фосфорилування [2], який дає змогу аеробним організмам уловлювати значну частку енергії окиснення субстратів. Дослідження функціонального стану дихального ланцюга мітохондрій широко використовують для вивчення енергетичного обміну в різних фізіологічних станах організму [5].

Враховуючи, що на сьогодні важливим методом зниження функціональної активності серця при хірургічних втручаннях є гіпотермія [6], яка на клітинному рівні призводить до енергетичного виснаження, дослідження можливих шляхів тривалого зниження функцій серця вбачається однією з важливих задач кардіохірургії. Зниження температури організму на фоні гіперкапнії та гіпоксії, що спостерігається в умовах штучного гіпобіозу, потребує дослідження перебігу біоенергетичних процесів у клітинах різних органів, у тому числі кардіоміоцитах.

Мета дослідження полягала у вивченні дихальної і фосфорилуючої активності мітохондрій кардіоміоцитів щурів у стані штучного гіпобіозу.

Матеріали і методи. Експерименти проводили відповідно до вимог “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою” (Страсбург, 1985), за загальними етичними принципами експериментів на тваринах, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (2001 р.).

У досліджах використовували білих безпородних щурів-самців масою 180–200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Щурів розділили на дві групи (по сім особин у кожній): I — контрольні тварини; II — тварини у стані гіпобіозу. Стан штучного гіпобіозу створювали за методикою Бахметьєва–Джайя–Анжуса, яка детально описана в [7]. Для введення в стан штучного гіпобіозу тварин поміщали в герметично закриту камеру об’ємом 3 дм³, температура в камері становила 3–4 °С. Протягом перебування тварин у камері за таких умов змінюється як температура, так і склад газового середовища: розвивається гіперкапінія (зростає вміст вуглекислого газу) та гіпоксія (зменшується рівень кисню). Через 3–3,5 год залежно від індивідуальних особливостей у тварин знижується ректальна температура з 37 °С до 17 °С, зменшується частота серцевих скорочень з 380 до 80 ударів за хвилину, повністю втрачається рухомість, реакція на больовий подразник та зникає рефлекс на положення, що свідчить про розвиток стану штучного гіпобіозу. Тварин контрольної групи та в стані штучного гіпобіозу піддавали декапітації.

Препарати мітохондрій кардіоміоцитів отримували методом диференціального центрифугування [8], а після їх заморожування–відтаювання і подальшого центрифугування одержували субмітохондріальні частинки — препарати внутрішньої мембрани мітохондрій [9]. Вміст білка в досліджуваних препаратах визначали методом Лоурі і співавт. [10]. Інтенсивність дихання мітохондрій реєстрували за допомогою полярографа LP-7 у термостатованій кюветі з використанням платинового електрода [9]. Середовище інкубації містило 150 ммоль/л сахарози, 50 ммоль/л КСl, 3 ммоль/л MgCl₂, 5 ммоль/л KН₂РO₄, 5 ммоль/л *трис*-НСl буфер (рН 7,4). Дихання стимулювали додаванням аденозиндифосфату (АДФ) (кінцева концентрація 200 нмоль/л). Як субстрати окиснення використовували малат чи сукцинат у кінцевій концентрації 10 ммоль/л. За отриманими полярограмами ідентифікували енергетичний стан мітохондрій за Чансом [11] і розраховували швидкість дихання в цих станах: стан 2 — “вільний” (V_4^S); стан 3 — АДФ-стимульоване дихання, або “активний” (V_3); 4 — “контрольований” (V_4^{ATP}); V_F — швидкість фосфорилування АДФ. Розраховували також швидкість дихання мітохондрій в умовах роз’єднання окисного фосфорилування 2,4-динітрофенолом (2,4-ДНФ) — $V_{ДНФ}$, дихальний контроль (ДК) — V_3/V_4^{ATP} , ефективність фосфорилування доданого АДФ — АДФ/О, а також показник, що характеризує активність АТФ-гідролазних реакцій мітохондрій — V_4^S/V_4^{ATP} .

Визначення активності сукцинат-КоQ-оксидоредуктази (ЕС 1.3.99.1.) та цитохромоксидази (ЕС 1.9.3.1.) в препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій проводили спектрофотометрично згідно з рекомендаціями [12].

