

10. Меерсон Ф. З., Медведев Л. Н., Голубева Л. Ю., Устинова Е. Е.— Влияние эмоционально-болевого стресса на активность Na, K-АТФазы в сердечной мышце.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1982, № 8, с. 61—64.
11. Микельсаар Х., Северин И. И., Скулачев В. П. Фосфолипиды и окислительное фосфорилирование.— Успехи соврем. биологии, 1974, 78, 3/6, с. 348—370.
12. Мисаковец О. Г., Тимочко М. Ф. Особливості обмінних процесів в тканинах печінки і слизової оболонки тонкого кишечника щурів при дії гідрокортизону.— В кн.: Тез. докл. IV Укр. біохім. з'їзду. Київ, 1982. К.: Наук. думка, 1982, ч. 2, с. 98.
13. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований.— Патол. физиология и эксперим. терапия 1960, № 4, с. 13—16.
14. Панасюк Е. Н., Мысаковец А. Г., Тимочко М. Ф. Сопряженность энергетического и электролитного обмена на клеточном и субклеточном уровнях в тканях пищеварительных органов.— В кн.: Тез. докл. XIV съезда всесоюз. физиол. о-ва им. И. П. Павлова, Баку, 1983, т. 2, с. 20.
15. Тимочко М. Ф., Мисаковец О. Г. Особливості забезпечення електролітного гомеостазу в клітинах з різним рівнем енергетичного обміну.— В кн.: Тез. доп. XI з'їзду укр. фізіол. т-ва К.: Наук. думка, 1982, с. 408.
16. Тимочко М. Ф. Залежність розвитку компенсаторних процесів від рівня енергетичного обміну.— Там же, с. 407.
17. Усов А. Н., Погодаев К. П. Универсальные номограммы для вычисления и методы определения активности реакций и ОВП биологических жидкостей.— М.: Наука, 1956.—125 с.
18. Холлер Дж. Однослойные и суспензионные культуры клеток.— В кн.: Методы вирусологии и молекулярной биологии. М.: Мир, 1972, с. 9—19.
19. Шаргородский Б. М., Расторгуев Б. П. Измерение и динамическая регистрация окислительно-восстановительного потенциала миокарда на животных *in vivo*.— Биофизика, 1965, 10, вып. 4, с. 652—656.
20. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen analyse.— Weinheim; Verlag Chemie, 1974, vol. 2, S. 2178—2182.
21. Sedgwick E. G., Macleod R. A. Energy coupling to K⁺ transport in marine bacterium.— Can. J. Biochem., 1980, 58, N 10, p. 1206—1214.
22. Whittam R. The independence of metabolism and active transport.— In: The cellular functions of membrane transport/Ed. J. F. Hoffman. New Jersey: Prentice-Hall, 1964, p. 139—154.

Львов. мед. ин-т

Поступила 10.10.83

УДК 577.171.55

А. М. Бабский, М. Н. Кондрашова, И. В. Шостаковская

ДЕЙСТВИЕ И ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ АДРЕНАЛИНА НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Стимуляция адреналином энергетического обмена в организме известна давно [14, 21 и др.]. Собран обширный материал по изучению влияния катехоламинов на энергетические процессы в митохондриях. В некоторых публикациях описано варьирующее от работы к работе умеренное стимулирующее действие адреналина на дыхание [6, 10, 20], транспорт ионов Ca²⁺ [10, 15] и активность ферментов [6, 9, 11] в митохондриях различных тканей. Однако резкие хорошо воспроизводимые эффекты влияния этого гормона на исследуемые процессы не выявлены. В отличие от адреналина введение животному его синергиста глюкагона вызывает четко выраженный стимулирующий эффект на фосфорилирующее дыхание митохондрий печени и активность ключевого митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы [15, 19—21, 23]. Это дало основание признавать наличие глюкагоновой регуляции митохондриальных функций [19].

Мы считаем, что недостаточная выраженность действия адреналина после инъекции на митохондрии обусловлена неадекватными условиями выделения и исследования митохондриальных препаратов. В настоящей работе при соблюдении специальных условий работы с митохондриями выявлено четкое влияние внутрибрюшинной инъекции крысам адреналина в дозе 25 мкг/100 г на дыхание митохондрий печени через 15, 30 мин и 3 ч после введения гормона.

