

**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ МИТОХОНДРИЙ ТКАНЕЙ НЕКОТОРЫХ  
ОРГАНОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ**

Общеизвестно, что при дефиците кислорода в среде нарушаются энергетические функции клетки. При этом уменьшается содержание АТФ и креатинфосфата. В клетках многоклеточных эукариот 95% АТФ синтезируется системой окислительного фосфорилирования. Отсутствие или снижение содержания этого нуклеотида в клетке означает только одно - выключение (или сильное замедление) процессов окислительного фосфорилирования, то есть нефункциональное состояние митохондрий. Однако, несмотря на обширную, хотя и противоречивую литературу по проблеме гипоксии, остаются нерешенными, по крайней мере, два принципиальных вопроса: 1) какова роль энергетического обмена в формировании специфических нарушений функций клетки при гипоксии и 2) что является лимитирующим звеном энергетического обмена в условиях гипоксии?

Учитывая вышеизложенное, мы сочли целесообразным изучить систему окислительного фосфорилирования и скорость дыхания митохондрий, выделенных из ткани мозга, сердца и печени крыс, подвергнутых воздействию гипоксии. Забой экспериментальных животных производили на компенсаторной и некомпенсаторной фазе гипоксического состояния.

Из полученных данных, приведенных в табл. 1, видно, что изменения скорости потребления кислорода митохондриями сердца крыс на компенсаторной стадии гипоксии различаются с контрольной. В качестве субстратов окисления использовались глутамат и сукцинат. Так, скорость дыхания митохондрий с глутаматом в состоянии 3 снижается на 29-33%, но скорость дыхания в состоянии 2 не изменяется, в результате чего происходит уменьшение величины ДК<sub>2</sub> на 30,5-36,0% и отношение АДФ/О - на 25-27%. При этом также снижается скорость стимулированного динитрофенолом дыхания митохондрий на 32,6%. Это означает, что кислородное голодание приводит к ингибированию скорости переноса электронов от глутамата по дыхательной цепи митохондрий до молекулярного кислорода. Это является основной причиной уменьшения АТФ синтезирующей функции митохондрий.

Несколько иная картина наблюдается при использовании в качестве субстрата окисления сукцината. При этом наблюдали незначительное повышение скорости окисления в различных метаболических состояниях митохондрий. Отношение АДФ/О несколько возрастает (до 8%). Аномально высокое значение АДФ/О с сукцинатом, по-видимому, связано с переключением дыхательной цепи с окисления сукцината на НАД-зависимый путь. В 1957 г. был обнаружен феномен, вошедший в биоэнергетику под названием «обратимость окислительного фосфорилирования», или «обратный транспорт электронов» (Chance, Hollinger, 1957). Сукцинат, добавленный к митохондриальной суспензии, вызывал быстрое восстановление митохондриальных пиридиннуклеотидов.

Таблица 1.

*Изменение дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий сердца крыс во время компенсаторной фазы гипоксии (M ± m; n = 12-15)*

Показатели	Скорость дыхания, нанограмм атом O <sub>2</sub> /мин мг белка					
	Глутамат			Сукцинат		
	Норма	Гипоксия	%	Норма	Гипоксия	%
V <sub>2</sub>	82 ± 4	61 ± 3**	74,4	238 ± 21	262 ± 18	110,07
V <sub>3</sub>	178 ± 8	127 ± 5**	71,1	506 ± 37	524 ± 30	115,5
V <sub>4</sub>	43 ± 5	44 ± 4	102,3	226 ± 24	249 ± 21	110,1
ДК <sub>2</sub>	4,14 ± 0,21	2,88 ± 0,13***	69,5	2,24 ± 0,12	2,34 ± 0,13	104,4

АДФ/О	2,90±0,18	2,18 ±0,12**	75,1	1,82± 0,09	1,96±0,10	107,7
V <sub>3</sub>	176 ±7	118±5****	67,0	486±40	538±33	110,6
V <sub>4</sub>	43 ±5	45± 4	104,8	208±18	238±17	114,4
ДК <sub>2</sub>	4,09±0,22	2,62±0,16****	64,0	2,33± 0,11	2,26±0,13	97,0
АДФ/О	2,88 ±0,19	2,10± 0,14**	72,9	1,72±0,10	1,18±0,12	108,1
V <sub>днф</sub>	178±9	120± 5****	67,4	518± 42	589±36	113,7

