

УДК 577.3: 599.323.4

ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОКОЯ И ОСТРОГО СТРЕССА

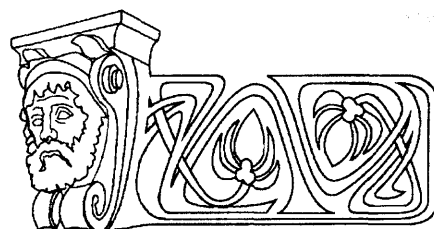
Д.С. Леонтьев, И.Ю. Быкова, Т.Г. Анищенко, М.Н. Кондрашова*

Саратовский государственный университет,
кафедра физиологии человека и животных

E-mail: biofac@sgu.ru

* Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
г. Пущино

E-mail: kondrashova@iteb.ru



В статье рассматриваются вопросы, касающиеся возможных причин различной стресс-устойчивости самок и самцов. Было проведено измерение активности сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и АТФ-азы, полярографическое исследование дыхания на различных субстратах митохондрий самок и самцов в условиях покоя и острого стресса. Обнаружено, что острый стресс приводит к активации энергетического обмена в митохондриях. Это проявляется в увеличении активности АТФ-азы и усилении окисления сукцината. Выявлена повышенная стресс-реактивность митохондрий самцов, что может являться причиной их большей уязвимости со стороны стрессорных факторов.

Sexual features of energy metabolism in rats at rest and under acute stress

D.S. Leontiev, I.Yu. Bykova, T.G. Anishchenko, M.N. Kondrashova

The paper discusses problems concerning possible causes of different stress stability of females and males. Measurements of the activity of succinate dehydrogenase, citrate synthase and ATPase, a polarographic study of breathing on different substrates of male and female mitochondria at rest and under acute stress were conducted. Acute stress was found to result in activation of the energy metabolism in mitochondria. This manifests itself in an increase of the activity of ATPase and promotion of succinate oxidation. A higher stress reactivity of male mitochondria was detected, which may be the cause of their greater vulnerability to stressor factors.

Исследование проблемы половых различий в устойчивости к стрессу предполагает изучение различных уровней организации стрессорных реакций, в число которых входят и механизмы регуляции энергетического обмена. Мы предполагаем, что влияние гормонов и половые различия проявляются и на уровне регуляции митохондриальных ферментов, что определило цель нашего исследования. В представленной работе были изучены активность ключевых ферментов цикла Кребса, АТФ-азного комплекса и основные показатели митохондриального дыхания с учетом полового фактора в покое и после стрессорного воздействия.

Для экспериментов было использовано 45 самок и 50 самцов беспородных крыс массой 220–250 г. Стресс моделировался путем иммобилизации животного на спине в течение 30 мин. Проводилось полярографическое исследование дыхания гомогенатов печени. Среда инкубации содержала 125 мМ KCL, 10 мМ Hepes, $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 1,5 мМ, Ph 7,4. В качестве субстратов окисления использовали сукцинат 4 мМ или α -кетоглута-



рат (КГЛ) 4 мМ. С целью изучения вклада эндогенного сукцината в общее дыхание применяли добавку 2 мМ малоната (МАЛ) – ингибитора сукцинатдегидрогеназы (СДГ). Для оценки фосфорилирующего дыхания использовалась добавка 200 мкМ АДФ. Разобщенное дыхание изучали при добавлении в ячейку 10^{-6} М Сl-ССР [5]. Содержание белка митохондрий определяли по методу Лоури.

Активность СДГ определяли по степени восстановленности феррицианида $K_3[Fe(CN)_6]$. Активность цитратсинтазы оценивали по скорости образования цитрата в инкубируемой пробе. Активность АТФ-азы измеряли по скорости образования неорганического фосфата при гидролизе АТФ с использованием отмытых митохондрий [6]. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы «SigmaPlot». Для оценки достоверности различий применяли парный t-критерий Стьюдента.