Методика. Возможность выявления различных воздействий на организм, в том числе и адреналина, определяется условиями работы с митохондриями. В лаборатории функциональной биофизики митохондрий Института биологической физики АН СССР был разработан и успешно используется специальный комплекс условий [5], при соблюдении которых изолированные митохондрии лучше сохраняют нативные свойства, чем при выделении обычным способом. Важное значение при этом придается обеспечению физиологического состояния покоя животных.

В экспериментах использовали крыс-самцов линии Вистар массой 200—220 г. Крыс забивали декапитацией. Печень охлаждали 10 мин в среде гомогенизации. Ткань измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера—Эльвегейма. Среда гомогенизации содержала 250 ммоль сахарозы и 10 ммоль трис-буфера (pH 7,4). Из 10 % гомогената центрифугированием осаждали фракцию ядер поэтапно: 3 мин при 150 g и 4 мин при 330 g без остановки центрифуги. Митохондриальную фракцию получали центрифугированием супернатанта в течение 10 мин при 4500 g. Полученный осадок не промывали. Митохондрии разводили средой гомогенизации до концентрации 70—90 мг белка в 1 мл.

Выделенные таким способом митохондрии из животных в состоянии покоя имеют меньшую скорость фосфорилирующего дыхания, чем при выделении обычными способами. Однако при сравнении их с митохондриями, полученными от возбужденных животных, обнаруживается заметное увеличение скорости, плохо выявляемое при использовании обычных методов.

Адреналин вводили внутривенно за 15, 30 мин и 3 ч до забоя в дозе 25 мкг адреналина на 100 г массы. Укол контролировали введением 0,5 мл 0,9 % раствора NaCl. Митохондрии, выделенные из животных, которым вводили физраствор, считались контрольными, адреналин — опытными.

Влияние адреналина на энергетический обмен оценивали путем полярографической регистрации дыхания митохондрий с использованием открытого платинового электрода [7]. Среда инкубации содержала (в ммоль): сахарозу — 150, KCl — 50, KH_2PO_4 — 3, трис-буфер — 5, MgCl_2 — 3, сукцинат — 6, pH 7,4. В среду (объем ячейки 1 мл) вносили 4—5 мг митохондриального белка. Соответственно условиям инкубации добавляли: исоцитрат — 3 ммоль, АДФ — 200 мкмоль, CaCl_2 — 200 мкмоль. Температура инкубации 26 °C. Исследовали влияние введения адреналина на скорость контролируемого дыхания покоя при окислении добавленного субстрата (V_4), скорость активного дыхания (V_3) при фосфорилировании АДФ и транспорте ионов Ca^{2+} , скорость фосфорилирования ($V_{\text{ф}}$) и транспорта Ca^{2+} (V_{Ca}). Определяли также дыхательный контроль (V_3/V_4), эффективность фосфорилирования ($\text{АДФ}/\text{O}$) и транспорта Ca^{2+} (Ca/O) в митохондриях. Абсолютные скорости дыхания выражали в нг-атомах $\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{мг}$ белка, скорость фосфорилирования в ммоль АДФ/мин·мг белка, скорость транспорта Ca^{2+} в ммоль $\text{Ca}^{2+}/\text{мин} \cdot \text{мг}$ белка. Белок определяли по Лоури [17]. Результаты обработки полярограмм представлены в форме диаграмм и таблицы.

Забой и выделение митохондрий контрольного и опытного животных проводили одновременно, а измерения — поочередно для аналогичных проб обеих суспензий. Учитывая реактивность исследуемой системы и тонкость наблюдаемых физиологических изменений, использовали метод парных сравнений контрольных и опытных показателей [3]. Опыты проводили в сжатый календарный срок. В таблице представлено также среднеквадратичное отклонение, достоверность вычислялась методом парных сравнений.