После прибавления АДФ пиридиновые нуклеотиды окислялись, и лишь после полного фосфорилирования АДФ становились снова восстановленными. Феномен обратимого транспорта электронов нашел реальное объяснение в рамках хемоосмотической теории Митчелла. Известно, что из трех протонных насосов дыхательной цепи (дыхательные комплексы 1,3,4) два (дыхательные комплексы 1 и 3) работают обратимо (Wikstrom, Krab,1980). In vitro могут быть созданы условия, например, при окислении сукцината, когда поток протонов, откачиваемый двумя протонными насосами дыхательной цепи (3 и 4), будет закачиваться внутрь протонным насосом 1. Обратный транспорт протонов скоррелирован с обратным транспортом электронов,двигающихся против градиента окислительно-восстановительных потенциалов изопотенциальных групп дыхательных переносчиков за счет энергии электрохимического градиента протонов на митохондриальной мембране. Таким образом, сукцинат выступает в данном случае и как донор электронов для обратного потока электронов и как донор протонов, откачиваемых насосами 3 и 4 и обратно, закачиваемых насосом 1. В результате имеет место восстановление НАД<sup>+</sup>, регистрируемое оптическими методами. Очевидно, что обратный транспорт электронов могут осуществлять лишь «энергезированные» митохондрии, т.е. имеющие электрохимический градиент протонов на мембране.

В дальнейших экспериментах исследовали влияние гипоксии на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс (табл. 2). Кислородное голодание во время компенсаторной фазы проявлялось в существенном снижении скорости дыхания митохондрий с глутаматом в фосфорилирующем состоянии (в 1,30 раза), а скорость дыхания в состоянии V<sub>2</sub> и V<sub>4</sub> не отличается от контрольных значений. При этом уменьшается величина ДК<sub>2</sub> и коэффициент АДФ/О в 1,32 и 1,32 раза соответственно от уровня контроля. При гипоксии наиболее заметное снижение дыхания и эффективности окислительного фосфорилирования наблюдается при использовании в качестве субстрата пируват+малат. При этом скорость дыхания после добавления АДФ (V<sub>3</sub>) снижается в 1,40 раза, но при этом скорость дыхания в состоянии 2 и 4 не изменяется, в результате чего происходит понижение величины ДК<sub>2</sub> и коэффициента АДФ/О в 1,41 и 1,35 раза соответственно от уровня контроля. При использовании в качестве субстрата окисления сукцината наблюдается другая картина: происходит повышение скорости окисления сукцината в различных метаболических состояниях до 21,3%, в то же время показатели сопряжения - ДК<sub>2</sub> и АДФ/О не изменяются.

Таким образом, на компенсаторной фазе гипоксии в митохондриях печени перенос электронов от сукцината по дыхательной цепи до молекулярного кислорода несколько возрастает, в то же время электротранспортная функция на НАД-зависимом участке дыхательной цепи заметно снижается.

Представляют интерес данные, полученные на митохондриях мозга животных, подвергнутых гипоксии. Эта ткань отличается чрезвычайной чувствительностью к содержанию кислорода в крови. В компенсированной фазе гипоксии скорость фосфорилирующего окисления глутамата в ткани мозга снижается в 1,40 раза, однако скорость дыхания в состоянии V<sub>2</sub> и V<sub>4</sub> не изменяется. Это приводит к уменьшению величины ДК<sub>2</sub> и АДФ/О в 1,39 и 1,40 раза соответственно от уровня контроля (табл. 3) Аналогичный характер нарушения дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий мозга наблюдается также при использовании в качестве субстрата окисления пирувата и малата. В то же время дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий мозга при гипоксии с сукцинатом в качестве субстрата не нарушается. Это означает, что при гипоксии нарушение энергетического обмена в ткани мозга начинается с ограничения переноса электронов на НАД-зависимом участке дыхательной цепи

