

АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И
БИОФИЗИКИ

На правах, рукописи УДК 591.12:044. 612. 014. 57. 04

АСАНОВА КАРАЧАЧ АСАНОВНА

ЭНЕРГЕТИКА ЖИВОТНЫХ И РОЛЬ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ
МИТОХОНДРИЙ В ПОВЫШЕНИИ ЖИЗНЕУСТОЙЧИВОСТИ ПРИ ГИПОКСИИ

03. 00.13 - Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Ташкент - 2002

Работа выполнена в Национальном университете Узбекистана
им. М. Улугбека и Джалал-Абадском Государственном университете
Кыргызской Республики

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор Ал матов К.Т.

**Официальные оппоненты - доктор биологических наук Садыков Б. А.
доктор биологических наук, профессор Ахметов И. З.**

Ведущая организация - Андижанский Государственный университет.

Защита диссертации состоится ^{4-11/16, 11 15} 2002
часов на заседании Специализированного совета Д 015.01.01 по защите диссертаций на соискание
ученой степени доктора наук при Институте физиологии и биофизики АН РУз по адресу: 700095, Ташкент ул.
Ниязова 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии и биофизики АН РУз.

Автореферат разослан: 2002 г.

Ученый секретарь Специализированного совета, доктор биологических наук

И.Г. Ахмеджанов.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Интерес исследователей к гипометаболическим и гипоксическим состояниям привлекает к себе большое внимание, так как организм очень часто подвержен действию недостатка кислорода особенно в условиях высокогорья, а также при больших физических нагрузках или при некоторых тяжелых патологических состояниях. В связи с этим представляет интерес изучение энергетических резервов организма и путей их повышения в гипоксических условиях. В предшествующих исследованиях неоднократно проводился анализ механизмов гипоксических нарушений в организме и разрабатывались антигипоксические средства (Кораблев, Лукиенко, 1976; Лукьянова, 1987; 1989; Кулинский, Ольховский, 1989; Курмуков и др., 1990). На митохондриальном уровне показано существенное подавление переноса электронов, особенно на уровне НАД-Н-оксидазы даже при кратковременных гипоксиях (Лукьянова и др., 1987, 1989; Попова, Замула, 1989). Это рассматривается как нарушение функции дыхательной цепи гипоксическим воздействием на организм. Для повышения жизнеустойчивости организма рекомендуются препараты, шунтирующие дыхательные функции митохондрий. Вместе с тем имеются сведения о том, что ряд блокаторов дыхательной цепи митохондрий способствуют повышению жизнеспособности организма при гипоксии (Кулинский, 1989; Курмуков и др., 1990; Назруллаев, 1994; Ахмеров и др., 1997; Allmaigatov, Abmeqoy et al., 1999; Алламуратов, 1999).

Таким образом, противоречивость имеющихся данных не позволяет сформулировать определенную точку зрения относительно механизма повышения гипоксической устойчивости организма и, следовательно, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении. В настоящее время известны разные биологически активные вещества, которые можно использовать в качестве эффективных средств повышения жизнеустойчивости организма в гипоксических условиях. В связи с этим представляет интерес выяснение энергетических резервов организмов в этих условиях и диапазон их изменений, в пределах которых сохраняется жизнедеятельность. Исследования в этом направлении позволят сформировать необходимые научно-теоретические представления о метаболических механизмах, обеспечивающих устойчивость организма к гипоксическому воздействию, а также определить физиологически обратимые и необратимые границы снижения обменных процессов в организме при гипоксии.

Одним из таких подходов является поиск новых препаратов, увеличивающих жизнеустойчивость организма к гипоксическим воздействиям. К разряду подобных веществ относятся: антигипоксанты, антиоксиданты, блокаторы метаболизма, лекарственные препараты, эффективно модулирующие метаболические процессы на митохондриальном уровне. В литературе (Кулинский, Ольховский, 1989; Курмуков и др., 1990; Алламуратов, Ахмеров, 1996) приведен целый ряд биологически активных соединений, способных повысить жизнеустойчивость организма к гипоксическим воздействиям, но отсутствует анализ механизма толерантного действия отдельных гипометаболических средств.

Цель исследования. Целью исследования является изучение состояния ферментных систем митохондрий различных тканей животных в условиях гипоксии, механизмов влияния гипометаболических веществ на энергетические процессы и роли их в повышении жизнеустойчивости организма к дефициту кислорода.

При реализации поставленной цели нами решались следующие экспериментальные задачи:

- исследование состояния газоиспользования, углеводного обмена и жизнеустойчивости тепло- и холоднокровных животных в условиях различного гипоксического состояния;
- исследование состояния энергетического метаболизма митохондрий тканей различных органов животных в условиях гипоксического состояния;
- исследование влияния различных гипометаболических веществ на газоиспользование, углеводный обмен и жизнеустойчивость животных в условиях гипоксии;
- исследование влияния различных гипометаболических веществ на энергетический метаболизм митохондрий различных тканей животных, *in vivo*

Научная новизна работы. Исследования позволили осуществить анализ энергетических процессов в организме при гипоксии и конкретизировать ферментно-метаболические пути, лежащие в основе повышения жизнеустойчивости организма к этим условиям. Впервые на основе изучения газоиспользования и гликолиза у тепло- и холоднокровных животных установлено, что при продолжительной гипоксии у теплокровного организма проявляются две фазы гипоксического обмена: 1) компенсаторная фаза, когда недостаток кислорода дополняется за счет повышения частоты дыхания, при этом подавляются НАД-зависимые пути окисления; и 2) некомпенсаторная фаза, когда снижается частота дыхания и интенсивность обмена, а также происходит снижение дыхательной функции митохондрий и накопление лактата в крови. Установлено, что у теплокровных организмов отсутствуют механизмы гипоксической толерантности. Эти организмы могут представлять собой модель для выяснения механизмов

гипоксической неустойчивости, а также тестирования различных средств, рассчитанных на повышение гипоксической устойчивости организма.

Холоднокровные животные не меняют или слабо меняют интенсивность газоиспользования обмена даже в условиях глубокой гипоксии и у них не наблюдается существенного накопления лактата в крови. Они сохраняют состояние жизнедеятельности даже в условиях полного отсутствия кислорода. Следовательно, у холоднокровных имеются необходимые механизмы гипоксической устойчивости и их организм может служить моделью для изучения механизма гипоксической толерантности.