Результаты и обсуждение. При работе в адекватных для физиологических исследований митохондрий условиях удалось выявить отчетливое действие адреналина на дыхание митохондрий как в начальные (15 и 30 мин), так и в отдаленные (3 ч) («последствие») сроки после введения. Полученные экспериментальные данные представлены в таблице и на рисунках. Наиболее чувствительным к адреналину оказалось дыхание митохондрий при окислении добавленного энергетического субстрата сукцината, стимулированное АДФ или Ca^{2+} . Из таблицы видно, что через 15 и 30 мин после введения адреналина скорость фосфорилирующего дыхания повышалась по сравнению с контролем на 28 %. На рис. 1 это отражено на диаграммах 1 и 2 подъемом этой скорости (незаштрихованная часть) выше контрольного уровня, обо-

значенного пунктиром. Скорость дыхания контролируемого состояния покоя у митохондрий крыс, которым вводили адреналин за 15 мин до забоя, достоверно от контроля не отличалась, а через 30 мин повышалась на 18 %. При этом повышение скоростей дыхания митохондрий после инъекции животному адреналина не сопровождалось разобщением окисления и фосфорилирования: показатели дыхательного контроля и АДФ/О повышались или были лишь немного ниже контрольных. В этих условиях наблюдалось повышение скорости фосфорилирования через

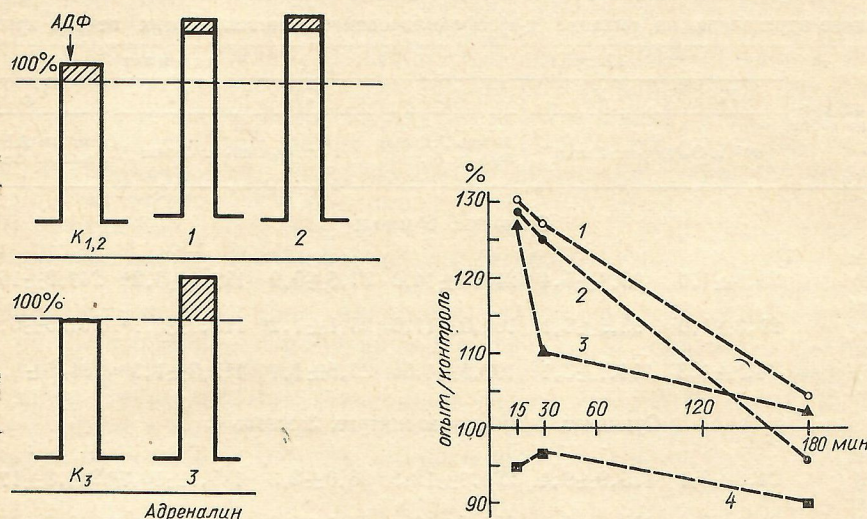


Рис. 1. Развитие оксалоацетатного торможения при активации адреналином фосфорилирующего дыхания в митохондриях печени крысы.

Незаштрихованная часть — уровень фосфорилирующего дыхания при окислении сукцината, заштрихованная — величина оксалоацетатного торможения. Добавки АДФ по 200 мкмоль. Время от введения до забоя животного (контроль): $K_{1,2}$ — 15 и 30 мин, K_3 — 3 ч; адреналина: 1 — 15 мин, 2 — 30 мин, 3 — 3 ч.

Рис. 2. Действие адреналина на стимулированное ионами Ca^{2+} дыхание митохондрий печени крысы.

По вертикали — соотношение опыт/контроль, в %; по горизонтали — время от введения адреналина до забоя животного. Субстрат — сукцинат 6 ммоль. Добавки CaCl_2 по 200 мкмоль. 1 — скорость стимулированного Ca^{2+} дыхания, 2 — скорость транспорта Ca^{2+} , 3 — дыхательный контроль (V_3/V_4), 4 — соотношение Ca/O .

15 и 30 мин после введения адреналина на 16 и 13 %, соответственно. Эти данные подтверждают полученные нами ранее результаты при регистрации скорости фосфорилирования рН-метрическим методом.

