

С. Д. Мельничук¹, С.В. Хижняк¹, В.С. Морозова¹, Л.І. Степанова²,
А.О. Уманська¹, В.М. Войціцький¹

Енергетична функція мітохондрій кардіоміоцитів щурів за штучного гіпобіозу

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України; ²Київський національний університет імені Тараса Шевченка; E-mail: khs2014@ukr.net

Досліджено вплив штучного вуглекислотного гіпобіозу на функціональну активність мітохондрій кардіоміоцитів щурів (окисного фосфорилування, активності ферментів електронно-транспортного ланцюга) та структурного стану внутрішньої мембрани мітохондрій. Зменшення дихальної та фосфорилуючої активності мітохондрій вказує на пригнічення поглинання ними кисню в умовах гіпобіозу. Разом з цим для тварин характерна гіперглікемія. Встановлено часткове роз'єднанням процесів спряження окиснення і фосфорилування при запуску ланцюга лише з I комплексу. Це узгоджується зі зниженням на 26,1% щодо контролю НАДН-КоQ-оксидоредуктазної активності внутрішньої мембрани мітохондрій (I комплекс), водночас сукцинатдегідрогеназна (II комплекс) та цитохромоксидазна (IV комплекс) активності не змінювалися. Показана конформаційна модифікація білкових молекул внутрішньої мембрани мітохондрій за гіпобіозу. Зроблено висновок про підтримку в умовах гіпобіозу енергетичної функції мітохондрій кардіоміоцитів, про що свідчить їх АТФ-синтезна активність, чому можливо сприяє структурно-функціональна модифікація внутрішньої мембрани мітохондрій, яка має адаптивний характер.

Ключові слова: штучний гіпобіоз; кардіоміоцити; мітохондрії; електронно-транспортний ланцюг; внутрішня мембрана мітохондрій.

ВСТУП

Формування гіпобіотичного стану призводить до розвитку гіпометаболізму, що супроводжується зниженням енергозабезпечення гоміотермного організму [1, 2]. Основним постачальником енергії акумульованої в АТФ в еукаріотних клітинах є мітохондрії, а їх функціональну активність насамперед забезпечує внутрішня мембрана, яка містить компоненти електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) й зворотну H^+ -АТФазу. Один зі шляхів регуляції процесу окисного фосфорилування та пов'язаного з ним синтезу АТФ у мітохондріях може бути зумовлений структурною модифікацією мембран.

Створення стану штучного гіпобіозу пов'язано з використанням гіпоксигіперкапічних газових середовищ при одночасному

зниженні температури тіла, що призводить до активації адаптивних можливостей організму тварин [3, 4]. Мітохондрії чутливі до будь-якого впливу, включаючи нестачу кисню чи гіпотермію. Мітохондріальний ферментний комплекс міокарда в умовах гіпотермії піддається додатковому навантаженню, що пов'язано з основною роллю серця в системній компенсації зниженої доставки кисню до тканин. Вважається, що гіпотермія характеризується кардіопротекторними властивостями [5].

У гібернантів (при переході до зимової сплячки) у мітохондріях печінки окисне фосфорилування знижується, про що свідчить пригнічення активності IV комплексу ЕТЛ, і це у свою чергу пов'язано з модифікацією фосфоліпідів мітохондріальних мембран [6]. Подібне спостерігається і за

© С.Д. Мельничук, С.В. Хижняк, В.С. Морозова, Л.І. Степанова, А.О. Уманська, В.М. Войціцький

штучного гіпобіозу [7]. Враховуючи, що пригнічення функціональної активності серця при хірургічних втручаннях може досягатись за рахунок гіпотермії [8] чи гіпобіозу [2], що на клітинному рівні призводить до зміни біоенергетичних процесів, дослідження шляхів тривалого зниження функцій серця є однією із важливих задач кардіохірургії.

Метою нашої роботи було дослідження за умов штучного гіпобіозу мітохондріального дихання та активності електронно-транспортного ланцюга у кардіоміоцитах, що є відображенням біохімічних процесів в органі, який забезпечує доставку кисню до тканин.