Учитывая характер влияния гипометаболических веществ на жизнеустойчивость животных, проведена конкретизация группы гипометаболических соединений, обладающих антигипоксической активностью. Эти вещества вызывают не только понижение газоиспользования обмена, но и подавляют интенсивность гликолиза, ферменты дыхательной цепи и АТФазу митохондрий. В эту группу веществ входят каталин, серотонин и бензонал. Гипометаболические вещества отличаются друг от друга механизмами влияния на митохондриальные процессы.

Научно-практическое значение. В работе развивается представление о зависимости гипоксической

устойчивости организма от метаболического статуса организма. Для теплокровных организмов характерна низкая гипоксическая толерантность и у них интенсивность метаболизма быстро подавляется. У холоднокровных обмен веществ мало зависит от глубины гипоксии и они обладают высокой толерантностью к низкому содержанию кислорода в крови.

В дополнение к литературным представлениям о толерантногенном действии гипометаболиков в гипоксических условиях выдвигается положение о том, что механизм гипоксической устойчивости животных определяется способностью гипометаболиков блокировать функциональную активность систем переноса электронов и энергии на митохондриальном уровне. Применение антигипоксантов может иметь профилактическое значение, так как предварительное введение их в организм позволяет сохранить устойчивость внутриклеточных процессов к недостатку кислорода на более длительное время.

Материалы работы являются теоретической предпосылкой для разработки антигипоксических мероприятий при различных формах гипоксии в организме.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на конференции, посвященной 10-летию юбилея Республики Узбекистан по проблеме "Структура и функция биологических мембран" (Ташкент, 2001), Халкаро илмий-амалий конференция Биологик, экологик ва агротурпоқшунослик таълим муаммолари ва истикболари- Тезислар

туплами (Ташкент, 2001), XI международной конференции "Студент и научно-технический прогресс" (Новосибирск 2002).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлен двухфазный характер изменения интенсивности обмена у теплокровных животных при слабой гипоксической устойчивости и однофазный характер реакции холоднокровных животных на гипоксию при их высокой гипоксической устойчивости.
2. Высокий уровень гипоксической устойчивости организма холоднокровных животных обеспечивается за счет низкой дыхательной и АТФазной активности митохондрий, что может быть достигнуто у теплокровных с помощью применения гипометаболических препаратов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 3 статьи.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 308 ссылок. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста и проиллюстрирована 4 рисунками и 20 таблицами.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовались лабораторные мыши и крысы, а также степные среднеазиатские черепахи (*Testudo horsfieldi*). Животные содержались в стандартных условиях вивария, в клетках без ограничения воды и пищи.

Нормобарическую гипоксию у мышей создавали в герметичной камере определенного объема. Одна группа мышей была контрольной, другая - опытной. Животные последней группы предварительно, до помещения в термокамеру, получали внутривенно инъекцию одного из видов гипометаболиков. Эксперимент продолжался до наступления гибели животных, о которой судили визуально по прекращению дыхательных движений.

Частоту дыхания у мышей и крыс измеряли фотоэлектрическим методом, у черепах - по изменению объема респираторной маски. Температуру тела у животных измеряли в гесинп электротермометром.

Интенсивность потребления кислорода животными определяли полярографическим методом. При этом животные помещались в специальную герметичную камеру с электродом Кларка (Алматов, Ахмеров и др., 1993; Алламурадов, Алматов и др., 1993).

Проводили определение глюкозы глюкозооксидазным методом с помощью биотестов фирмы "Laxema" в крови, взятой во время забоя животных.

Определение лактата в крови основано на ферментативной реакции превращения лактата крови в пируват и восстановления НАД в НАД-Н. Образовавшийся НАД-Н определяли спектрофотометрически. Содержание лактата находили по изменению оптической плотности раствора (Асатиани, 1972).

Определение пирувата проводили ферментативным методом путем обращения ЛДГ-реакции в сторону восстановления пирувата в лактат за счет окисления НАД-Н в НАД (Асатиани, 1972).

Для выделения митохондрий из ткани печени животных использовали метод дифференциального центрифугирования (Hogeboom, Sphneider, 1948). Среда выделения содержала 0,3 М сахарозы, 10 мМ трис-NHCl (pH 7,5), % БСА. Все процедуры по выделению митохондрий проводили при 0+2°. (Алматов К.Т., Ахмеров Р.Н. и др., 1993). Белок митохондрий определяли по Лоури (Lowry et al., 1951). Изучение энергетических параметров изолированных митохондрий проводили по Чансу, Вильямсу (Chance, Williams, 1955).

Определение АТФазной активности митохондрий проводили рН-метрическим методом (Chance, Wishamur, 1976) с регистрацией результатов на самописце типа КСП-4. В состав среды инкубации входили 120 мМ KCl и 2 мМ трис-NHCl (pH 7,5).

Использованные гипометаболические агенты. Одну группу гипометаболиков составляли бензонал, серотонин и каталин, известные как антигипоксанты (Курмуков и др., 1992; Кулинский, Ольховский, 1969; Юлдашев, 1997). В другую группу гипометаболиков входил аминоксацетат, известный как ингибитор трансаминаз митохондрий (Clark, Land 1981) и окисления таких НАД-зависимых субстратов, как глутамат и малат (Ахмеров и др., 1994).

Результаты исследований и их обсуждение
Интенсивность газоокислородного, углеводного и энергетического обмена в организме тепло- и
холоднокровных животных при гипоксии.

Для изучения газоокислородного обмена у мышей использовались респираторные камеры двух объемов. В одном случае была использована камера емкостью 120 см³, а в другом - 240 см³. Такая постановка эксперимента позволила оценить зависимость состояния обмена веществ животных от продолжительности развития гипоксического состояния. Так в камере меньшей емкости при уменьшении содержания кислорода наполовину от исходного уровня наблюдается снижение газоокислородного обмена, которое прогрессирует по мере уменьшения содержания кислорода во вдыхаемой смеси. Частота дыхания при этом удваивается, температура тела снижается (Табл. 1).