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність відмінностей між показниками експериментальної і контрольної груп оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Використання екзогенного субстрату дихального ланцюга мітохондрій — малату дає змогу оцінити функціонування всіх ділянок спряження окисного фосфорилування в умовах експерименту. Згідно з результатами проведених досліджень показників дихальної активності за умов штучного гіпобіозу (табл. 1), величина V_4^S , що характеризує швидкість поглинання кисню при додаванні до суспензії мітохондрій субстрату окиснення, зменшується в середньому у 2,4 раза порівняно з контролем. Пока-

Таблиця 1. Показники інтенсивності дихальної та фосфорилуючої активності мітохондрій кардіоміоцитів щурів у контролі та за умов штучного гіпобіозу ($M \pm m$, $n = 7$)

Умови досліджу	V_4^S , мкатом $O_2/(xв \cdot мг$ білка)	V_3 , мкатом $O_2/(xв \cdot мг$ білка)	$V_4^{ATФ}$, мкатом $O_2/(xв \cdot мг$ білка)	V_{ϕ} , мкатом $O_2/(xв \cdot мг$ білка)	$V_{днФ}$, мкатом $O_2/(xв \cdot мг$ білка)	АДФ/О	ДК	$V_4^S/V_4^{ATФ}$
Субстрат малат								
Контроль	$0,052 \pm 0,003$	$0,146 \pm 0,012$	$0,041 \pm 0,006$	$0,493 \pm 0,025$	$0,195 \pm 0,011$	$2,192 \pm 0,129$	$3,784 \pm 0,468$	$1,364 \pm 0,213$
Гіпобіоз	$0,022 \pm 0,003^*$	$0,059 \pm 0,002^*$	$0,021 \pm 0,003^*$	$0,238 \pm 0,017^*$	$0,089 \pm 0,006^*$	$1,753 \pm 0,055^*$	$2,922 \pm 0,424^*$	$1,068 \pm 0,104^*$
Субстрат сукцинат								
Контроль	$0,031 \pm 0,005$	$0,097 \pm 0,006$	$0,022 \pm 0,003$	$0,316 \pm 0,032$	$0,127 \pm 0,008$	$1,447 \pm 0,041$	$4,408 \pm 0,368$	$1,326 \pm 0,096$
Гіпобіоз	$0,016 \pm 0,003^*$	$0,047 \pm 0,004^*$	$0,011 \pm 0,002^*$	$0,211 \pm 0,031^*$	$0,057 \pm 0,003^*$	$1,094 \pm 0,028^*$	$4,466 \pm 0,593$	$1,424 \pm 0,125$

Примітка. V_4^S — інтенсивність дихання в стані 2 (до мітохондрій доданий екзогенний субстрат, але немає акцептора фосфату); V_3 — інтенсивність дихання в стані 3 (мітохондрії з субстратом окиснення і АДФ); $V_4^{ATФ}$ — інтенсивність дихання в стані 4 (у системі вичерпується доданий акцептор фосфату, але концентрація субстратів окиснення продовжує залишатися високою); $V_{днФ}$ — інтенсивність дихання мітохондрій за умов дії роз'єднувача окисного фосфорилування 2,4-динітрофенолу; V_{ϕ} — швидкість фосфорилування мітохондрій; ДК — дихальний контроль ($V_3/V_4^{ATФ}$); АДФ/О — ефективність фосфорилування доданого АДФ, що відповідає коефіцієнту P/O; $V_4^S/V_4^{ATФ}$ — характеризує активність АТФ-гідролазних реакцій мітохондрій.

* $P \leq 0,05$ відносно контролю.

знизи споживання кисню при додаванні в реакційну суміш АДФ (V_3) і після повного його фосфорилування ($V_4^{\text{АТФ}}$) при цьому також знижуються в 2,5 і 2,0 раза відповідно. Показник швидкості дихання мітохондрій в умовах роз'єднання окисного фосфорилування ($V_{\text{ДНФ}}$) зменшується в 2,2 раза, а швидкості фосфорилування ($V_{\text{Ф}}$) — в 2,1 раза порівняно з контролем. Отримані результати свідчать про зниження швидкості поглинання кисню мітохондріями кардіоміоцитів за умов гіпобіозу.

Використовуючи як субстрат окиснення сукцинат, можна оцінити функціональний стан комплексів дихального ланцюга сукцинат-КоQ-оксидоредуктази, КоQ-цитохром *c*-оксидоредуктази та цитохромоксидази. Аналіз отриманих результатів (див. табл. 1) свідчить про те, що інтенсивність дихання мітохондрій (V_4^S), швидкість активного окиснення сукцинату (V_3), швидкість “контрольованого” окиснення ($V_4^{\text{АТФ}}$) у стані штучного гіпобіозу вірогідно знижуються в середньому в 1,9; 2,1; 2,0 раза відповідно порівняно з контролем. Швидкість дихання в стані роз'єднання ($V_{\text{ДНФ}}$) і швидкість фосфорилування $V_{\text{Ф}}$ в умовах експерименту також зменшуються в 2,2 і 1,5 раза відповідно. Таким чином, при використанні сукцинату, як і малату, спостерігається зменшення швидкості поглинання кисню мітохондріями кардіоміоцитів (за умов гіпобіозу), що може бути обумовлено дисфункцією дихального ланцюга.