МЕТОДИКА

У дослідах використано 42 білих безпородних щурів-самців масою 180–200 г. Експерименти проводили відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Тварин поділили на 4 групи: 1-ша – контрольна (інтактні тварини); 2-га – щури, у яких моделювали стан штучного гіпобіозу; 3-тя та 4-та – тварини, яких використовували відповідно через 2 та 24 год після моделювання стану гіпобіозу. Для біохімічних досліджень тварин декапітували.

Стан штучного гіпобіозу створювали за методикою Бахметьєва-Джайя-Анжуса [2, 9]. Для цього тварин поміщали в герметично закриту камеру, об'єм якої становив 3 дм³, при температурі довкілля 3–4 °С. Впродовж 3–3,5 год перебування у камері за таких умов (вплив гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії) у тварин розвивався гіпобіотичний стан. Склад газового середовища в камері контролювали, використовуючи газоаналізатор («АГМ-505»), ректальну температуру тіла – електротермометр, а частоту серцевих скорочень – електрокардіограф типу ЕК1Т-03 М.

Методом диференційного центрифугування отримували мітохондрії кардіоміо-

цитів, з яких – внутрішню мембрану (ВМ) мітохондрій [10]. Вміст білка визначали за Greenberg [11].

Інтенсивність дихання (поглинання кисню) мітохондрій та їх фосфорилування визначали на полярографі (LP-9; Чехословаччина) у термостатованій кюветі з використанням платинового електрода. Полярограми ідентифікували за Чансом [12]. Розраховували швидкість дихання в наступних станах: стан 2 — «вільний» (V_4^S), стан 3 — АДФ-стимульоване дихання, або «активний» (V_3), стан 4 — «контрольований» ($V_4^{ATФ}$), а також V_ϕ — швидкість фосфорилування АДФ, дихальний контроль — ДК ($V_3/V_4^{ATФ}$), ефективність фосфорилування доданого АДФ — АДФ/О та показник, що характеризує активність АТФ-гідролазних реакцій мітохондрій — $V_4^S/V_4^{ATФ}$. Дослідження проведено за використання субстратів – малату чи сукцинату (у кінцевій концентрації 10 ммоль/л), які запускають ЕТЛ з I та II комплексів відповідно.

Вміст глюкози та сечової кислоти в крові визначали на спектрофотометричному аналізаторі «BS-3000 P» («Sinnova»; Китай). Вимірювали активність ферментів дихального ланцюга мітохондрій [13–15] та H^+ АТФази [16].

Конформаційні зміни білкових молекул ВМ кардіоміоцитів оцінювали за гасінням акриламідом триптофанової флуоресценції, а результати представляли використовуючи модифікований графік Штерна-Фольмера [17]. Флуоресцентні дослідження проводили при $\lambda_{zb.}=295$ нм та $\lambda_{fl.}=340$ нм на спектрофлуориметрі (Shimadzu-RF510; Японія).

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці показників оцінювали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час перебування тварин у гіпобіотичній камері контролювали температуру та склад

газового середовища (рис.1, а, б). Розвиток гіперкапнії супроводжувався підвищенням вмісту вуглекислого газу до 18 ± 2 %, а гіпоксії – зниженням вмісту кисню до $3,8 \pm 1$ %. Температура тіла тварин знижувалася з $37,0 \pm 0,2$ до $16,5 \pm 0,7$ °С, а частота серцевих скорочень зменшувалася з 400 ± 15 до 75 ± 15 хв⁻¹ через 3–3,5 год (див. рис.1, а, в). Щури повністю втрачали рухливість, реакцію на больовий подразник, що свідчить про розвиток гіпобіотичного стану. Після досягнення цього стану тварин діставали з гіпобіотичної камери і через 2-2,5 год у них нормалізувалась температура тіла та частота серцевих скорочень (див.рис.1, а, в).