В камере размером 240 см³ обнаружено, что состояние гипоксии развивается в две фазы: I фаза - компенсаторная, когда уменьшение поступления кислорода в организм поддерживается за счет повышения частоты дыхания; II фаза - некомпенсаторная наступает при снижении содержания кислорода во вдыхаемом воздухе наполовину. При этом интенсивность газоокислородного обмена снижается вдвое на фоне снижения частоты дыхания, и животное погибает от дефицита кислорода в организме. Температура тела снижается на 9° С.

Аналогичные фазные изменения в интенсивности газоокислородного обмена получены нами на лабораторных крысах (Табл. 1).

У этих животных в норме интенсивность газоокислородного обмена примерно втрое ниже, чем у мышей, хотя температура тела находится на том же уровне. Частота дыхания более высокая, чем у мышей.

Эти отличия вполне объяснимы при применении правила Рубнера (Проссер, 1977; Шмидт-Нильсен, 1982), согласно которому животные с большей массой или с меньшей поверхностью тела относительно массы имеют более низкие значения энергетического обмена. Анализ газоокислородного обмена у крыс в процессе развития гипоксии показал, что у них характер его изменения очень сходен с мышами. Использовали герметичную респираторную камеру объемом в 1000 см³. У крыс также четко проявляются обе фазы развития гипоксического состояния. В компенсаторную фазу у крыс происходит рост частоты дыхания на фоне определенного снижения метаболизма. В некомпенсаторную фазу, снижается частота дыхания и особенно интенсивность газоокислородного обмена.

Последний показатель примерно в четыре раза ниже, чем контрольные величины, что указывает на существенную депрессию метаболических процессов у крыс в условиях гипоксии.

Полученные данные на теплокровных животных свидетельствуют, в отличие от литературных сведений, о фазности реакций организма на гипоксию различной глубины. Этот вывод может привести к разработке нового подхода для изучения гипоксического обмена.

Исследования гипоксической устойчивости холоднокровных организмов были проведены на степных черепахах, обитающих в центральной Азии. Как холоднокровные животные степные черепахи характеризуются другими физиологическими показателями. Так, частота дыхания у них низкая и равна примерно трем в минуту, что в 50 раз ниже, чем у мышей. У них очень низкая интенсивность газоокислородного обмена в 30 раз ниже, чем у мышей. Дыхание у черепахов также сильно отличается от них. Оно происходит скачкообразно, с большими перерывами потребления кислорода. Полученные результаты показали, что гипоксическое воздействие в целом мало отражается на состоянии и на интенсивности метаболизма черепахов. Так, содержание кислорода 50% и менее 20% во вдыхаемой смеси почти не влияет на величину потребления кислорода черепахами, хотя и наблюдается определенная тенденция к снижению газоокислородного обмена, но только в пределах 5-10% от исходного. Лишь при глубокой гипоксии (5% O₂ в респираторной камере) наблюдалось уменьшение интенсивности газоокислородного обмена до 15%. Одновременно у них имело место снижение на 30% частоты дыхательных движений.

Таблица 1. Потребление кислорода и состояние некоторых физиологических показателей у мышей и крыс при гипоксии в герметических камерах, объемом 120 см³, 240 см³ и 1000 см³.

Вид животных	Объем камеры см ³	Концентрация O ₂ , %	Частота дыхания, мин	%	Состояние животного	Потребление O ₂ , мл/час/кг	%	Температура тела, °С	Длительность фаз, мин.
Мышь	120	90	180,3±21	100	Нормальное	3380,9±216,3	100	37,6	
		60-40	225,4±36,1	125	Напряженное	3161,6±188,6	93,5		5
		15-7	314,1±28,8**	174	Очень напряжен., лежачее	1764,2±173,2***	52,2	32,3	7
	240	90	180,3±21,4	100	Нормальное	338,9±216,3	100	37,6	
		70-60	211,3±3,7*	117,2	Напряженное	3182,6±182,4	82,1		5
		50-40	325,4±4,1***	180,5	Напряженное	1865,2±165,7***	55,2		7
	15-13	144,1±28,8	80	Напряженное	826,2±87,4****	24,3		5	
	6-5	97,6±4,6****	53,9	Очень напряжен., лежачее	426,3±6,7****	12,6	28,7	5	
	Крыса	1000	90	124,3±17,2	100	Нормальное	1356,4±126,5	100	37,6
70-60			141,1±3,5	113,7	Напряженное	1167,6±148,3	85,5		8
50-40			176,4±6,3*	141,9	Напряженное	976,2±68,5**	71,5		11
15-13			91,5±8,8**	73,4	Напряженное	596,2±68,2***	43,6		8
6-5			84,2±6,0****	53,9	Очень напряжен., лежачее	326,3±6,7****	25,4	34,6	

Примечание: Здесь и в табл. - 2, 3, 4 коэффициент достоверности обозначен звездочками: * P < 0,05; ** P < 0,02; *** P < 0,01; **** P < 0,001.

камере. Черепахи продолжают жить без видимого напряжения, хотя частота дыхательных движений снижается

примерно втрое. Этот факт демонстрирует гипоксическую и аноксическую устойчивость черепах, что не характерно для теплокровных. Теплокровные теряют жизнедеятельность даже тогда, когда еще в респираторной камере полностью не исчерпан кислород (3-5% от исходного уровня). Эти факты свидетельствуют об уникальной форме гипоксической и даже аноксической устойчивости, свойственной только холоднокровным организмам.

В связи с тем, что мы наблюдали изменения интенсивности метаболизма у животных в гипоксических условиях, интересно было выяснить характер изменения компонентов углеводного обмена. С этой целью измеряли содержание глюкозы, лактата и пирувата в крови (Табл. 2).

Содержание лактата в сыворотке крови мышей при легкой степени гипоксии превышает норму в 1,43 раза, а пирувата не изменяется. С увеличением тяжести гипоксии уровень лактата повышается в 1,65 раза, а пирувата, напротив, уменьшается в 1,14 раза. При тяжелой степени гипоксии уменьшение пирувата и повышение лактата усиливается в 1,34 и 2,26 раза. Эти изменения приводят к повышению отношения лактата к пирувату и коррелируют со степенью тяжести гипоксии. Так, если при легкой степени этот показатель повышается в 1,37, при средней - в 1,97 и тяжелой степени - в 3,41 раза, что свидетельствует об усилении интенсивности гликолитического обмена при использованных гипоксических воздействиях.