Результаты показали, что у самок в покое скорость фосфорилирующего дыхания в состоянии V3 при окислении сукцината на 28% выше, чем у самцов ($p < 0,05$), притом, что начальная скорость V_2 была примерно одинаковой (рис. 1, а). Разобщенное дыхание на сукцинате у самок также было значительно выше, чем у самцов. Так, добавка Сl-ССР увеличивала интенсивность дыхания на 95% ($p < 0,05$) у самок и на 67% ($p < 0,05$) у самцов (рис. 2, а). Это полностью совпадает с разницей по фосфорилирующему дыханию (на те же 28%, $p < 0,05$). В экспериментах, проведенных в весенний сезон (март, апрель), различия в скорости разобщен-

ного дыхания на сукцинате проявлялись в еще большей степени. Активация дыхания составила для самок 85%, а для самцов 37% ($p < 0,05$). Независимо от сезона у самцов состояние разобщенного дыхания сменялось ингибированием, и скорость поглощения кислорода приходила к исходному значению, в то время как у самок ингибирования не наблюдалось либо выражалось в меньшей степени (см. рис. 2,а). Как и на сукцинате, дыхание на КГЛ в покое у самцов ниже, чем у самок. Добавление малоната в пробу вызывает ингибирование СДГ и позволяет выявить истинную скорость окисления КГЛ и оценить вклад эндогенного сукцината в общее дыхание. Пробы с малонатом показали, что истинная скорость разобщенного дыхания на КГЛ одинакова для самок и самцов, а вклад эндогенного сукцината почти вдвое выше у самок (рис. 3, а, б). Обнаружение более интенсивного дыхания на сукцинате у самок позволяет предположить, что активность СДГ в покое у них выше. Действительно, сукцинатдегидрогеназная активность митохондрий самок на 35% выше, чем у самцов ($p < 0,05$, рис. 4). В то же время скорость образования цитрата у контрольных самок и самцов достоверно не отличалась (рис. 5).

Измерение активности АТФ-азы показало, что активность фермента в покое существенно различается между самцами и самками. Так, уровень АТФ-азной активности в печени у самок составил $0,083 \pm 0,003$ мкмоль Φ_n /мг белка в час, а у самцов – $0,065 \pm 0,002$ мкмоль Φ_n /мг белка в час. Это означает, что активность АТФ-азы в печени у самок превышала таковую у самцов на 27%