*Изменение дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс в процессе развития гипоксии. (M±m; n=10-12)*

Показатели	Скорость дыхания, нанограмм атом O <sub>2</sub> /мин мг белка				
	Норма	Г и п о к с и я			
		Компенсированная фаза	%	Некомпенсированная фаза	%
V <sub>2</sub> (глутамат)	10,20± 0,26	9,86± 0,21	96,6	7,85± 0,19*	86,9
V <sub>3</sub>	30,54± 0,92	21,38 ±0,65**	70,0	22,30± 0,72**	73,0
V <sub>4</sub>	8,76 ±0,31	8,99 ±0,37	102,6	8,32 ±0,33	94,9
ДК <sub>2</sub>	3,48 ±0,16	2,38 ±0,13***	68,4	2,68 ±0,14	77,0
АДФ/О	2,68 ±0,12	1,82 ±0,09***	67,9	2,09± 0,10	78,0
V <sub>днф</sub>	31,40 ±0,98	21,38 ±0,71***	68,0	25,12 ±0,78**	80,0
V <sub>2</sub> (пируват+малат)	8,84 ±0,27	8,97 ±0,31	101,4	6,19 ±0,28*	70,0
V <sub>3</sub>	24,65 ±0,76	14,79± 0,46*****	60,0	11,09±0,44*****	45,0
V <sub>4</sub>	7,72 ±0,29	7,86± 0,28	101,8	6,36± 0,29*	82,4
ДК <sub>2</sub>	3,19 ±0,14	1,88± 0,09***	58,9	1,75± 0,08*****	54,8
АДФ/О	2,78 ±0,13	1,80± 0,06***	64,7	1,55± 0,06*****	55,7
V <sub>днф</sub>	23,86 ±0,81	15,50 ±0,32*****	64,9	13,36±0,31*****	56,0
V <sub>2</sub> (сукцинат)	30,45 ±2,4	33,48± 2,7	109,9	17,05 ±1,6*****	56,0
V <sub>3</sub>	98,86 ±3,6	110,05± 4,7	117,3	49,43 ±3,1*****	50,0
V <sub>4</sub>	30,21 ±2,7	34,13 ±3,1	112,9	19,00 ±1,9*****	62,9
ДК <sub>2</sub>	3,27 ±0,15	3,40 ±0,13	103,6	2,60 ±0,12***	79,5
АДФ/О	1,78± 0,09	1,70± 0,10	95,5	1,46 ±0,06***	82,0
V <sub>днф</sub>	148,84± 4,6	180,60± 5,8*	121,3	77,39± 4,0*****	52,0

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что нарушение энергетического обмена и функций клеток различных тканей во время компенсаторной фазы гипоксии начинается с ограничения электротранспортной функции на НАД-зависимом участке дыхательной цепи, где в качестве переносчиков электронов используются НАД-зависимые субстраты. Эти нарушения отсутствуют, если источником восстановительных эквивалентов для дыхательной цепи является сукцинатоксидазный путь окисления. Полученные результаты позволяют сделать предположение о некоторых особенностях компенсаторно-приспособительных процессов, происходящих в митохондриях клеток тканей различных органов животных в условиях кислородного голодания во время компенсированной фазы. На этом этапе гипоксии ингибирование дыхания и параметров сопряжения на НАД-зависимом пути окисления компенсируются сукцинатным путем.

Известно, что 80% энергетического метаболизма клетки обеспечивается окислением НАД-

зависимых субстратов. Это означает, что активация сукцинатаксидазного пути дыхательной цепи митохондрий не дает в этом случае ожидаемого эффекта.

В связи с вышеизложенным возникает вопрос: как далеко заходят эти процессы и наступает ли полная дезэнергизация мембран митохондрий? Известно, что феномен обратного транспорта электронов невозможен и мембрана полностью дезэнергизируется, когда внутримитохондриальная концентрация АТФ становится ниже 0,25 нмоль/мг белка, а суммарное содержание нуклеотидов - ниже 2 нмоль/мг белка. В связи с этим в следующих сериях экспериментов мы анализировали состояние дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий тканей различных органов животных во время некомпенсаторной фазы гипоксии. Полученные данные экспериментов приведены в табл. 3.