В то же время у черепах гипоксические воздействия не вызывают существенных сдвигов в содержании компонентов углеводного обмена в крови.

Таким образом, исследования системы гликолиза позволили показать низкую толерантность ее к гипоксии у мышей и высокую у степных черепах. Черепахи имеют высокую устойчивость в условиях аэробного и

Таблица 2. Содержание компонентов углеводного обмена в крови лабораторных мышей и степных черепах (мкМ/л) в гипоксических условиях. (M±m; n=5-7).

Вид животных	Концен. O ₂ в камерах, %	Глюкоза	Лактат	Пируват	Лактат/Пируват
	Контроль, 90	3,22 ±1,1 5	0,81±0,06	0,062±0,005	13,06
	50-60	3,24±1Д6	1,16±0,14**	0,065±0,007	17,84
	Отклонение,%	100,6	143,2	104,8	136,6
Мышь	20-30	3,37±1,15	1,34±0,42***	0,052±0,006*	25,77
	Отклонение,%	104,6	165,4	83,8	197,3
	5	3,43±1,17	1,83±0,12****	0,041±0,021***	44,63
	Отклонение,%	106,5	225,9	66,1	341,7
	Контроль, 90	4,66±1,71	0,71±0,48	0,056±0,004	12,6
	50-60	4,74±1,43	0,76±0,16	0,055±0,004	13,8
	Отклонение,%	101,7	107,0	98,2	109,0
Степные	20-30	5,37±1,43	0,73±0,32	0,052±0,002	14,3
хи	Отклонение,%	115,2	102,8	92,8	110,7
	5-7	5,43±16	0,83±1,84	0,051 ±0,06	16,27
	Отклонение,%	116,5	116,9	91,07	128,4

Примечание: Черепахи в заданных условиях находились по 30 минут.

анаэробного (гликолитического) обмена. У мышей, напротив, обе эти системы не достаточны для поддержания жизнедеятельности в условиях дефицита кислорода.

Общезвестно, что при дефиците кислорода в среде нарушаются энергетические функции клетки. При этом уменьшается содержание АТФ и креатин-фосфата. В клетках многоклеточных эукариот 95% АТФ синтезируется системой окислительного фосфорилирования. Отсутствие или снижение содержания АТФ в клетке означает 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? 2). Что является лимитирующим звеном энергетического обмена в условиях гипоксии? Учитывая выше изложенное, были проведены исследования системы окислительного фосфорилирования и скорости дыхания митохондрий, выделенных из ткани мозга, сердца и печени крыс, подвергнутых воздействию гипоксии. Забой экспериментальных животных производили при компенсаторной и некомпенсаторной фазах гипоксического состояния.

Чтобы проиллюстрировать первостепенную важность нарушения дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий при кислородном голодании, нет лучшего объекта, чем очень чувствительная к гипоксии ткань мозга (Рис.1).

При компенсаторной фазе гипоксии скорость фосфорилирующего окисления глутамата в этой ткани снижается

в 1,40 раза, однако скорость дыхания в состоянии U_2 и U_4 не изменяется. Это приводит к уменьшению величины ДК и АДФ/О в 1,39 и 1,40 раза, соответственно, от уровня контроля.

Аналогичный характер нарушения дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий в ткани мозга наблюдается также при использовании в качестве субстрата окисления пирувата + малата. В то же время дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий ткани мозга при гипоксии с сукцинатом в качестве субстрата окисления не нарушается. Это означает, что при гипоксии нарушение энергетического обмена начинается с ограничения переноса электронов на НАД-зависимом участке дыхательной цепи митохондрий. Во время некомпенсаторной фазы гипоксии в митохондриях ткани мозга животных скорость окисления сукцината снижается. Скорость окисления пируват + малата сохраняется на уровне, который наблюдали при компенсаторной фазе. Эффективность окислительного фосфорилирования заметно подавляется.

Во время компенсаторной фазы гипоксии в митохондриях ткани печени и сердца перенос электронов от сукцината по дыхательной цепи до молекулярного кислорода несколько возрастает, электронтранспортные функции на НАД-зависимом участке дыхательной цепи заметно снижаются. При некомпенсаторной фазе наиболее глубокое

ингибирование дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий наблюдается при окислении пируват + малата и сукцината. Усиливается снижение дыхательной и АТФ-синтезирующей функции митохондрий ткани сердца с р-оксибутиратом, а с глутаматом оно ослабевает.

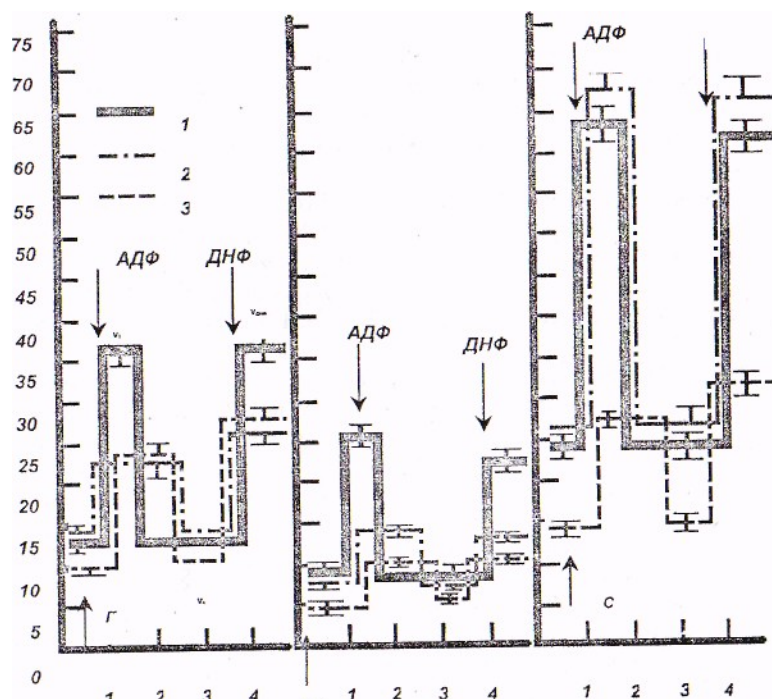


Рис 1 Изменение дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий мозга крысы при различной фазе гипоксии. (1 - норма; 2,3 - гипоксия. 2 - компенсаторная фаза, 3 - некомпенсаторная фаза. Г - глутамат; П+М - пируват+малат; С - сукцинат).