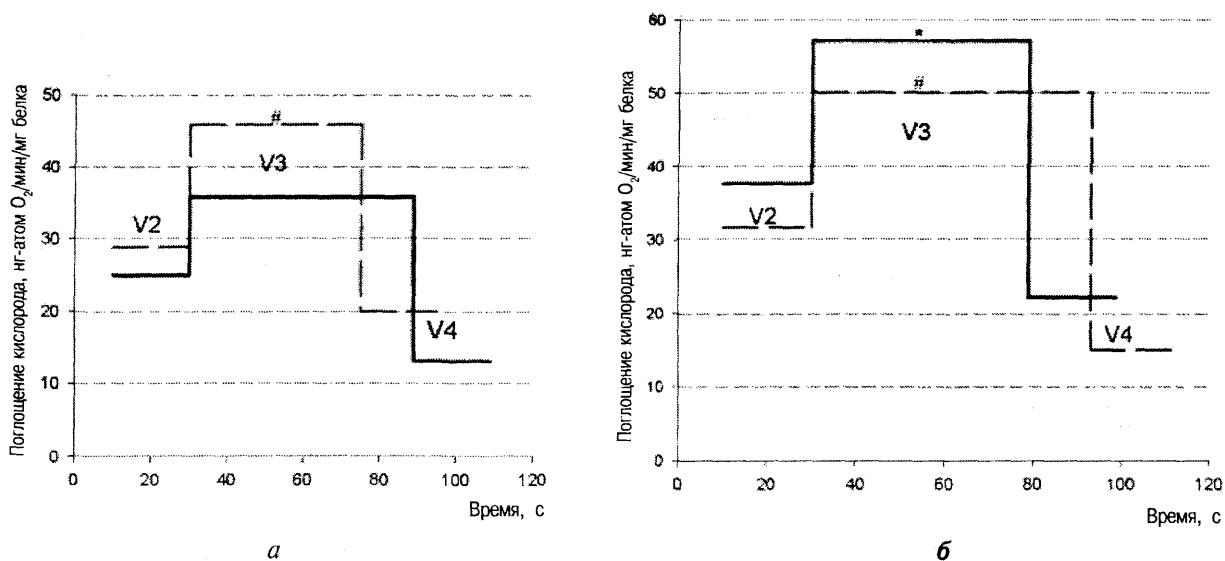


Рис. 1. Фосфорилирующее дыхание митохондрий контрольных и стрессированных крыс при окислении сукцината (среда инкубации: КСl 125 мМ, Нерес 10 мМ, KH_2PO_4 1,5 мМ; добавки: 200 мкМ АДФ, гомогенат 50 мкл): а – интактные животные; б – после острого стресса; * – $p < 0,05$ относительно контроля, # – относительно самцов; - - - самки; — самцы

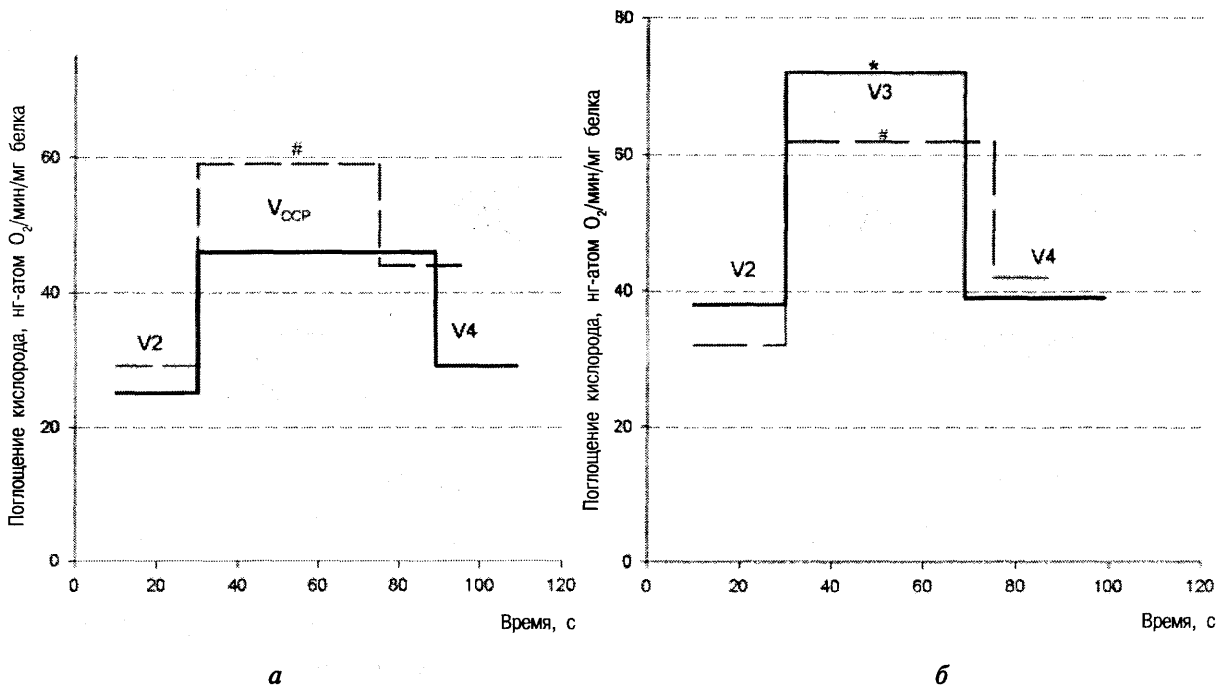


Рис. 2. Разобщенное дыхание митохондрий контрольных и стрессированных крыс при окислении сукцината (среда инкубации: KCl 125 mM, Nерес 10 mM, KН₂РO₄ 1,5 mM; добавки: Cl-CCP 10⁻⁶ M, гомогенат 50 мкл): а — интактные животные; б — после острого стресса; * — p<0.05 относительно контроля, # — относительно самцов; - - - самки; — — — самцы