Таблица 3.

*Изменение дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий ткани мозга крыс в процессе развития гипоксии. (M±m: n=10-12).*

Показатели	Скорость дыхания, нанограмм атом O <sub>2</sub> /мин мг белка				
	Норма	Г и п о к с и я			
		Компенсаторная фаза	%	Некомпенсаторная фаза	%
V <sub>2</sub> (глутамат)	12,4± 1,0	12,2± 0,8	98,7	10,1±0,6*	81,49
V <sub>3</sub>	36,7±2,2	22,2 ±2,0****	60,5	23,2±1,7****	63,4
V <sub>4</sub>	12,6±1,2	12,5 ±1,0	99,8	11,4 ±0,9	90,6
ДК <sub>2</sub>	2,91 ±0,14	1,77 ±0,10****	60,8	1,93 ±0,11**	66,4
АДФ/О	2,67 ±0,13	1,60 ±0,09****	60,0	1,89± 0,08**	70,8
V <sub>днф</sub>	36,6 ±2,4	23,6 ±2,1****	64,6	25,1 ±1,8**	68,7
V <sub>2</sub> (пируват+малат)	9,4 ±0,8	9,1 ±0,7	97,4	5,6 ±0,4	60,0
V <sub>3</sub>	25,7 ±1,2	14,3± 1,0*****	55,6	10,3±0,8*****	40,3
V <sub>4</sub>	8,9 ±1,0	8,5± 0,9	95,8	6,3± 0,5*	70,64
ДК <sub>2</sub>	2,88 ±0,09	1,68± 0,07****	58,3	1,40± 0,06*****	48,6
АДФ/О	2,78 ±0,13	1,59± 0,10****	57,4	1,27± 0,05*****	45,8
V <sub>днф</sub>	22,6 ±1,4	12,8 ±1,3*****	56,7	11,3±0,9*****	50,0
V <sub>2</sub> (сукцинат)	24,3 ±1,2	25,4± 1,6	104,5	14,3 ±0,9*****	58,9
V <sub>3</sub>	63,3±1,7	66,8± 2,4	105,5	26,9 ±1,3*****	42,6
V <sub>4</sub>	24,3 ±1,3	26,6 ±1,8	109,4	14,7 ±0,9*****	60,6
ДК <sub>2</sub>	2,60 ±0,12	2,51 ±0,12	96,5	1,83 ±0,08****	70,4
АДФ/О	1,88± 0,10	1,89± 0,11	100,5	1,06 ±0,06****	56,8
V <sub>днф</sub>	60,9± 2,4	65,6± 2,8	107,7	31,3± 1,4*****	51,4

Скорость потребления кислорода митохондриями сердца крыс на некомпенсированной фазе гипоксии отличается от данных, полученных во время компенсаторной фазы гипоксии и контрольных. В качестве субстратов окисления использовались сукцинат, глутамат, бета-оксибутират. На этой фазе гипоксии наблюдали снижение скорости окисления сукцината в различных метаболических состояниях митохондрий в 1,45-1,51 раза по сравнению с контролем и незначительное повышение коэффициента АДФ/О, в то же время величина ДК<sub>2</sub> несколько уменьшалась. Это связано с более существенным ингибированием дыхания митохондрий в фосфорилирующем состоянии. Во время некомпенсированной фазы гипоксии сниженная дыхательная и АТФ - синтезирующая функция митохондрий с бета-оксибутиратом несколько повышается, а с глутаматом, напротив, уменьшается.