Таким образом, нарушение энергетического обмена и функций клеток при кислородном голодании начинается с ограничения электронтранспортной функции на НАД-зависимом участке дыхательной цепи. По мере усиления гипоксического состояния синтез АТФ прекращается. Цитохромоксидаза при этом остается интактной и нарушения ее функций следует ожидать лишь при уменьшении содержания кислорода в среде практически до нуля. Специфическая энергозависимая функция клетки в условиях дефицита кислорода находится полностью под контролем энергетического обмена. Компенсаторная активация сукцинатоксидазной системы при уменьшении pO_2 происходит за счет перестройки окислительного метаболизма, сохраняющего энергетический статус клетки. Все это является результатом нарушения электронтранспортной функции дыхательной цепи, которое начинается на субстратном ее участке и распространяется к терминальному. Цитохромоксидаза не лимитирует этот процесс.

Влияние гипометаболиков на жизнестойчивость и интенсивность газокислородного и углеводного обмена в организме при гипоксии

Для исследования гипоксической устойчивости животного организма при применении гипометаболиков были использованы лабораторные мыши.

Такие исследования представляют интерес лишь для теплокровных, так как холоднокровные заведомо устойчивы к дефициту кислорода. Использовали гипометаболики серотонин, гутимин, кавергал, катацин и бензонал, известные как антигипоксанты (Кулинский, Ольховский, 1969; Курмуков и др., 1992; Рощина, Островская, 1981; Виноградов и др., 1981; Назруллаев, 1994; Зияева, 1997).

Из этих веществ более, эффективными являются катацин и бензонал (Рис. 2). Они увеличивают жизнь животных более чем в три раза. Аминооксиацетат и пирацетам имеют слабый антигипоксический эффект.

В контрольной группе животных интенсивность газоислородного обмена сильно зависит от концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе (Рис.3). Так, если уровень кислорода уменьшается на 50%, дыхание снижается в 1,13 раза, если на 80% - в 2 раза. Катацин и бензонал при нормоксии снижают газоислородный обмен мышей в 1,5 и 1,4 раза, при 50% гипоксии - в 1,46 и 1,38 раза. Эффект указанных препаратов еще менее выражен при крайне высокой гипоксии, когда в камере содержание кислорода составляет около 20%. Можно полагать, что при этом имеет место общее подавление энергетического обмена и на этом фоне слабо проявляется эффект гипометаболических препаратов. Анализируя полученные результаты можно заключить, что гипометаболики приводят к ингибированию потребления кислорода организмом. Происходит подавление скорости переноса электронов от субстратов окисления по дыхательной цепи митохондрий до молекулярного кислорода. Физиологический смысл ингибирования потребления кислорода организмом в этих условиях заключается в том, что гипометаболики переводят метаболизм в тканях на более экономный режим расходования кислорода.

Изучение гликолиза показало, что при применении гипометаболиков в условиях гипоксии в крови мышей обнаруживается неоднотипное изменение содержания глюкозы, лактата и пирувата (Табл.3). Они не влияют на содержание глюкозы в крови. Бензонал, катацин и серотонин вызывают снижение лактата на 27,4; 19,4 и 35,5%, пирувата на 31,7; 30,0 и 13,6%, соответственно, от уровня контроля. Эти результаты свидетельствуют о том, что указанные вещества могут являться ингибиторами гликолитического обмена. Следует также обратить внимание на величину отношения лактата к пирувату, то есть величину редокс-состояния пиридиннуклеотидов (отношение НАД-Н/НАД). При введении бензонала и катацина этот показатель не изменяется, при введении серотонина снижается на 25,6%, а в случае аминооксиацетата, повышается на 19%. Такие изменения свидетельствуют об активации гликолиза и ингибировании аэробного дыхания у животных.

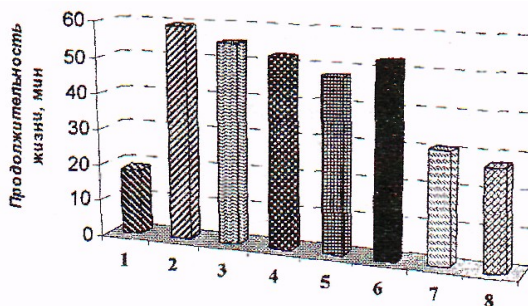


Рис.2. Влияние разных гипометаболиков на гипоксическую устойчивость мышей при нормобарической гипоксии.

(1 - контроль; 2 - катацин (40 мг/кг); 3 - бензонал (50 мг/кг); 4 - серотонин (80 мг/кг); 5 - кавергал (40 мг/кг); 6 - гутимин (80 мг/кг); 7 - пирацетам (100 мг/кг); 8 - аминооксиацетат (10 мМ).

8 - АОА (0,3 мМ).

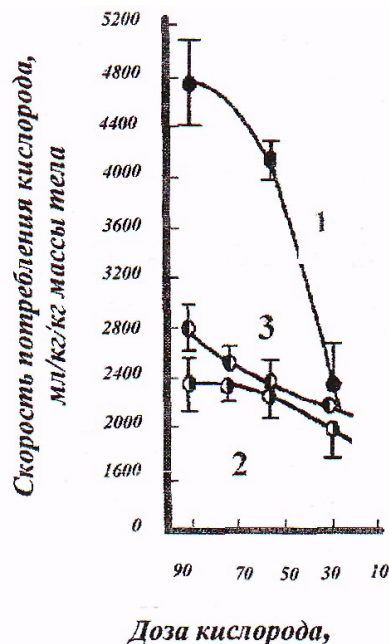


Рис.3. Влияние гипометаболиков на газоислородный обмен мышей при гипоксических условиях. (1 - в отсутствие гипометаболиков; 2 - в присутствии катацина и 3 - бензонала).