У результаті зниження використання кисню в умовах гіпобіозу потреба компенсації недостатньої ефективності дихання забезпечується внаслідок гіперглікемії. Про це свідчить збільшення у середньому вдвічі вмісту глюкози в крові щурів ($16,8 \pm 1,3$ щодо $8,1 \pm 0,5$ ммоль/л у контролі; $P < 0,05$). Подібне зростання відмічається за гіпоксії

[18] чи гіпотермії [19], що пояснюється підвищенням активності фосфорилази-А, яка стимулює розпад глікогену [19]. Крім того надлишок глюкози може підтримувати рівень утворення АТФ у мітохондріях різних тканин і термогенез [18].

З іншого боку в крові щурів виявлено зменшення вмісту сечової кислоти на 38, 4 % ($105,4 \pm 9,3$ щодо $171,1 \pm 10,0$ мкмоль/л у контролі; $P < 0,05$). Сечова кислота – це кінцевий продукт розпаду пуринових основ, і зниження її вмісту свідчить про зменшення рівня катаболізму пуринових основ, у тому числі за пригнічення синтезу АТФ. У свою чергу пуринові основи є біологічно активними речовинами, які контролюють процеси перебудови організму, як це показано для гібернантів при переході до зимової сплячки та виході з цього стану [20]. Через 24 год після моделювання штучного гіпобіозу вміст глюкози нормалізується, хоча сечової кислоти залишається зниженим (результати не представлено). Отримані результати, а також

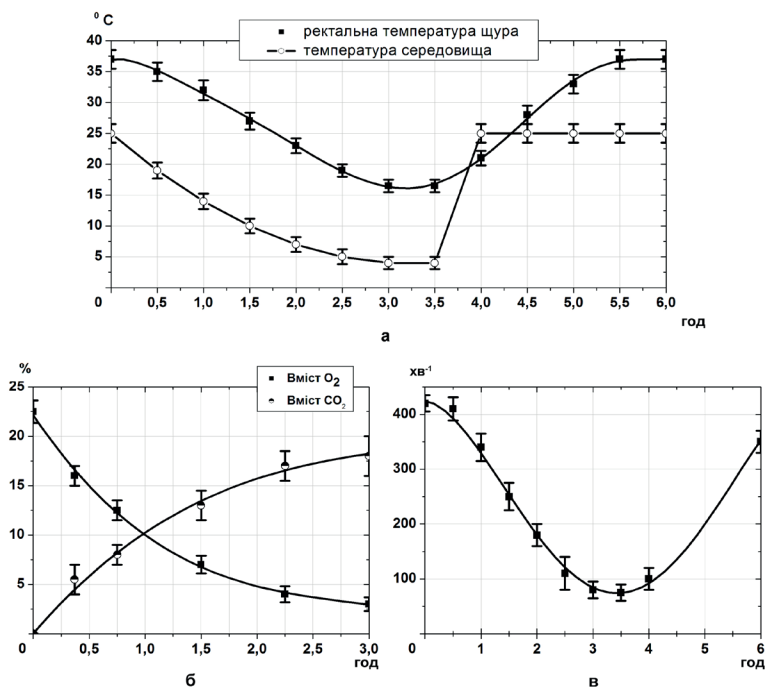


Рис. 1. Температура у гіпобіотичній камері та тіла щурів (а), газовий склад середовища у гіпобіотичній камері (б), частота серцевих скорочень щурів (в) за розвитку гіпобіозу та виходу з цього стану

біохімічні показники крові щурів за гіпобіозу та при виході з нього [21] характеризують адаптивні зміни організму до комплексного впливу гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії.

