

М.М.Доліба, С.К.Гордій, В.М.Коробов

Вплив гіпоксичної гіпоксії на енергетичний обмін у мітохондріях печінки та вміст ацетилхоліну в різних тканинах

Установлено, что в первые сутки воздействия гипоксической гипоксии (7000 м) снижается содержание ацетилхолина в тканях печени, сердца и поджелудочной железы крысы, а в митохондриях печени активируется окисление сукцината. С 7-х суток адаптации в тканях возрастает уровень ацетилхолина и это совпадает с активацией в митохондриях печени окисления НАД-зависимого субстрата α -кетоглутарата и значительным увеличением эффективности окислительного фосфорилирования. Эффект увеличивается к 12-16-м суткам адаптации животных. Указывается на важную роль ацетилхолина в формировании неспецифической адаптационной реакции организма к гипоксии.

Вступ

У літературі широко представлені дані щодо впливу гіпоксії на енергетичні процеси в клітинах і мітохондріях [4, 7, 13, 15, 17]. Проте більшість робіт присвячені дослідженню змін енергетичного обміну під час разової гострої гіпоксії [4, 13, 17]. Автори відмічають, що за цих умов у мітохондріях збільшується вміст і окислення сукцинату. Цей субстрат більш інтенсивно окислюється і дає швидкий приріст концентрації АТФ [4]. Однак це, на нашу думку, не може відігравати вирішальну роль у неспецифічній адаптаційній реакції організму при довготривалій дії гіпоксії. Окислення сукцинату потребує надмірного споживання кисню, який за умов гіпоксії виступає лімітуючим фактором. Дослідженнями останніх років [11], проведених *in vivo* з використанням ядерно-магнітного резонансу (ЯМР), показано що між концентрацією кисню в крові та швидкістю його споживання для потреб окисного фосфорилування існує чітка кореляція, незважаючи на низьку величину K_m за киснем для ізольованої цитохромоксидази (1 мкмоль/л) [15, 16]. Відомо також, що посилене поглинання кисню, яке спостерігається за умов гіпоксії, стимулює перекисне окислення ліпідів [8]. Це в свою чергу може призводити до структурних порушень мембран і розвитку патологічних процесів в організмі.

У літературі чітко не представлені також дані щодо зіставлення змін у нейрогуморальному статусі організму зі змінами в окисненні субстратів у мітохондріях у процесі адаптації тварин до гіпоксії. Вивченню цих проблем присвячена наша робота.

Методика

Дослідження проведені на щурах-самцях масою 180 г. Тварин попередньо розподіляли на високо- та низькорезистентних до гіпоксії. В дослідках використовували високорезистентних до гіпоксії щурів. Тварин витримували в барокамері, де створювали парціальний тиск кисню 32 мм рт.ст., що відповідає висоті 7000 м. Тривалість перебування тварин у барокамері за першу добу становила 3 год, наступні доби - 4 год. Декапітацію тварин і виділення мітохондрій здійснювали через 24 год після останнього сеансу гіпоксичної гіпоксії. Мітохондрії виділяли методом диференціального центрифугування за загальноприйнятими схемами з модифікаціями, які забезпечують збереження їх нативного стану [6]. Дихання і окисне фосфорилування в мітохондріях вивчали полярографічним методом [9]. Середовище інкубації для мітохондрій містило (в ммоль/л): сахарозу-150, KCl-50, KH_2PO_4 -1, тріс-NCl-3, (pH 7,4). Дихання мітохондрій вимірювали в різних метаболічних станах: V_2 і V_4 - швидкості контрольованого дихання, V_3 - швидкість АДФ-стимульованого дихання, і представляли в формі діаграм, одержаних після комп'ютерної обробки полярограм. Вміст ацетилхоліну в тканинах серця, печінки і підшлункової залози визначали за методом Hestrin [12].

Результати та їх обговорення

При вивченні змін в енергетичному обміні в мітохондріях у процесі адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії ми застосовували раніше розроблені методичні підходи [6, 10], направлені на виявлення вкладу окислення окремих субстратів у загальне поглинання кисню.