При використанні як субстрату малату величина АДФ/О зменшується в середньому на 20%, а коефіцієнт ДК — на 23% порівняно з контролем. З урахуванням того, що величини показника АДФ/О та ДК залишаються на досить високому рівні (див. табл. 1), можна стверджувати лише про часткове роз'єднання процесу спряження окиснення і фосфорилування в мітохондріях за цих умов.

У той же час при використанні сукцинату значення показника АДФ/О зменшується в середньому на 24%, а величини коефіцієнта ДК не змінюються відносно контролю. Тобто роз'єднання спряження процесів окисного фосфорилування не відбувається, як це мало місце при використанні малату. Можливо, це пояснюється переключенням мітохондрій на сукцинатний тип тканинного дихання — це механізм домінування окиснення бурштинової кислоти ферментами дихального ланцюга, який реалізується при різних стрес-реакціях, у тому числі холодовому стресі та за різноманітних екстремальних умов для підтримання високого температурного рівня життя [13].

Величина показника гідролізуючої активності H^+ -АТФази ($V_4^S/V_4^{\text{АТФ}}$) при використанні малату зменшується на 22% відносно контролю, а при використанні сукцинату істотно не змінюється (див. табл. 1).

Для оцінки функціональної активності дихального ланцюга мітохондрій кардіоміоцитів щурів визначали активність ферментів дихального ланцюга препаратів внутрішньої мембрани мітохондрій: сукцинат-КоQ-оксидоредуктази та цитохромоксидази (рис. 1). За умов штучного гіпобіозу активність сукцинат-КоQ-оксидоредуктази (II комплексу дихального ланцюга) в мембранних препаратах збільшується на 65% ($172,8 \pm 16,1$ та $284,9 \pm 25,2$ нмоль фериціаніду/(хв · мг білка) ($P \leq 0,05$) у контролі та за умов гіпобіозу відповідно). Активність цитохромоксидази (IV комплексу дихального ланцюга) в мембранних препаратах змінюється недостовірно ($28,5 \pm 2,5$ та $23,8 \pm 2,1$ мкмоль ок. цитохрому *c*/(хв · мг білка) у контролі та за умов гіпобіозу відповідно).

Аналізуючи отримані результати відзначимо, що за умов штучного гіпобіозу при використанні як субстрату малату відбувається часткове роз'єднання процесу спряження окиснення і фосфорилування в мітохондріях кардіоміоцитів щурів, чого не спостерігається при використанні сукцинату. Тому можна припустити пригнічення функціональної активності

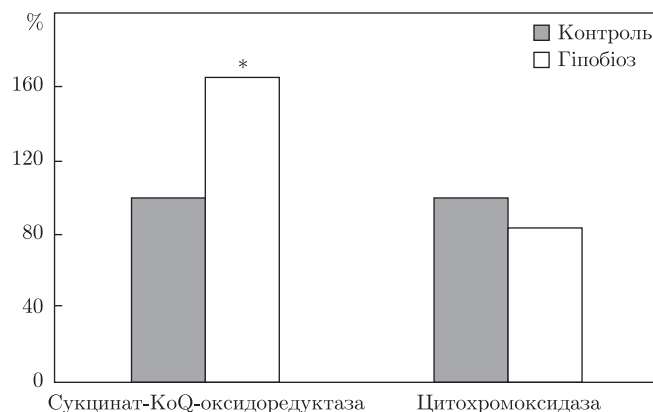


Рис. 1. Ферментативна активність препаратів внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів щурів у контролі та за умов штучного гіпобіозу (% відносно контролю).

* $P \leq 0,05$ відносно контролю

першої ланки спряження окиснення та фосфорилювання дихального ланцюга з урахуванням, що при цьому не виявлено змін функціональної активності кінцевої ланки спряження. Отримані результати є підтвердженням можливості ендogenous регулювання гіпобіозу за рахунок модифікації функціональної активності окремих ланок дихального ланцюга мітохондрій, наприклад, як і при використанні інгібіторів дихального ланцюга [3].