У формуванні адаптивного стану клітин важливу роль відіграє функціонування мітохондрій [18, 22]. Результати досліджень показників окисного фосфорилування мітохондрій кардіоміоцитів свідчать, що у разі використання малату за гіпобіозу V_4^S зменшується в середньому у 2,4 раза, V_3 – у 2,5 раза, V_4^{ATP} – у 2,0 раза, а V_ϕ – на 52 % щодо контролю. Аналогічні зміни спостерігаються і за використання сукцинату: V_4^S зменшується в середньому у 1,9 раза; V_3 – у 2,1 раза; V_4^{ATP} – у 2,0 раза, а V_ϕ – на 33 % щодо контролю (табл. 1).

Таким чином, в умовах гіпобіозу, запускаючи дихальний ланцюг як з I, так і II комплексу спостерігається зменшення швидкості поглинання кисню мітохондріями кардіоміоцитів. Тобто потік протонів через VM мітохондрій знижується. Ефективність його використання для синтезу АТФ оцінювали за показниками АДФ/О та ДК. В дослідях з використанням малату АДФ/О знижується на 20,1 %, а ДК – на 22,8 % відносно контролю, що свідчить про часткове роз'єднання спряження процесів окиснення та фосфорилування. При цьому знижується гідролізуюча активність H^+ -АТФази, оскільки V_4^S/V_4^{ATP} зменшується на 22 % щодо контролю (рис. 2). У разі

використання сукцинату АДФ/О знижується на 24,4 %, а величини ДК та V_4^S/V_4^{ATP} не змінюються відносно контролю (див. рис. 2), що вказує на ефективність спряження процесів дихання та фосфорилування. Можливо, це пояснюється роллю сукцинатного типу дихання, який реалізується за різних стрес-реакцій для підтримання рівня життя [4].

Визначення активності ферментів VM мітохондрій кардіоміоцитів показано таке. Сукцинат-КоQ-оксидоредуктазна активність VM (II комплекс) в умовах досліду не відрізняється від контролю. НАДН-КоQ-оксидоредуктазна активність VM (I комплекс) за гіпобіозу зменшується на 26,1 % щодо контролю і повертається до контрольних значень при виході з цього стану (табл. 2). Подібне зниження активності відбувається в період зимової сплячки тварин, оскільки, в мозку тварин-гібернантів виявлено інгібітори НАДН-КоQ-оксидоредуктази, які впливають на функціональну активність ізольованого серця жаби [23].

Отримані результати свідчать, що ФАД-залежні субстрати (сукцинат), які використовуються II комплексом, можуть більш інтенсивно утилізуватись, ніж НАД-залежні (малат), які використовуються I комплексом. Тобто в умовах штучного гіпобіозу перевага надається функціонуванню II комплексу ЕТЛ мітохондрій.

Цитохром c оксидоредуктаза (цитохромоксидаза) – термінальна ділянка ЕТЛ,

Таблиця 1. Показники дихальної та фосфорилуючої активності мітохондрій кардіоміоцитів щурів за штучного гіпобіозу ($M \pm m, n = 10$)

Показник	Малат		Сукцинат	
	Контроль	Гіпобіоз	Контроль	Гіпобіоз
Інтенсивність дихання:				
у стані 2 (V_4^S), мккатом O_2 / хв·мг білка	0,052±0,003	0,022±0,003*	0,031±0,005	0,016±0,003*
у стані 3 (V_3), мккатом O_2 / хв·мг білка	0,146±0,012	0,059±0,002*	0,097±0,006	0,047±0,004*
у стані 4 (V_4^{ATP}), мккатом O_2 / хв·мг білка	0,041±0,006	0,021±0,003*	0,022±0,003	0,011±0,002*
Швидкість фосфорилування (V_ϕ), мкмоль АДФ/хв·мг білка	0,493±0,025	0,238±0,017*	0,316±0,032	0,211±0,031*

* $P \leq 0,05$ щодо контролю.

функціонування якої може впливати на весь ланцюг [24]. Цитохромоксидазна активність ВМ мітохондрій в умовах досліду істотно не змінюється щодо контролю. H^+ -АТФазна активність ВМ також не зазнає вірогідних змін (див. табл. 2), що вказує на підтримання енергетичної активності мітохондрій кардіоміоцитів.