На рис. 1 представлена динаміка змін дихання та окисного фосфорилування в мітохондріях печінки щура порівняно зі змінами вмісту ацетилхоліну в тканині печінки, серця та підшлункової залози щурів. Видно, що за перші дві доби адаптації тварин до гіпоксії має місце активація окислення в мітохондріях сукцинату, що проявляється в істотному підвищенні швидкості АДФ-стимульованого дихання при окисненні цього субстрату. В той же час не спостерігається вірогідних змін в окисненні НАД-залежного субстрату α -кетоглутарату, а також інших НАД-залежних субстратів. Одночасно зменшується вміст ацетилхоліну в тканинах печінки, серця і підшлункової залози, що очевидно вказує на превалювання активності в даний період симпатoadреналової системи. Однак, починаючи з 7-ї доби адаптації, відмічені процеси істотним чином змінюються: в тканинах печінки і серця значно збільшується вміст ацетилхоліну, а в мітохондріях розвивається активація окислення іншого субстрату циклу трикарбонових кислот (ЦТК) - α -кетоглутарату. Характерна для перших діб впливу гіпоксії активація окислення сукцинату відсутня, а в деяких експериментах спостерігається навіть гальмування його окислення. Посилення АДФ-стимульованого дихання при окисненні α -кетоглутарату на 7-, 12- і 16-ту доби адаптації становить 16, 38 і 46 %, відповідно. У

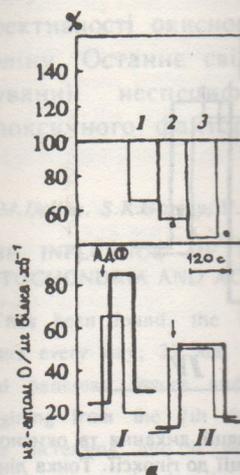


Рис. 1. Порівняльний аналіз підшлункової залози: (3) адаптації щурів до гіпоксії доби. Верхня частина - г дихання мітохондрій в ріс цинат (0,35 ммоль/л); II тварин; жирна - піддани холіну ($P < 0,05$).

мітохондріях печінк час фосфорилуванн (див. рис. 1), що (АДФ/Δt) окисного Важливою стороно коефіцієнту спряже на 30-40 %. На п ного фосфорилуван ного контролю (V_3 відповідно. Слід ві інших субстратів Ц окислення α -ке амінотрансферазних адаптації тварин мітохондрій суміші мату - субстратів, ренням α -кетоглута процесів при ад амінострасфераз - суміші пірувату та стерігається чітка повністю усувається (2, 4). Очевидно, амінотрансферазний

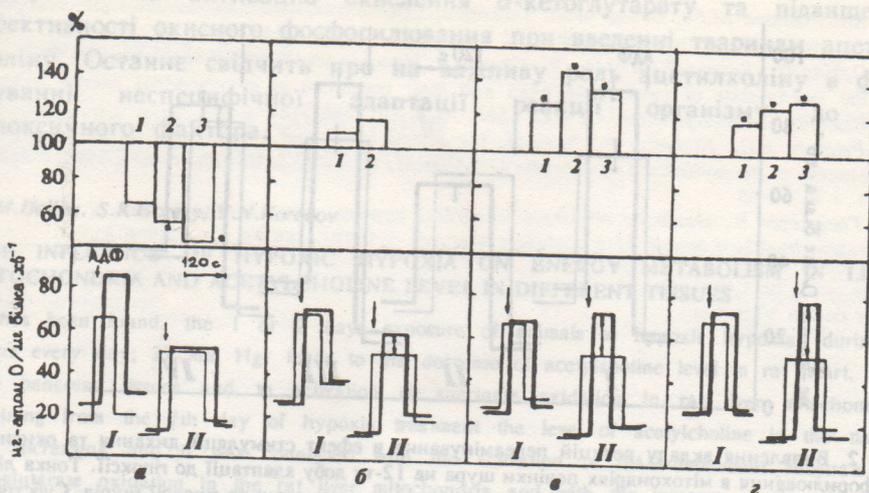


Рис. 1. Порівняльний аналіз змін вмісту ацетилхоліну в тканинах печінки (I), серця (II) і підшлункової залози (З) зі змінами в окисленні субстратів у мітохондріях печінки в процесі адаптації щурів до гіпоксичної гіпоксії (7000 м) за 1-2-гу (а), 7-8-му (б), 12-ту (в), 16-ту (г) доби. Верхня частина - процентні зміни вмісту ацетилхоліну, нижня - діаграми швидкостей дихання мітохондрій в різних метаболічних станах за Чансом. Субстрати окислення: I - сукцинат (0,35 ммоль/л); II - α -кетоглутарат (1 ммоль/л). Тонка лінія - мітохондрії контрольних тварин; жирна - підданих впливу гіпоксії. Зірочками відмічено вірогідні зміни вмісту ацетилхоліну ($P < 0,05$).