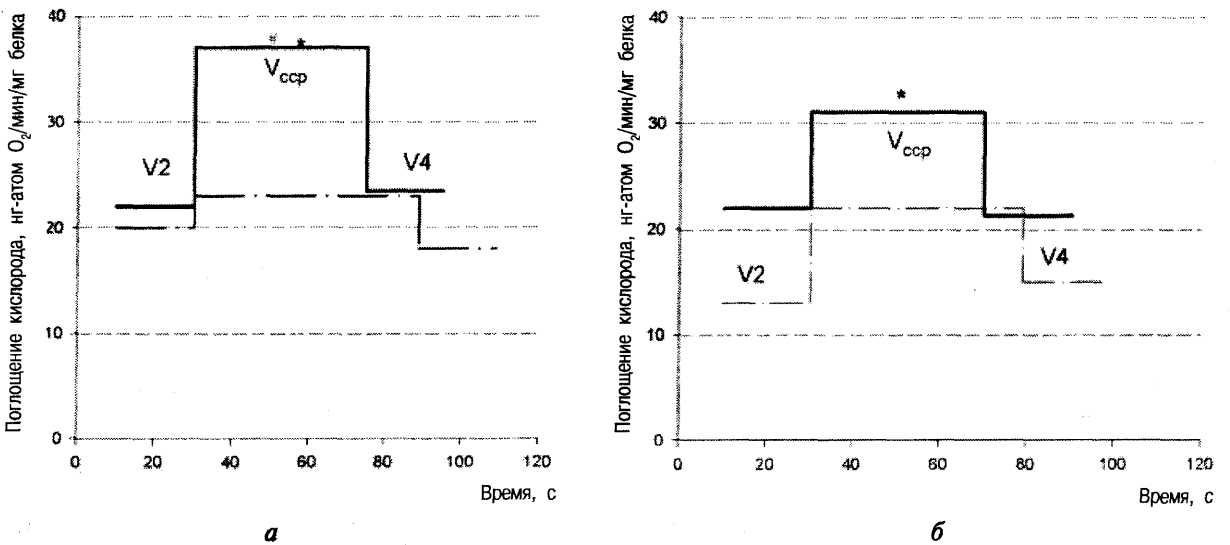


Рис. 3. Разобщенное дыхание митохондрий контрольных экземпляров крыс при окислении α-кетоглутарата (в качестве субстрата окисления α-кетоглутарата 4mM; среда инкубации: KCl 125 mM, Nерес 10 mM, KН₂РO₄ 1,5 mM; добавки: 10⁻⁶ M Cl-CCP, гомогенат 50 мкл): а — самки; б — самцы; * — p<0,05 относительно пробы кетоглутарат + МАЛ, # — относительно самцов; — — — кетоглутарат; - - - кетоглутарат + МАЛ

(p<0,05). Повышенная у самок по сравнению с самцами активность сукцинатдегидрогеназы и АТФ-азы в покое может в значительной мере обуславливаться более высокой у самок актив-

ностью адренергических структур [7, 8]. Ранее показано, что катехоламины оказывают активирующее действие на СДГ [9] и АТФ-азу [10]. Острый стресс привел к усилению стимулирован-

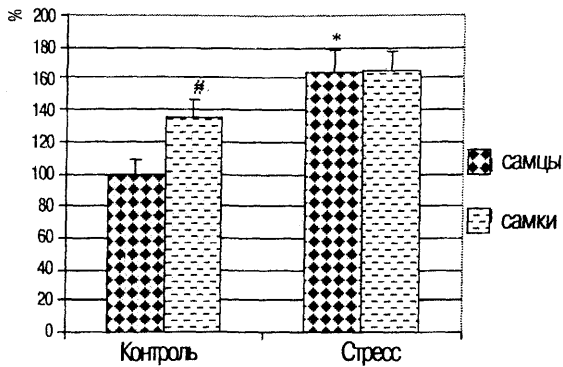


Рис. 4. Активность СДГ у самок и самцов в покое и под действием стресса. Различия статистически достоверны ($p < 0,05$): * — относительно контрольной группы животных; # — по отношению к самцам. Данные приведены в процентах по отношению к интактным самцам