Функціонування мембранних систем, в тому числі інтегральних мембранних білків, залежить від їх ліпідного оточення та динамічних властивостей, а регуляція

активності мембранозв'язаних ферментів відбувається на рівні молекулярних взаємодій білкових молекул та анулярних ліпідів (білок-ліпідні взаємодії) [25].

Іntenсивність власної флуоресценції (при $\lambda_{\text{макс.}} = 295 \text{ нм}$) ВМ мітохондрій зростає за гіпобіозу на 40,1 % відносно контролю, що може бути зумовлено конформаційними перебудовами білкових молекул, які супроводжуються переходом триптофанових залишків у більш гідрофобну область [26]. Через 24 год після гіпобіозного стану цей показник повертається до рівня контролю (рис. 3, а).

В умовах досліду спостерігається гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції ВМ мітохондрій. Відсутність зсуву максимуму флуоресценції триптофанілів за гіпобіозу щодо контролю (результати не представлено) може пояснюватись наявністю ефективного переносу енергії між триптофанілами в гетерогенній популяції, яке зумовлює однакове гасіння їх флуоресценції, оскільки відомо, що зсув піку емісії відбувається лише за жорстких денатуруючих умов [26].

Як розраховано з модифікованого графіка Штерна-Фольмера, за гіпобіозу не змінюється частка триптофанових залишків, що піддаються гасінню (f_a ; рис. 3, б). За кутом нахилу прямих розраховано і ефективну константу гасіння (K_{SV}), яка збільшується на 33% ($P < 0,05$). Зростання цього показника може бути зумовлено зменшенням структурної жорсткості мембранних білків мітохондрій [26, 27].

Таким чином, структурні перебудови ВМ мітохондрій кардіоміоцитів за штучного гіпобіозу супроводжуються конформаційними модифікаціями білкових молекул, що може призводити до змін просторової організації білок-ліпідних комплексів та, зокрема, впливати на функціональну активність ферментних комплексів ЕТЛ. Вони короточасні і є реакцією на дію чинників гіпобіозу.

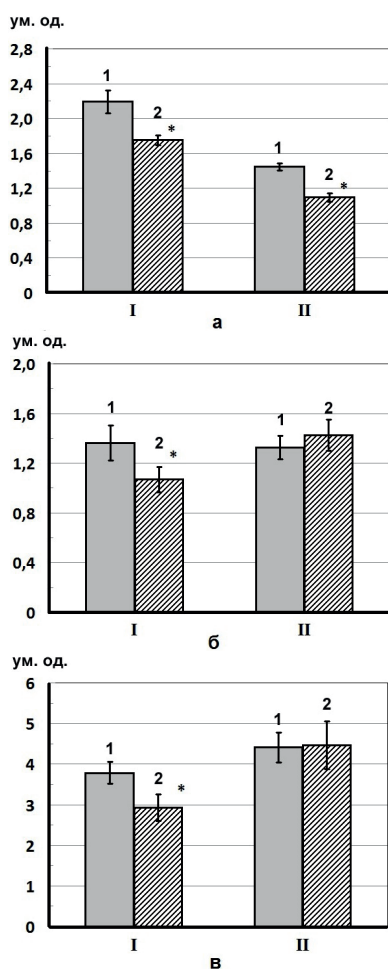


Рис. 2. Енергетичні показники мітохондрій кардіоміоцитів щурів: а – ефективність фосфорилування доданого АДФ (АДФ/О), б – активність АТФ-гідролітичних реакцій (V4S/V4АТФ), в – коефіцієнт дихального контролю (ДК); I – малат, II – сукцинат; 1 – контроль, 2 – гіпобіоз. * $P \leq 0,05$ щодо контролю.