мітохондріях печінки адаптованих до гіпоксії щурів значно зменшений час фосфорилування добавленої АДФ при окисленні α -кетоглутарату (див. рис. 1), що відображається у значному підвищенні інтенсивності (АДФ/Δl) окисного фосфорилування (154 %, 12-та доба адаптації).

Важливою стороною змін енергетичного обміну є значне підвищення коефіцієнту спряження дихання та окисного фосфорилування АДФ/О на 30-40 %. На підвищення коефіцієнта спряження дихання та окисного фосфорилування в мітохондріях вказує також підвищення дихального контролю (V_3/V_4) на 9, 45 і 53 % на 7-, 12- і 16-ту доби, відповідно. Слід відмітити відсутність вірогідних змін при окисленні інших субстратів ЦТК. Ми припустили, що така вибіркова стимуляція окислення α -кетоглутарату можлива внаслідок активації амінотрансферазних реакцій. Участь процесів переамінування під час адаптації тварин до гіпоксії оцінювали в дослідях при додаванні до мітохондрій суміші глутамату та малату, а також пірувату та глутамату - субстратів, які включаються у процес переамінування з утворенням α -кетоглутарату [5]. З метою ідентифікації участі вказаних процесів при адаптації до гіпоксії використовували інгібітор амінотрансфераз - амінооксиацетат. Як видно з рис. 2, при окисленні суміші пірувату та глутамату, а також глутамату і малату (3) спостерігається чітка активація АДФ-стимульованого дихання, яка повністю усувається інгібітором переамінування - амінооксиацетатом (2, 4). Очевидно, що в даному випадку амінооксиацетат перериває амінотрансферазний шлях утворення α -кетоглутарату, а, як було по-

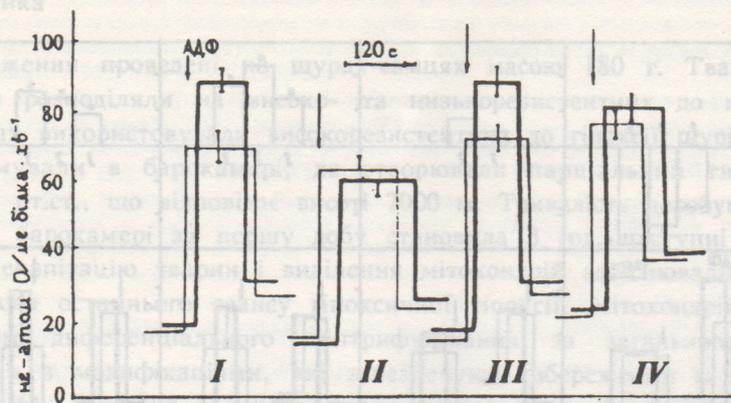


Рис. 2. Виявлення вкладу реакцій переамінування в ефект стимуляції дихання та окисного фосфорилювання в мітохондріях печінки шура на 12-ту добу адаптації до гіпоксії. Тонка лінія - дихання мітохондрій контрольних тварин, жирна - адаптованих до гіпоксії шурів. Субстрати окислення: I - піруват (3 ммоль/л) і глутамат (3 ммоль/л), II - піруват, глутамат і амінооксиацетат (1 ммоль/л), III - глутамат (3 ммоль/л) з малатом (2,5 ммоль/л), IV - глутамат, малат і амінооксиацетат (1 ммоль/л).

казано вище, окислення саме цього субстрату активується на 7-16 доби адаптації тварин до гіпоксії.