Так как разные гипометаболики оказывают неодинаковое влияние на гликолитическую систему, один из разделов нашего исследования посвящен анализу содержания компонентов углеводного обмена при применении гипометаболика в гипоксических условиях. Использовали бензонал. Он предотвращал накопление лактата в крови мышей лишь при низкой и умеренной гипоксии. Однако защитный эффект бензонала ослабевал при глубоком гипоксическом состоянии организма (Табл.4).

Препараты	Глюкоза	Лактат	Пируват	Лактат/ Пируват
Контроль	4,21 ±0,26	0,62±0,030	0,060±0,002	10,33
Бензонал, 60 мг/кг	4,04±0,32	0,45±0,024*	0,041±0,008**	10,97
Отклонение, %	95,9	72,6	68,3	103,3
Катацил, 100 мг/кг	4,38±0,42	0,50±0,025*	0,042±0,002**	11,19
Отклонение %	104,0	80,6	70,0	108,3
Серотонин, 80 мг/кг	4,08±0,27	0,40±0,025**	0,052±0,003*	7,69
Отклонение %	102,9	80,1	70	11
Аминооксиацетат, 0,2 мМ	4,42±0,25	0,79±0,029**	0,064±0,005	12,30
Отклонение %	104,9	127,4	106,6	119,0 ;

Таблица 4. Влияние бензонала на компоненты углеводного обмена в крови (мк. М/л) мышей в гипоксических условиях (M±га; n=10-12).

Концентрация Кислорода. %	Контроль	Лактат	Контроль	Пируват
Контроль 90	0,81±0,03	0,81±0,03	0,062*0,005	0,062±0,005
50-60	1,16±0,14**	0,88±0,005	0,065±0,007	0,063±0,006
Отклонение, %	143,2	108,6	104,8	101,6
20-30	1,46±0,14***	1,05±0,03**	0,063±0,006	0,060±0,007
Отклонение, %	180,2	129,6	101,6	96,7
5	1,93±0,21****	1,88±0,03****	0,044±0,021***	0,046±0,005****
Отклонение, %	238,3	232,1	70,9	74,2

Влияние гипометаболических на дыхательные и АТФ-синтезирующие функции митохондрий в условиях

Общеизвестно, что основным аэробным энергетическим звеном в тканях являются митохондрии, на которые могут непосредственно влиять гипометаболические. Поэтому были проанализированы состояния ферментов дыхательной цепи митохондрий крыс и черепах.

Из рис. 4 можно видеть, что из примененных гипометаболических катацин оказывает более выраженное влияние на дыхательную активность митохондрий печени крыс. Он снижает скорость дыхания во всех метаболических состояниях на 67 - 58%. Фосфорилирующая активность митохондрий (АДФ/О) при аппликации катацином не изменяется. Бензонал также подавляет дыхательную активность митохондрий на 61-65% при синтезе АТФ из АДФ и фосфора. При этом ДКч и АДФ/О не изменяются.

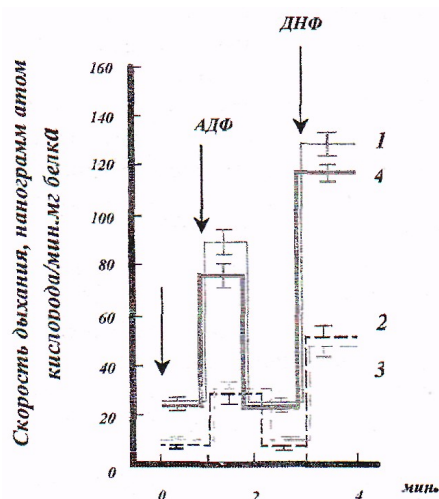
Следовательно, при аппликации митохондрий катацином и бензоналом имеет место подавление не только процесса синтеза АТФ за счет снижения их дыхательной активности, но и снижение процесса генерации протонов в дыхательной цепи, о чем свидетельствует низкий уровень дыхания в присутствии разобщителя ДНФ. При применении аминооксиацетата имела место лишь тенденция к снижению дыхательной и фосфорилирующей активности митохондрий.

Для митохондрий черепах характерна низкая метаболическая активность (Табл.5). Это связано с тем, что организм черепах обладает значительно более низкой метаболической активностью по сравнению с теплокровными. При аппликации митохондрий печени черепах катацином и бензоналом происходит перестройка метаболических реакций, которая очень сходна с изменениями, выявленными на митохондриях печени крыс. Наблюдается снижение дыхательной функции митохондрий без нарушения фосфорилирующей активности.

Гипометаболический эффект этих препаратов на митохондрии черепах менее выражен по сравнению с митохондриями печени крыс. Аминооксиацетат, как в случае с митохондриями печени крыс, оказался не эффективным. Эти данные свидетельствуют об одинаковой реакции митохондрий печени крыс и черепах на аппликацию различными гипометаболическими. Следовательно, эволюция не затронула перестройку на митохондриальном уровне. Однако следует отметить, эти животные все же существенно отличаются по дыхательной активности, что может быть одной из важных эволюционных перестроек на субклеточном уровне.

Ферменты дыхательной цепи и Н-АТФаза митохондрий печени мышей примерно в 2-3 раза активнее, чем у черепах. Эти факты позволили понять, что одной из главных причин высокой толерантности черепах к гипоксии является именно низкая активность ферментов переноса электронов и переноса энергии. Возможно, что высокая активность этих ферментов в митохондриях мышей способствует быстрому поглощению тканевого кислорода, а их низкая активность у черепах, напротив, способствует длительному сохранению тканевого кислорода при гипоксии. Это, возможно, является одной из основных причин толерантности

Рис.4. Влияние гипометаболиков на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс при применении гипометаболиков in vitro.



- 1-Контроль;
- 2-Катацин (5мМ);
- 3-Бензонал (5мМ);
- 4-Аминооксиацетат(10мМ).

Таблица 5. Функциональное состояние митохондрий печени черепах при применении гипометаболиков in vitro ($M \pm m$; $n=8-11$).