Таблиця 2. Активність ферментів внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів щурів за штучного гіпобіозу (M±m, n=7)

Фермент	Контроль	Гіпобіоз	Після гіпобіозу, год	
			2	24
НАДН-КоQ – оксидоредуктаза, нмоль калію фериціаніду відновленого/ хв·мг білка	571,3±40,5	422,1±31,3*	524,7±23,6	517,1±43,4
Сукцинат-КоQ –оксидоредуктаза, нмоль сукцинату / хв·мг білка	554,6±52,2	604,5±52,4	547,6±49,2	549,8±43,3
Цитохромоксидаза, нмоль цитохрому с окисленого /хв·мг білка	600,4±52,2	601,1±56,8	672,2±60,2	619,8±59,2
H ⁺ -АТФаза, мкмоль P _H /хв·мг білка	2,39±0,22	2,41±0,20	2,22±0,20	2,38±0,21

*P≤0,05 щодо контролю.

Підсумовуючи отримані результати можна відзначити, що за моделювання штучного гіпобіозу (вплив гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії) знижується використання кисню мітохондріями кардіоміоцитів та часткове роз'єднання процесів спряження окиснення та фосфорилування при запуску ланцюга з I комплексу. Встановлене при цьому пригнічення НАДН-КоQ-оксидоредуктазної активності внутрішньої мембрани (I комплекс), на відміну від сукцинат-КоQ-оксидоредуктази (II комплекс), свідчить про перевагу утилізації ФАД- над НАД-залежними субстратами. Відсутні зміни цитохромоксидазної (IV комплекс) та H⁺-АТФазної активності внутрішньої мембрани. Перерозпо-

діл в функціональній активності окремих комплексів ЕТЛ, можливо попереджають розвиток мітохондріальних дисфункцій за рахунок ошадливого використання кисню. Важливе значення при цьому можуть відігравати конформаційні перебудови внутрішньої мембрани мітохондрій, які супроводжуються зростанням внутрішньомолекулярної динаміки білкових молекул. Дослідження, які проведені за моделювання штучного гіпобіозу та при виході з цього стану, свідчать про адаптивний характер структурно-функціональної модифікації внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів до впливу гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії.

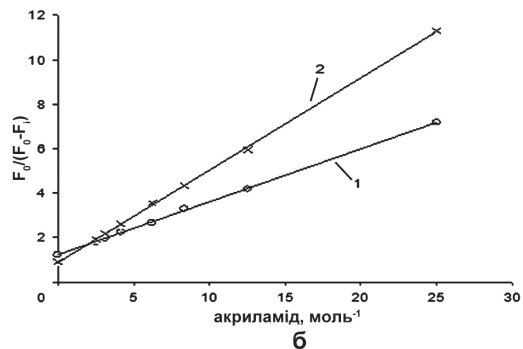
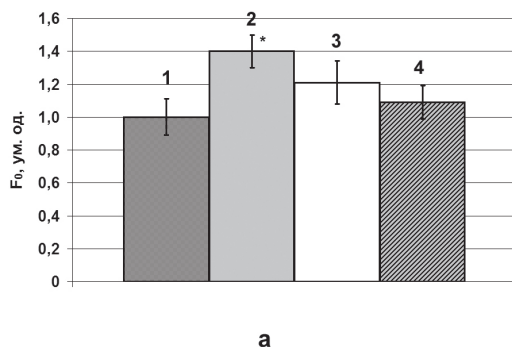


Рис. 3. Триптофанова флуоресценція (а) внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів: 1 – контроль; 2 – штучний гіпобіоз; 3, 4 – через 2 та 24 год після гіпобіозу. Модифікований графік Штерна-Фольмера (б) гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції внутрішньої мембрани мітохондрій кардіоміоцитів: 1 – контроль; 2 – штучний гіпобіоз; (F₀ та F_i – інтенсивність флуоресценції відповідно за відсутності та наявності гасника).