Таким чином, виявлені в процесі адаптації тварин до гіпоксії зміни в нейрогуморальному статусі організму корелюють зі змінами в окисленні субстратів у мітохондріях. Очевидно, в перші доби адаптації гіпоксичний фактор виступає для тварин стресовим з підвищенням активності симпатoadреналової системи. В цей період має місце активація окислення сукцинату - субстрату, який активується під впливом катехоламінів [2] і який забезпечує підвищення синтезу АТФ при зниженому коефіцієнті корисної дії (ефективність окисного фосфорилювання при цьому знижується). Однак при багаторазовому повторенні впливу гіпоксичного фактора розвивається пристосування енергетичного обміну до нестачі кисню. Виходячи з наших досліджень, воно полягає в значному підвищенні ефективності окисного фосфорилювання, що дає можливість активувати синтез АТФ без надмірного поглинання кисню. Механізм підвищення ефективності спряження дихання та окисного фосфорилювання полягає, на нашу думку, в наступному: «шунтуванні» циклу трикарбонових кислот внаслідок активації амінотрансферазних реакцій і вибіркової активації окислення α -кетоглутарату, що призводить до включення в роботу всіх пунктів спряження. Інтенсифікація окислення α -кетоглутарату веде до посилення субстратного фосфорилювання та синтезу ГТФ [14], необхідного для синтетичних анаболічних процесів. З цим, очевидно, пов'язане підвищення маси тіла тварин, адаптованих до гіпоксії [1].

Одержані результати вказали на кореляцію між вмістом ацетилхоліну та окисленням α -кетоглутарату, а також зв'язаним з ним підвищенням ефективності окисного фосфорилювання. Цей факт добре узгоджується з нашими попередніми дослідженнями [3, 10, 14], де

вказується на ефективності окислення холіну. Останнє спостереження в процесі адаптації до гіпоксії несподівано вказує на вплив гіпоксичного фактора на окислення холіну.

N.M.Doliba, S.K.Gord

THE INFLUENCE OF MITOCHONDRIA AN

It has been found, that the rate of oxygen consumption in liver mitochondria of mice adapted to hypoxia for 12 days was increasing and that the rate of ketoglutarate oxidation was increasing. The important role of oxidative phosphorylation in the adaptation of the organism to hypoxia

I.Franko University, Lviv, Ministry of Public Edu

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ариавский И.А. *Синтез АТФ*. - М.: Наука, 1978. - С. 301-306.
2. Бабский А.М., Коваленко В.И. *Катехоламины на дыхании*. - М.: ИИИФ АМН СССР, 1978. - С. 301-306.
3. Дбаг Мрван, Долба Н.М. *Влияние гипоксии на окисление сукцината*. - М.: ИИИФ АМН СССР, 1978. - № 4. - С. 68-74.
4. Кондрашова М.Н. *Адаптация к гипоксии*. - М.: ИИИФ АМН СССР, 1978. - С. 388-404.
5. Кондрашова М.Н. *Влияние гипоксии на синтез АТФ*. - М.: ИИИФ АМН СССР, 1978. - С. 388-404.
6. Кондрашова М.Н. *Влияние гипоксии на синтез АТФ*. - М.: ИИИФ АМН СССР, 1978. - С. 388-404.
7. Лукьянова Л.Д. *Биохимические подходы к их фармакологическим состояниям*. - М.: Медицина, 1978. - С. 388-404.
8. Меерсон Ф.З. *Патология сердца*. - М.: Медицина, 1978. - С. 388-404.
9. *Руководство по физиологии*. - М.: Г.М.Франка, 1978. - С. 388-404.
10. Шостаковская И.И. *Влияние гипоксии на синтез АТФ*. - М.: ИИИФ АМН СССР, 1978. - С. 388-404.
11. Hampson N.B., Campbell S.M. *J. Appl. Physiol.* - 1978. - 44: 1000-1005.
12. Hestrin S. *The reaction of acetylcholine and its analytical application*. - M.: I.I. Franko University, 1978. - С. 388-404.
13. Hohl C., Oestreich L. *Biophys. J.* - 1987. - 52: 1000-1005.

вказується на активацію окислення α -кетоглутарату та підвищення ефективності окисного фосфорилювання при введенні тваринам ацетилхоліну. Останнє свідчить про важливу роль ацетилхоліну в формуванні неспецифічної адаптації реакції організму до дії гіпоксичного фактора.

N.M.Doliba, S.K.Gordiy, V.N.Korobov

THE INFLUENCE OF HYPOXIC HYPOXIA ON ENERGY METABOLISM IN LIVER MITOCHONDRIA AND ACETYLCHOLINE LEVEL IN DIFFERENT TISSUES

It has been found, the 1 or 2 days exposure of animals to hypoxic hypoxia (during 4 hours every day; 32 mm Hg) leads to the decrease of acetylcholine level in rat heart, liver and pancreas tissues and to activation of succinate oxidation in rat liver mitochondria. Beginning from the 7th day of hypoxia treatment the level of acetylcholine in the tissues was increasing and it was connected with the activation of NAD-dependent substrate α -ketoglutarate oxidation in the rat liver mitochondria and with the increase of the efficiency of oxidative phosphorylation. The effect increases to the 12-16-th day of animal adaptation. The important role of acetylcholine in formation of nonspecific adaptation reactions of organism to hypoxia has been shown.