Крім того, виявлене підвищення сукцинат-КоQ-оксидоредуктазної активності мембранних препаратів вказує на можливість переключення кардіоміоцитів на сукцинатний тип тканинного дихання, який зумовлює підтримання необхідного енергозабезпечення, оскільки серце має функціонувати в достатньому режимі, у тому числі за умов гіпобіозу. Можливо, це обумовлює і відсутність істотних змін АТФ-гідролазної активності, що свідчить про достатність утворення енергії за таких умов. Часткове інгібування процесів окисного фосфорилювання в кардіоміоцитах, можливо, пов'язано не з переходом функціонування мітохондрій у режим теплопостачання [1], а зі зменшенням частоти серцевих скорочень і, відповідно, зі зменшенням потреби в АТФ.

1. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран. – Москва: Наука, 1989. – 564 с.
2. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. Т. 2 / Пер. с англ. – Москва: Мир, 1985. – 368 с.
3. Сосулина Л. Ю., Сухова Г. С., Чудный М. Н., Ашмарин И. П. Действие АДФ-рибозы на механическую и биоэлектрическую активность сердца лягушки // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 1999. – 85, № 4. – С. 508–514.
4. Burlington R. F., Milsom W. K. The cardiovascular system in hibernating mammals: recent advances // Living in the cold II. Collogue INSER. – Москва: Jon Libbey Eurotext Ltd. – 1989. – P. 235–243.
5. Кузьменко Д. И., Жаворонок Т. В., Мамонтова И. П. и др. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов: учеб. пособие / Под ред. В. Ю. Сереброва, Г. А. Сухановой. – Томск: Сиб. гос. мед. ун-т, 2008. – 180 с.
6. Лутасова Е. Е., Власов Ю. А., Окунева Г. Н. и др. Клиническая физиология искусственной гипотермии. – Новосибирск: Наука, Сиб. предприятие РАН, 1997. – 565 с.
7. Мельничук С. Д., Мельничук Д. О. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини). – Київ: Видавничий центр НАУ, 2007. – 220 с.
8. Ахмеров Р. Н. Выделение интактных митохондрий из слизистой кишечника // Узб. биол. журн. – 1978. – № 4. – С. 38–41.
9. Практикум по биохимии / Под ред. Н. В. Северина, Л. Н. Соловьевой. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509 с.

10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. T. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, No 1. – P. 265–275.
11. *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом* / Под ред. Г. М. Франка. – Москва: Наука, 1973. – 78 с.
12. *Методы биохимических исследований* / Под. ред. М. И. Прохоровой. – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 234 с.
13. Тимофеев Н. Н. Гипобиоз и криобиоз. Настоящее, прошлое и будущее. – Москва: Информ-Знание, 2005. – 256 с.

Українська лабораторія якості і безпеки
 продукції агропромислового комплексу
 Національного університету біоресурсів
 і природокористування України, Київ

Надійшло до редакції 13.07.2012

Член-корреспондент НААН України **С. Д. Мельничук, В. С. Морозова,
 С. В. Хижняк, В. М. Войцицкий**

Показатели окислительного фосфорилирования митохондрий кардиомиоцитов крыс в условиях искусственного гипобиоза

Исследована дихальна і фосфорилуюча активність митохондрий кардиомиоцитів крыс в умовах штучного гіпобіоза. При використанні двох субстратів окислення (сукцинат і малат) показано зниження швидкості поглинання кисню митохондріями. Встановлено часткове роз'єднання процесу сопряження окислення і фосфорилування при використанні малата, яке не виявлено при використанні сукцината. Ці дані, а також результати дослідження активності ферментів дихальної ланки дозволяють передположити переключення митохондрий кардиомиоцитів на сукцинатний тип тканевого дихання, яке реалізується при різних стрес-реакціях, в тому числі в умовах дослідження.

Corresponding Member of the NAAS of Ukraine **S. D. Melnytchuk, V. S. Morozova,
 S. V. Khyzhnyak, V. M. Voitsitsky**

The oxidative phosphorylation parameters of cardiomyocyte mitochondria of rats under artificial hypobiosis

The respiratory and phosphorylation activities of the mitochondria of cardiomyocytes in rats under artificial hypobiosis are investigated. Using two oxidation substrates (succinate and malate), the decrease of the absorption rate of oxygen by mitochondria is shown. By the use of malate, the partial separation of the coupling of the oxidation and phosphorylation processes in mitochondria is found, that is different from that using succinate. These data and the results of investigation of the activity of respiratory chain enzymes allow us to assume the cardiomyocytes mitochondria switches on the succinate type of the tissue respiration. This type of the tissue respiration is realized under the various stress responses, including the conditions of research.