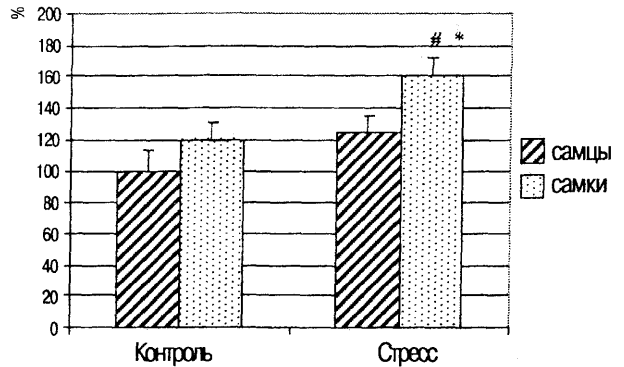
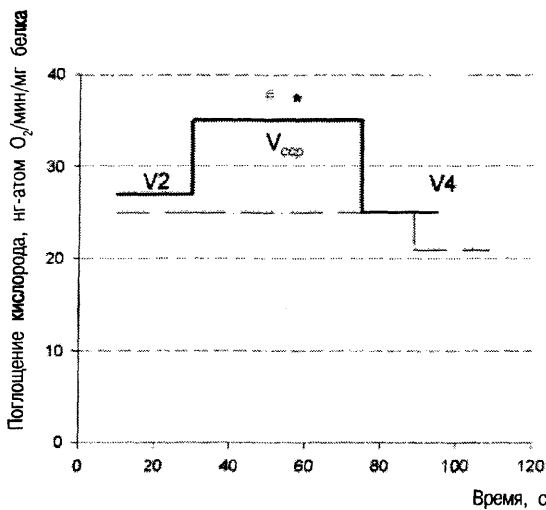
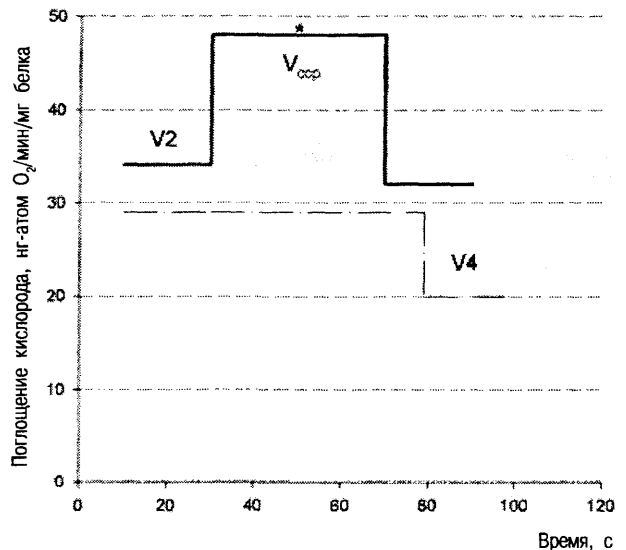


Рис. 5. Активность цитратсинтазы у самок и самцов в покое и под действием стресса. Различия статистически достоверны ($p < 0,05$): * — относительно контрольной группы животных; # — по отношению к самцам. Данные приведены в процентах по отношению к интактным самцам



а



б

Рис. 6. Разобщенное дыхание митохондрий стрессированных крыс при окислении α -кетоглутарата (в качестве субстрата окисления α -кетоглутарата 4мМ; среда инкубации: КСI 125 мМ, Нерес 10 мМ, KH_2PO_4 1,5 мМ; добавки: 10^{-6} М СI-ССР, гомогенат 50 мкл): а — самки; б — самцы; * — $p < 0,05$ относительно пробы кетоглутарат + МАЛ, # — относительно самцов; — кетоглутарат; - - - кетоглутарат + МАЛ

ного АДФ окисления сукцината митохондриями самцов на 62% ($p < 0,05$) (см. рис. 1, б).