Во время некомпенсаторной фазы наиболее глубокое ингибирование дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени наблюдается при окислении пируват+малата и сукцината (табл. 2). Особенно резкое ингибирование скорости фосфорилирующего окисления приводит к снижению величины ДК<sub>2</sub> и отношения АДФ/О. Так, если скорость фосфорилирующего дыхания с глутаматом уменьшается всего лишь в 1,27 раза, то с пируват+малатом - в 1,55 раза и сукцинатом - в 1,50 раза. Если при окислении сукцината или глутамата эффективность окислительного фосфорилирования ДК<sub>2</sub> и АДФ/О уменьшается всего лишь в 1,18-1,23 раза, то при окислении пируват+малата - в 1,44-1,45 раза.

В некомпенсаторную фазу гипоксии в митохондриях ткани мозга животных скорость окисления сукцината снижается, скорость окисления пируват + малата сохраняется на уровне, который наблюдали при компенсированной фазе гипоксии (таб. 3). Одновременно скорость окисления и эффективность окислительного фосфорилирования заметно подавляются. Так, если в компенсаторную фазу гипоксии скорость фосфорилирующего окисления пируват+малата снижается - в 1,44 раза, то в некомпенсаторную фазу - в 1,60 раза. Если в компенсаторную фазу коэффициент АДФ/О уменьшается - в 1,43 раза, то в некомпенсаторную - в 1,54 раза. Таким образом, в некомпенсаторной фазе гипоксии происходит снижение скорости окисления субстратов не только по НАД-зависимому, но и по сукцинатному пути дыхательной цепи митохондрий. При этом следует отметить, что по мере усиления гипоксического состояния животных происходит уменьшение эффективности синтеза АТФ за счет ингибирования скорости окисления субстратов.

Таким образом, нарушение энергетического обмена и функций клеток при кислородном голодании начинается с ограничения электротранспортной функции на НАД-зависимом участке дыхательной цепи. При увеличении тяжести гипоксического состояния нарушение электротранспортной функции распространяется и на второй пункт сопряжения. В результате прекращает функционировать не только первый, но и второй пункт сопряжения, что приводит к еще большему по сравнению с компенсаторной фазой падению содержания АТФ в клетке. Цитохромоксидаза остается при этом интактной, что согласуется с низкими значениями ее для кислорода ( $10^{-6}$  -  $10^{-7}$ М) (Лукиянова, 1987). Действительно, теоретически, исходя из последнего, следует ожидать нарушения функции цитохромоксидазы лишь в аноксической фазе, то есть при уменьшении содержания кислорода в среде практически до нуля.

#### Литература

1. Ахмеров Р.Н. Тканевое дыхание, энергопродукция и теплопродукция в разных органах крыс. // Узб. биол. ж. -1981. № 5, 25-27 с.
2. Белый В.Н. Повышение устойчивости мозга к кислородному голоданию с помощью гутимина и β-метилфеназинметасульфата //Фармакол. и токсикол. -М., 1969. №-6. 665-667с.
3. Брайловская И.В., Александрова А.С., Слепнева Л.В. Влияние острой гипоксической гипоксии на дыхание митохондрий печени крыс //Вопр. мед. хим. -М., 1980, т.24. № 4. - 435-438с.
4. Быков И.П. Сравнительное исследование эффективности некоторых антигипоксантов и их комбинаций //Фармакол. и токсикол. -М., 1976. № 6 666, -670 с.
5. Валиева Л.Б., Литвинов В.С., Родин А.П. Влияние гутимина на содержание кислой фосфатазы и метаболитов гликолиза в крови собак в динамике реанимации //Терминальные и экстремальные состояния. -Новосибирск, 1980, 57-60 с.
6. Глотов Н.А. Влияние гутеминовой кислоты на активность окислительных ферментов в митохондриях сердца при гипоксии //Украин. биохим. ж. 540-543 с.
7. Говорова Л.В. Влияние экспериментальной гипоксии на АТФ-азную активность ядер митохондрий мозга, печени и сердца //Вопр. мед. хим. -М., 1977, т. 23. № 3. 302-308 с.
8. Лукьянова Л.Д., Уголев А.Т., Феодоров П.И., Лукиных Н.В., Дудченко А.М. Энергетическая регуляция трансмембранных потенциалов клеток печени при гипоксии //Бюлл. эксп. биол. и мед. -М., 1991, т. 11.