*P≤0,05 щодо контролю

**С.Д. Мельничук¹, С.В. Хижняк¹,
В.С. Морозова¹, Л.И. Степанова²,
А.А. Уманская¹, В.М. Войцицкий¹**

ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ГИПОБИОЗЕ

Исследовано влияние искусственного углекислотного гипобиоза на функциональную активность митохондрий кардиомиоцитов крыс (окислительного фосфорилирования, активности ферментов электрон-транспортной цепи) и структурного состояния внутренней мембраны митохондрий. Снижение дыхательной и фосфорилирующей активности митохондрий свидетельствует об угнетении скорости поглощения кислорода в условиях гипобиоза, наряду с возможным компенсаторным явлением гипергликемии. Установлено частичное разобщение процесса сопряжения окисления и фосфорилирования при запуске цепи только из I комплекса. Это согласуется с понижением на 26,1% относительно контроля НАДН-КоQ-оксидоредуктазной активности внутренней мембраны митохондрий (I комплекса), а сукцинатдегидрогеназная (II комплекс) и цитохромоксидазная (IV комплекс) активности не изменяются. Показана конформационная модификация белковых молекул внутренней мембраны митохондрий при гипобиозе. Сделан вывод о поддержании в условиях гипобиоза энергетической функции митохондрий кардиомиоцитов, о чем свидетельствует АТФ-синтетазная активность, возможно вследствие структурно-функциональной модификации внутренней мембраны митохондрий, которая носит адаптационный характер.

Ключевые слова: искусственный гипобиоз; кардиомиоциты; митохондрии; электрон-транспортная цепь; внутренняя мембрана митохондрий.

**S.D. Melnytchuk¹, S.V. Khyzhnyak¹, V.S. Morozova¹,
L.I. Stepanova², A.A. Umanskaya¹,
V.M. Voitsitsky¹**

THE ENERGY FUNCTION OF RAT CARDIAC MITOCHONDRIA UNDER ARTIFICIAL HYPOBIOSIS

We investigated the energy activity of mitochondria from rat cardiomyocytes under the artificial carbon dioxide hypobiosis, which led to physiological changes in the organism (the decrease of body temperature, the reduction of heart rate, etc.). The respiratory and phosphorylation activities in mitochondria of cardiomyocytes is reduced when using two oxidation substrates (succinate and malate), which characterize the rate of the oxygen consumption by the mitochondria. The partial uncoupling of the oxidation and phosphorylation processes when using the malate unlike succinate was established. The activity of NADH-CoQ-oxidoreductase (complex I of the respiratory chain) is inhibited, but the activities of succinate

dehydrogenase and cytochrome oxidase don't change. Probably, the priority of the succinate use under the artificial hypobiosis provides the support of the mitochondria functional activity on a sufficient energy level. It is evidenced by the ATP-synthetase activity. The modifications of the structural and functional state of the inner mitochondria membrane of the cardiomyocytes are directed to the adaptation under the artificial carbon dioxide hypobiosis.

Key words: artificial hypobiosis, cardiomyocytes, mitochondria, respiratory chain, inner mitochondrial membrane, conformational modification.