В отличие от самцов, у самок такого заметного усиления не произошло ($p > 0,05$). У самцов увеличилась и интенсивность разобщенного окисления сукцината на 56% ($p < 0,05$) (см. рис. 2, б). Как и на сукцинате, у самцов, но не у самок, наблюдалось усиление дыхания на КГЛ после стресса. Особо ярко выражены различия по малонатчувствительной фракции дыхания. В покое она несколько ниже у самцов, чем у самок, и увеличивается у них вдвое

после стресса, в то время как у самок увеличения не наблюдается (рис. 6). Опыты по измерению разных форм дыхания показывают, что реакция на стресс происходит за счет изменения окисления сукцината как добавленного (см. рис. 1, 2), так и образующегося из КГЛ — малонатчувствительная фракция (рис. 3, б). Окисление КГЛ в присутствии МАЛ меняется меньше, причем это может быть обусловлено также вкладом сукцината, так как полного торможения окисления эндогенного сукцината малонатом не происходит.



Как и следовало ожидать, на основании результатов полярографического исследования, активность СДГ и цитратсинтазы меняется под влиянием острого стресса (см. рис. 4, 5). Так, активность СДГ митохондрий самцов возросла после стресса на 56% ($p < 0,05$). У самок прирост активности фермента был выражен в меньшей степени и составил 30% ($p < 0,05$). Противоположный характер носят половые различия в активности цитратсинтазы – у самцов её увеличение было вдвое ниже, чем у самок, 25% и 60%, соответственно ($p < 0,05$). Различия можно объяснить тем, что протекание полного цикла Кребса характерно для состояния покоя, а обход его начальных этапов, приводящий к ускоренному образованию сукцината, характерен для возбуждения. Как показано, возбуждение мощнее реализуется у самцов. Возросшая в условиях стресса потребность клетки в энергетических ресурсах запускает механизмы, уско-

ряющие синтез АТФ. Одним из ключевых факторов, определяющих скорость образования АТФ, является активность митохондриальной АТФ-азы. Наши опыты показали, что после стрессорного воздействия активность этого фермента значительно возрастает – и у самок и у самцов (на 96 и 100% соответственно ($p < 0,05$)). Таким образом, острый стресс приводит к активации энергетического обмена в митохондриях. Это проявляется в усилении окисления сукцината и увеличении активности АТФ-азы. При этом, если в условиях покоя активность основных механизмов энергообеспечения выше в митохондриях самок, то при стрессе активация энергетического обмена более выражена у самцов. Вопрос о механизмах обнаруженных нами половых различий остается открытым и требует продолжения исследований.

Исследования выполнены при частичной поддержке CRDF (грант SR-006-XI).

Библиографический список

1. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V.193. P.265.
2. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой Л., 1982. С. 207.
3. Siddiqui A., Gilmore D. Regional differences in the catecholamine content of rat brain: effects of neonatal castration and androgenization // *Acta Endocrinol. (Copenh.)*. 1988. V. 118. P. 483–494.
4. Vaccari A., Brotman S., Cimino G., Timiras P. Sex differentiation of neurotransmitter system // *Brain Res.* 1977. V.132. P.176–185.
5. Леонтьев Д.С., Федотчева Н.И., Кондрашова М.Н. Реципрокный эффект адреналина и серотонина на окисление сукцината и α -кетоглутарата в гомогенатах печени и мозга крыс // *Совр. технологии в педиатрии и хирургии: Материалы I Всерос. съезда.* М., 2002. С. 467.
6. Shukla V.H., Dave K.R., Katyare S.S. Effect of catecholamine depletion on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria; use of reserpine // *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 2000. V.127, №1. P. 79.