Через 3 ч после введения адреналина в митохондриях печени стимуляция дыхания не наблюдалась. Можно было думать, что эффект активации иссяк. Однако из исследований адаптационного синдрома при продолжительных воздействиях на организм известно, что активация окисления сукцината сменяется оксалоацетатным торможением, которое ограничивает эффект стимуляции [2, 4]. Возникло предположение, что отсутствие эффекта активации дыхания в митохондриях через 3 ч после введения адреналина кажущееся и «замаскировано» развившимся оксалоацетатным торможением. Для проверки этого предположения в среду инкубации совместно с сукцинатом добавляли изоцитрат, который снимает оксалоацетатное торможение сукцинатдегидрогеназы [4]. Лучше всего уровень этого торможения выявляется в метаболическом состоянии 3 (V_3) по Чансу [12]. Из рис. 1 видно, что через 15 и 30 мин после введения адреналина торможение (заштрихованная часть диаграмм 1 и 2), т. е. «замаскированная» оксалоацетатом активация незначительна и даже ниже контроля. На контрольных митохондриях здесь сказывается, вероятно, возбуждение, вызванное уколom. Зато через 3 ч уровень торможения у контрольных митохондрий минимален (диаграмма K_3) и на этом фоне четко проявляется оксалоацетатное торможение (23 %), вызванное введением адреналина

(диаграмма 3). Это замаскированное при обычных исследованиях явление мы назвали эффектом последействия адреналина. Оно может возникнуть в рамках внутриклеточных превращений по принципу отрицательной обратной связи [4] при торможении окисления сукцината оксалоацетатом, образующимся при превращениях цикла Кребса из сукцината. Возможно участие в этом и гормональной системы: есть основания полагать, что продукты окисления биогенных аминов могут ингибировать сукцинатдегидрогеназу [2].

Влияние адреналина на дыхание и фосфорилирование в митохондриях печени крыс

Время от введения до забоя	Контроль			Адреналин		
	V_4	V_a	V_{Φ}	V_4	V_a	V_{Φ}
	нг-ат. O_2 /мин·мг белка	нг-ат. O_2 /мин·мг белка	ммоль АДФ/мин·мг белка	нг-ат. O_2 /мин·мг белка	нг-ат. O_2 /мин·мг белка	ммоль АДФ/мин·мг белка

Сукцинат, 6 ммоль

15 мин (n=6)	23,3±1,0	99,4±5,4	213,3±14,0	23,5±0,9	127,4±6,2*	247,2±15,8*
30 мин (n=5)	21,3±1,0	93,9±5,1	169,0±11,0	25,1±1,2*	119,9±3,1*	201,5±6,9*
3 часа (n=5)	24,1±1,3	114,1±3,1	197,5±4,5	26,5±1,1	115,9±1,3	184,2±4,2*

Сукцинат, 6 ммоль + изоцитрат, 3 ммоль

15 мин (n=6)	24,8±3,1	115,9±9,4	222,3±12,3	28,0±2,3	135,7±10,7*	244,3±17,6
30 мин (n=5)	24,0±2,2	108,0±5,6	201,0±10,4	28,1±2,0	131,6±10,6*	240,8±15,4*
3 часа (n=4)	25,4±0,9	112,4±3,1	172,5±3,3	26,0±2,1	141,6±9,3*	203,9±16,7*

*—разница по сравнению с контролем статистически достоверна ($p < 0,05$); n—количество опытов.

Описанный эффект действия адреналина на дыхание митохондрий четко проявляется при исследовании Ca^{2+} стимулированного дыхания. Добавка к суспензии митохондрий в полярографической ячейке $CaCl_2$ вызывает стимуляцию дыхания, пропорциональную скорости транспорта Ca^{2+} через митохондриальную мембрану [16]. Из рис. 2 видно, что через 15 и 30 мин после введения адреналина наблюдается отчетливая активация в сравнении с контролем скорости дыхания митохондрий при транспорте Ca^{2+} (1) и самого транспорта ионов кальция (2). К 3 ч эффект активации по этим показателям исчезал. Наблюдаемые изменения происходили без признаков разобщения окисления сукцината и транспорта Ca^{2+} : дыхательный контроль у опытных митохондрий в начальные периоды действия гормона повышался (3), а соотношение Ca/O (4) лишь немного снижалось в сравнении с контрольными показателями.

Таким образом, наблюдается четкое влияние адреналина на функционирование митохондрий печени: активация дыхания, фосфорилирования и транспорта Ca^{2+} в начальные периоды действия гормона (15 и 30 мин) и исчезновение эффекта активации, развитие оксалоацетатного торможения к 3 ч после введения.