I.Franko University, Lviv,
Ministry of Public Education of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ариавский И.А.* Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. - М.: Наука, 1982. - 270 с.
2. *Бабский А.М., Кондрашова М.Н., Шостаковская И.В.* Действие и последствие адреналина на дыхание митохондрий печени крысы // Физиол. журн. - 1985. - 31, № 3. - С. 301-306.
3. *Дбаг Мрван, Долиба Н.М., Кондрашова М.Н., Шостаковская И.В.* Действие ацетилхолина на окисление субстратов в митохондриях сердца // Укр. биохим. журн. - 1991. - 63, № 4. - С. 68-74.
4. *Кондрашова М.Н.* Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке как механизм адаптации к гипоксии // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний: Сб. тр. - М.: НИИФ АМН СССР, 1989. - С. 51-66.
5. *Кондрашова М.Н.* Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. - 1991. - 56, № 3. - С. 388-404.
6. *Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В.* Проявление стресса на уровне митохондрий, их стимуляция гормонами // Журн. общ. биологии. - 1985. - 36, № 4. - С. 516-526.
7. *Лукьянова Л.Д.* Биоэнергетические механизмы формирования гипоксических состояний и подходы к их фармакологической коррекции // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний: Сб. тр. - М.: НИИФ АМН СССР, 1989. - С. 11-14.
8. *Меерсон Ф.З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. - М.: Медицина, 1984. - 260 с.
9. *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом* / Под ред. Г.М.Франка. - М.: Наука, 1973. - 221 с.
10. *Шостаковская И.В., Долиба М.Н., Гордий С.К. и др.* Активация ацетилхолином окисления α -кетоглутарата в митохондриях печени // Укр. биохим. журн. - 1986. - 58, № 5. - С. 54-61.
11. *Hampson N.B., Camporesi E.M., Stolp B.W. et al.* Regulation of O₂ consumption in brain // J.Appl. Physiol. - 1990. - 69. - P. 907-913.
12. *Hestrin S.* The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application // J.Biol. Chem. - 1949. - 180, № 1. - P. 243-250.
13. *Hohl C., Oestreich R., Rosen P., Wiesner R., Grieshaber M.* Evidence for succinate production by reduction of fumarate during hypoxia in isolated adult rat heart cells // Arch. Biochem. et Biophys. - 1987. - 259, № 2. - P. 527-535.

14. Kondrashova M.N., Doliba M.M. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine // FEBS Lett. - 1989. - 243, № 2. - P. 153-155.
15. Oshino N., Sugano T., Oshino R., Chance B. Mitochondrial function under hypoxia conditions: the steady-state of cytochrome a+a3 and their regulation to mitochondrial energy states // Biochim. et Biophys. Acta. - 1974. - 368, № 3. - P. 298-310.
16. Petersen L.C., Nichollss P., Degh H. The effects of oxygen concentration on the steady-state kinetics of the solubilized cytochrome C oxidase // Biochim. et Biophys. Acta. - 1976. - 452, № 1. - P. 59-65
17. Taegmeyer H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit Papillary muscle // Circulation Research. - 1978. - 43, № 5. - P. 808-815.

Львів. ун-т ім. І.Франка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 01.03.92

УДК 616-089.843+001.6+61

Г.О.Бабенко, Ю.М.Заві

Про роль цинку імунодепресивної

В опытах на мор
вого рациона на
тов кожи, балан
ферментов в кр
карбоангидразы),
(число лимфоцит
рана и бесцинков
трансплантатов
сравнению с конт
трансплантации к
сравнению с конт
абсолютная велич
ка в организме жи
во все исследуемы
как при использо
дается снижение
гидрогеназы, щело
личество циркулир
при введении в ор
рациона.

Вступ

З метою продовже
ганів і тканин ви
препаратів - іму
(азатиоприн) - дер
хімічних імунодеп
болітів. Поряд з
імунокомпетентних
клітин організму, з
кісткового мозку, п
ротної дії першого
рення інозин-5-фос
ження в клітині
внаслідок чого інгі

Дані літератури
цинку, заліза, коба
лейнових кислот б
цинк - специфічни
структурний компо