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

²Taras Shevchenko Kyiv National University

REFERENCES

1. Melnytchuk SD, Vyhovanec VI. The influence of the artificial hypobiosis on the energy metabolism in the rats. *Ukr Biokhim Zh* 2005;77(3):131–35. [Ukrainian].
2. Melnytchuk SD, Melnytchuk DO. The animal hypobiosis state (molecular mechanisms and practical implications for the agriculture and medicine). Kyiv: NULES press; 2007. [Ukrainian].
3. Withers PC, Cooper CE. Metabolic depression: a historical perspective. *Prog Mol Subcell Biol* 2010;(49):1–23.
4. Timofeev NN. Hypobiosis and cryobiosis. Past, present and future. Moscow: Inform-Znanie; 2005. [Russian].
5. Zhenyin T, Zhaoyang Z, Cheng CL. 5'-Adenosine monophosphate induced hypothermia reduces early stage myocardial ischemia/reperfusion injury in a mouse model. *Am J Transl Res* 2011;3(4):351–61.
6. Staples JF, Brown JC. Mitochondrial metabolism in hibernation and daily torpor: a review. *J Comp Physiol B* 2008; 178(7):811–27.
7. Melnytchuk SD, Morozova VS, Khyzhnyak SV, Voitsitsky VM. The oxidative phosphorylation parameters of the cardiomyocyte mitochondria of the rats under the artificial hypobiosis. *Dopovidy NAN of Ukraine* 2013;(4):148–53. [Ukrainian].
8. Litasova EE, Lomivorotov VN, Karaskov AM, Ginko AV. Combined hypothermia during the open heart surgery: guidelines. Novosibirsk; 2000. [Russian].
9. Melnytchuk SD. The main indicators of the blood acid-base status and metabolism in the rats under the amputation in the conditions of the hypobiosis and general anesthesia. *Ukr Biokhim Zh* 2001;73(6):104–107. [Ukrainian].
10. Severin SE, Solov'eva GA. Workshop on Biochemistry. Moscow: MSU press; 1989. [Russian].
11. Greenberg CS, Craddock PR. Rapid single-step membrane protein assay. *Clin Chem* 1982;28(7):1725–26.
12. Frank GM, editor. Study guide of biological oxidation by polarographic method. Moscow: Nauka; 1973. [Russian].
13. Sottocasa GL, Kuylenstierna B, Ernster L, Bergstrand A.

- An electron-transport system associated with outer membrane of liver mitochondria. *The Journal of Cell Biology* 1967;(32):415–38.
14. Tyler DD, Natanailides C. Assay of maximal cytochrome c oxidase activity in fish muscle. *Basic and Applied Myology* 1995;5(Pt I):99–102.
 15. Prohorova MI, editor. *The methods of the biochemical research*. Leningrad: Leningrad university press; 1982. [Russian].
 16. Krause F, Reifschneider NH, Goto S. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;(329):583–90.
 17. Dobrecov GE. *Fluorescent Probes in the study of cell membranes and lipoproteins*. Moscow: Nauka; 1989. [Russian].
 18. Portnychenko VY, Portnychenko AG, Sydorenko AM. Glycemia as a determinant factor of the restructuring ways of the metabolism and respiratory system under the hypoxia. *Pathologia* 2011;8(2):52–5. [Ukrainian].
 19. Jemirbekov JeZ, Lvova SP. *Mechanisms of the biochemical changes at low body temperatures*. Rostov-on-Don: Rostov university press; 1985. [Russian].
 20. Ignat'ev DA, Suhova GS, Ljashkov AE. Temperature and cardiotropic effects of the kyotorphin and neokyotorphin peptides in the experiments on hibernating and non hibernating animals. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* 2009;40(3):68–88. [Russian].
 21. Melnychuk SD, Khyzhnyak SV, Morozova VS, Boyko VV, Babych LV, Voitsitsky VM. The biochemical serum parameters of the rats under the artificial hypobiosis. *Bioresursy i pryrodokorystuvannja* 2013;5(3–4):5–11. [Ukrainian].
 22. Lukjanova LD. Modern problems of the adaptation to hypoxia. Signaling mechanisms and their role in the system regulation. *Patol fiziologija i jeksperim terapija* 2011;(1):3–19. [Russian].
 23. Ashmarin IP, Sosulina LJ, Suhova GS, Kuzmin VS. The ADP-ribose and cADP-ribose like endogenous regulators of the cellular ion balance. The cardiotropic effect of the ADP-ribose. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* 2006;(1):3–17. [Russian].
 24. Skulachev VP, Bogachev AV, Kasparinskij FO. *Membrane energy*. Moscow: Moscow university press; 2010. [Russian].
 25. Gennis R. *Biomembranes: molecular structure and function*. Moscow: Mir; 1997. [Russian].
 26. Laktovich Dzh. *Basic principles of the fluorescence spectroscopy*. Moscow: Mir; 1986. [Russian].
 27. Tyson PA, Steinberg M. Assembly of tryptophan residues in Na⁺, K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 1987;262(10):4644–48.

*Матеріал надійшов
до редакції 04.06.2014*