	Скорость дыхания, иг атом кислорода/мин мг белка				
	V_3	V_4	$V_{ДФ}$		
Контроль	37,1±5,6	11,8±2,4	39,5±5,4	3,17	1,8±0,2
Катацин, 5 мМ	22,2±3,5***	7,2±1,6***	28,4±3,7***	3,08	1,7±0,4
Отклонение, %	59,8	61,0	71,9	98,1	94,4
Бензонал, 5 мМ	19,5±2,4***	6,4±1,4****	25,4±2,5***	3,04	1,7±0,3
Отклонение, %	52,5	54,2	64,3	96,8	94,4
Лминооксиацетат 10 мМ	29,2±4,9	10,3±3,8	27,6±3,5*	2,83	1,6±0,3
Отклонение, %	78,7	87,3	69,8	90,1	88,9

Примечание: В качестве субстрата использовался сукцинат - 5 мМ.

черепах к гипоксии. Наряду с этим нельзя исключать, что черепаха может иметь дополнительные механизмы для устойчивости и этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Внесение в митохондрии печени крыс и черепах антигипоксантов катацина и бензонала показало, что оба вещества эффективно подавляют активность полиферментных систем дыхательной цепи митохондрий. В частности, они более, чем в 1,7 и 1,5 раза блокируют НАД-Н-оксидазу, в 1,75 и 1,65 раза подавляют сукцинатоксидазу (соответственно в митохондриях печени крыс и черепах), но не вызывают больших изменений в активности цитохром - с - оксидазы. Апликация митохондрий аминооксиацетатом не вызывала заметных эффектов ни на одном из трех исследованных ферментов.

Таким образом, исследованные антигипоксанты - катацин и бензонал эффективно подавляют НАД Н- и сукцинатоксидазу. Возможно, такой характер их действия на уровне митохондрий является достаточным условием для гипометаболического эффекта. Однако только по этим данным трудно сделать заключение о способности этих веществ к антигипоксическому действию. Существенным требованием к антигипоксантам является способность их подавлять АТФазную активность митохондрий.

Исходя из предположения о возможном участии АТФазной системы в гипоксической устойчивости, был проведен анализ ее функционального состояния путем апликации митохондрий гипометаболиками. Гипометаболики катацин и бензонал эффективно ингибируют АТФазу митохондрий печени как у крыс, так и у черепах. Аминооксиацетат малоэффективен по отношению к АТФазе митохондрий. Эти данные указывают на то, что в функциональном отношении и по метаболической характеристике митохондрии печени тепло- и холоднокровных организмов мало отличаются между собой.

Следовательно, АТФаза также является мишенью для гипометаболиков, способных повышать жизнеустойчивость животных к гипоксическим условиям и поэтому нарушение АТФазной активности может является одним из факторов, повышающих толерантность к гипоксии.

Таким образом, для повышения жизнеустойчивости теплокровного организма к недостатку кислорода необходимы вещества, подавляющие активность ферментов дыхательной цепи и АТФазы на митохондриальном уровне.

Следует отметить, что это положение объясняет высокую устойчивость холоднокровных животных к гипоксическому воздействию, так как у них уже в норме очень низкая активность ферментов дыхательной цепи и АТФазы. На этой основе, возможно, утверждать, что для повышения устойчивости организма к различным гипоксическим

воздействиям необходимы либо низкая активность митохондриальных ферментов, либо снижение их активности специальными гипометаболическими агентами.

Полученные данные на митохондриях представляются важными для понимания роли различных гипометаболических агентов в регуляции физиологического статуса организма и повышении устойчивости организма к гипоксии. Исследования в данном направлении являются перспективными для разработки научных основ повышения жизнестойкости организма в условиях дефицита кислорода.

ВЫВОДЫ

1. Характер газоиспользования и углеводного обмена у теплокровных животных зависит не только от уровня гипоксии, но и от продолжительности ее воздействия. При более продолжительной гипоксии выявляются 2 фазы: компенсаторная, когда недостаток кислорода восполняется за счет повышения частоты дыхания, и некомпенсаторная, когда снижается частота дыхания и интенсивность обмена вплоть до гибели организма. Одновременно снижается дыхание митохондрий в тканях и происходит накопление лактата в крови.

2. У теплокровных животных нарушения энергетического обмена и функций клеток при гипоксии в компенсаторную фазу начинаются с ограничения электронтранспортной функции на НАД-зависимом участке дыхательной цепи. В некомпенсаторную фазу нарушения электронтранспортной функции распространяются на второй пункт сопряжения, что приводит к значительному снижению синтеза АТФ в тканях.

3. Интенсивность газоиспользования и уровень лактата в крови у холоднокровных животных (степные черепахи) не изменяются в любых условиях гипоксии. Животные сохраняют состояние жизнедеятельности в условиях полного отсутствия кислорода.

4. Мыши и крысы имеют ограниченные возможности для обеспечения гипоксической устойчивости. У черепах эффективно функционируют механизмы, обеспечивающие высокую толерантность организма к гипоксии.

5. Установлено, что из примененных гипометаболических агентов (катацин, бензонал, серотонин, кавергал, гутимин, пирасетам и аминооксиацетат) только катацин и бензонал наиболее эффективно повышают жизнестойкость организма при гипоксии. Гипометаболические агенты ингибируют потребление кислорода организмом, что приводит к подавлению скорости переноса электронов от субстратов окисления по дыхательной цепи митохондрий до молекулярного кислорода.

6. Выявлена более высокая интенсивность дыхания изолированных митохондрий различных тканей крыс, чем черепах наряду с примерно одинаковым ингибирующим влиянием катацина и бензонала на дыхательную активность митохондрий.

7. Активность НАД-Н-оксидазы, сукцинатоксидазы и Н-АТФазы митохондрий печени крыс более высокая, чем у черепах. Гипометаболические агенты эффективно блокируют интенсивность указанных ферментных систем на митохондриальном уровне в обоих случаях.

8. Основными ферментно-метаболическими звеньями, определяющими степень жизнестойкости организма к гипоксии, являются системы переноса электронов и энергии на уровне митохондрий. Их низкая активность у черепах и подавление их гипометаболическими агентами у теплокровных обеспечивают высокую гипоксическую устойчивость организма.