Рассмотренные здесь митохондриальные реакции на введение адреналина поддерживались энергией окисления сукцината. Ранее указывалось на обязательное участие этой энергетически мощной системы в синдроме адаптации [16, 18], где она обеспечивает повышенные энергетические затраты организма. Вероятно, моделирование стресса введением животному «гормона тревоги» в дозе, превышающей нормально физиологическую, тоже вызывает в митохондриях сходные реакции.

Г. Селье разделял адаптационные механизмы на два типа — кататоксические, ответственные за активное сопротивление раздражителю, и синтоксические, обеспечивающие пассивную устойчивость [8]. К подобной двухфазной динамике ответа живых систем на раздражение давно привлекал внимание Н. Введенский [1]. Двухфазная реакция проявляется и в динамике адаптационного синдрома, который инициируется катехоламинами; она выявляется и при исследовании адаптации многих физиологических систем [13]. Снижение ответной реакции во время раздражения является важным свойством биологических систем. Оно представляет собой синтоксическую реакцию и обеспечивает сосуществование с раздражителем, повышая пассивную устойчивость за счет снижения активных реакций. На уровне митохондрий, как показали представленные нами, а также другие исследования [2, 4], функцию синтоксической реакции может выполнять торможение сукцинатдегидрогеназы, предупреждая гиперактивацию окисления сукцината, играющую роль кататоксической реакции.

В заключение следует еще раз отметить, что описанные эффекты выявлены нами при использовании адекватного метода работы с митохондриями, который позволяет регистрировать тонкие регуляторные действия гормонов в клетке. Вероятно, стимулирующий эффект глюкогона на митохондриальное дыхание [15, 19—21, 23] сильнее и проявляется при обычных методах работы с митохондриями. Представленные в настоящей статье результаты и данные других авторов [6, 9—11, 15, 20] подтверждают вывод о существовании отчетливой регуляции митохондриальных процессов со стороны симпато-адреналовой системы.

A. M. Babsky, M. N. Kondrashova, I. V. Shostakovskaya

EFFECT AND AFTEREFFECT OF ADRENALIN ON THE RESPIRATION OF RAT LIVER MITOCHONDRIA

Under special conditions of work with isolated mitochondria which provide their best correspondence to the state of the organism the pronounced effect of adrenalin on energetic processes in mitochondria is revealed. Intraperitoneal administration of adrenalin in a dose of 25 μg / 100 g into rats induces a clearcut increase of ADP- and Ca^{2+} -stimulated respiration as well as the rate of oxidative phosphorylation and Ca^{2+} transport through mitochondrial membrane, when succinate is used as the substrate. Inhibition of succinate oxidation by oxaloacetate or possibly by products of biogenic amine oxidation which masks the activation effect (aftereffect) is developed in mitochondria 3 hours after injection of the hormone.

Institute of Biological Physics,
Academy of Sciences, USSR, Pushchino

Список литературы

1. Введенский Н. Е. Полное собрание сочинений.— Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1951.— Т. 1—6.
2. Григоренко Е. В. Обращение отрицательными аэроионами изменений дыхания митохондрий мозга крыс при стрессе.— В кн.: V респ. конф. мол. ученых-химиков. Таллин, 1983, с. 46—47.
3. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов.— Л.: Медицина, 1978.—296 с.
4. Кондрашова М. Н. Возможное биологическое значение ограничения окисления сукцината щавелевоуксусной кислотой.— В кн.: Митохондрии. М.: Наука, 1969, с. 23—40.
5. Кондрашова М. Н., Григоренко Е. В., Гузар И. Б., Окон Е. Б. Снятие отрицательными аэроионами изменений дыхания митохондрий при стрессе.— Биофизика, 1981, 26, № 4, с. 687—691.
6. Кулинский В. И., Кунцевич А. К., Труфанова Л. В. Активация дегидрирования сукцината в печени крыс под влиянием норадреналина, цАМФ и острого охлаждения.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1981, № 8, с. 33—34.
7. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом.— М.: Наука, 1973.—221 с.
8. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960, 254 с.