Список опубликованных работ

1. Ахмеров Р.Н., Асанова К.А., Алматов К.Т., Ширинова И.А., Нурдиков Ш.Ш. Различия гипоксических состояний у тепло- и холоднокровных организмов. Известия ВУЗов. Химико-биологические науки. - Ташкент, 2001. № 2. - С. 21 - 25.
2. Кулмаматова И., Ширинова И., Асанова К., Ахмеров Р., Алматов К. Интенсивность обмена и теплоустойчивость у мышей при температурном воздействии на организм. Известия ВУЗов. Химико-биологические науки. - Ташкент, 2001. № 1 - С. 51 - 55.
3. Асанова К.А., Алматов К.Т., Ахмеров Р.Н. Интенсивность газоиспользования в организме у тепло- и холоднокровных животных при гипоксии. Известия ВУЗов. Химико-биологические науки. - Ташкент, 2002. № 2. - С. 20 - 24.
4. Асанова К.А. Гипоксическая устойчивость тепло- и холоднокровных организмов. Проект СЕР компонент в Междунар. Фонд спасения Арала республики научи, практ. конф. - Ош, 2002. - С. 27 - 32.
5. Асанова А.К., Нурдинов Ш.Ш. Митохондриальный механизм повышения жизнестойкости организма и гипоксия. Материалы БХ международной научной студенческой конференции. - Новосибирск, 2002. - С. 157-159.
6. Нурдинов Ш.Ш., Асанова К.А. Характеристика гипометаболических состояний у животных при действии различных агентов. Халкаро илмий— амалий конференция. Биол., экол. ваагротупр. таълими муаммолари ва истикболлари. — Тезислар туплами, 25 -26 апрель. - Ташкент, 2001. - С. 206 - 207.
7. Асанова К.А., Нурдинов Ш.Ш. Повышение жизнестойкости организма к гипоксии с помощью толерантогенов. Халкаро илмий — амалий конференция. Биол., экол. ваагротупр. таълими муаммолари ва истикболлари - Тезислар туплами, 25 - 26 апрель, - Ташкент, 2001. - С. 176 -178.

Асанова Карачач Асановна

Гипоксияда ҳаётчанликни оширишда ҳайвон энергетикаси ва митохондрия энзим тизими роли

Утказилган тадқиқотлар исҳокқонли ҳайвонларнинг газ кислород алмашувини характери гипоксияни даражасигагина эмас, балки унинг таъсирини давомийлигига ҳам боғлиқ эканлиги аниқланди. Ҳар хил сигимли респиратор камерадан фойдаланиш орқали куйидаги узғаришлар аниқланди. а) компенсаторланган фаза, бунда организмда кислород етишмаслиги нафас олиш частотасининг кучайиши ҳисобига тулдирилади. Бу ҳолатда ҳужайра функцияси ва энергетик алмашувини бузилиши нафас олиш занжирини НАД га боғлиқ участкасидан

электронларни ташилишини секинлашипгидан бошланади; б) компенсаторланмайдиган фаза, бунда нафас олиш частотасининг секинлашиши нафас мушакларининг чарчаши сабабли булади, натижада алмашинув интенсивлиги кескин пасайиши кузатилади. Бу ҳолатда, митохондриядаги электрон ташилиши функциясини бузилиши нафас олиш занжирининг иккинчи участкасидаги оксидлавишли фосфорланиш нуктасига таркалади, натижада тукимада АТФ синтези янада купрок пасаяди.

Турли хил гипометаболикларни (катацин, бензонал, серотонин, кавергал, гугимин, пирацетам ва аминooksиацетат) гипоксияда иссиқконли хайвонларга берилганда организмнинг ҳаётчанлиги ошганлиги аниқланди. Бу моддаларнинг энг эффективлари катацин ва бензонал. Бу препаратлар хайвонларнинг кислород истеъмолини секинлаштиради. Организм кислород истеъмолини пасайишнинг физиологик механизми, гипометаболиклар гипоксия шароитида кислородни тежамли сарфлаш режимига утказиб, тукималардаги метаболизмни пасайтиришдан иборат.

Ажратиб олинган митохондрияларда нафас олиш ва оксилланиш фосфорланишни, НАД-Н — оксидаза, сукцинатоксидаза ва Н — АТФ азаларни активликларини урганиш натижасида гипоксияда гипометаболикларни организмнинг ҳаётчанлигини ошириши оксидланиш субстратларидан электронларни нафас олиш занжири буилаб молекуляр кислородга ташилишини ва энзимларнинг интенсивлигини секинлаштиришда эканлиги аниқланди. Демак, гипоксияда организмнинг ҳаётчанлигини ошириш йулларидан бири митохондриянинг энзимларини фаоллиятини бошқаришда экан.

Asanova Karachach Asanovna

Animals energetic and the role of mitochondria enzymatic systems in the increase of hypoxic tolerance

Carried investigations allow finding out that mechanism of gasoxygen exchange in warm blood animals depends not only on the level of hypoxia but on the duration of its application. Though by using respirative chamber of different size it was established;

1. Compensative phase when the oxygen deficiency could be covered by inc-reasing breath rate. In this case the disruption of energetic exchange and cell func-tions began with restriction of electron transportation function on NAD-depend part of respiration chain.

2. Uncompensative phase, when the breath rate became lower as the result of fotiguness of respiratory muscles and this lead to reduce of exchange rate. In this case the disruption of mitochondria electro transport function spreads to the second spot of conjunction. This leads to ATP synthesis in tissue. Staple tortoises do not change the gosoxygen exchange even in the circumstance of deep hypoxia.

By using various hypometabolices - katacyn, benzonal, serotonin, kovergal, gutamin, hyracetam and aminooxyacetat to warm blood animals it was established, that they increase the organism tolerance in the case of hypoxia. Among these compounds the most effective are katacyn, benzonal. These chemicals inhibit the oxygen consumption by whole organism. The physiological effect of oxygen consumption inhibition is that in this case hypometabolices lead the metabolism to more economical regime in relation of oxygen using.

By studying the breath rate and phospholiration activity, NAD H-oxydase suc-cynateoxydase activity and H-ATPase it was established that hypometabolices, that increase the organism tolerance to hypoxia block the electron transportation from substrates to molecular oxygen along respiration chain and inhibit the activity of above-mentioned enzyme systems. Though the mentioned enzyme systems in mitochondria's is one of ways to increase the organism tolerance to hypoxia.