

- Biophys.—1972.—152, N 1.— P. 92—104.
5. Senger H. Changes of the oxidative phosphorylation in mitochondria of rat skeletal muscle following strenuous exercise // Acta Biol. Med. Germ.—1975.—34, N 2.— P. 181—188.
 6. Von Jagemann K., Hasart E. H., Härtel R., Roth W. Atmung von Mitochondrien aus Rattenskelettmuskeln nach mehrwöchigen Trainingsprogrammen und unter dem Einfluss von Lactat in vitro // Med. und Sport.—1977.—17, N 12.— P. 401—403.
 7. Von Korff R. W., Twedt R. M. Interaction of glycolytic and mitochondrial enzyme systems. I. Oxidation of lactate and phosphoenolpyruvate // Biochim. et biophys. acta.—1957.—23, N 1.— P. 143—148.
 8. Despande P. D., Hickman D. D., Von Korff R. W. Morphology of isolated rabbit heart muscle mitochondria and the oxidation of extramitochondrial reduced diphosphopyridine nucleotide // J. Biophys. Biochem. Cyt.—1961.—11, N 1.— P. 77—93.
 9. Szeresno-Kaczarek A., Litwinska D., Popinigis J. Oxidation of NADH via an «external» pathway in skeletal muscle mitochondria and its possible role in the repayment of lactacid oxygen debt // Int. J. Biochem.—1984.—16, N 12.— P. 1221—1235.
 10. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран.— М.: Наука, 1983.—564 с.
 11. Hogehoom J. H., Schneider W. C., Pallade G. E. Cytochemical studies of mammalian tissues. Isolation of intact mitochondria from rat liver, some biochemical properties of mitochondrial and submicroscopic particulate material // J. Biol. Chem.—1958.—172, N 2.— P. 619—641.
 12. Ахмеров Р. Н. Размельчитель ткани (комбинированный гомогенизатор) с резьбовым ножевым блоком и тканеподающим устройством // Узб. биол. журн.—1979.— № 5.— С. 71—72.
 13. Chance B., Williams G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation // J. Biol. Chem.—1955.—217.— P. 383—427.
 14. Lowry O. A., Rosenbragh J., Farr A. L., Randle R. J. Protein measurement with the folin reagent // Ibid.—1951.—193, N 1.— P. 265—275.
 15. Blanchaer M. C., Lundquist C.-G., Griffith T. J. Factors influencing the utilization of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by pigeon heart mitochondria // Canad J. Biochem.—1966.—44, N 1.— P. 105—117.
 16. Rasmussen N. F. The oxidation of added NADH by intact heart mitochondria // FEBS Lett.—1969.—2, N 3.— P. 157—161.
 17. Ахмеров Р. Н. Тканевое окисление и его митохондриальное нефосфорилирующее звено // Узб. биол. журн.—1984.— № 4.— С. 20—22.
 18. Akhmerov R. N. Qualitative difference in mitochondria of endothermic and ectothermic animals // FEBS Lett.—1986.—198, N 2.— P. 151—155.
 19. Chao D. L., Davis E. J. Studies on the role of Mg^{+2} and Mg^{+2} -stimulated adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation // Biochemistry.—1972.—11, N 10.— P. 1943—1953.
 20. Кокос Ю. М., Ахмеров Р. Н., Попов В. К., Хицян С. С. Особенности энергоспряженного дыхания кардиомиоцитов // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена.— Пушкино, 1987.— С. 14—24.

Ин-т физиологии АН УзССР, Ташкент

Получено 06.10.89

УДК 577.125.38+597.554.3+639.311

© А. А. ЖИДЕНКО, В. В. ГРУБИНКО, А. Ф. ЯВОНЕНКО

РОЛЬ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИИ ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ЗИМНЕГО ГОЛОДАНИЯ

Исследовано влияние естественного зимнего голодания на содержание кетоновых тел, оксалоацетата, глюкозы, уровень 3-оксисубтиратдегидрогеназной активности в тканях молоди карпа. Установлено наличие компенсаторного механизма энергообеспечения в периферических тканях, осуществляемого путем образования кетоновых тел в печени и распределения их в тканях белой мускулатуры и мозга. Для последнего кетоновые тела в процессе зимовки служат дополнительным субстратом окисления.

Функциональная активность клеток организма определяется уровнем их энергообеспечения. У пойкилотермных животных основными источниками энергии являются жир, гликоген, белки [1]. У малоподвижных рыб, к которым относится карп, в энергетическом обмене большую роль играют белки и свободные аминокислоты, 50—90 % содержания которых может принимать участие в образовании энергии [2].

Особо важное значение они приобретают при адаптации животных к изменяющимся условиям внешней среды обитания на протяжении годового цикла. Так, зимнее голодание карпа сопровождается снижением уровня всех запасных питательных веществ: на зиму потери жира составляют 50 % (200—300 ккал), белка — 17—30 % (100—150 ккал) [3]. Однако недостаточное количество питательных веществ у голодающих рыб может привести к массовой гибели зимующих карпов.

В то же время известно, что кетоновые тела могут функционировать в организме субстрата окисления как дополнительный источник энергии, а также служат регуляторами метаболизма [4, 5]. Отмечена роль кетоновых тел у крыс не только при голодании, но и в других экстремальных ситуациях: при гипоксии, гипотермии и гиперкапнии [6]. У пойкилотермных животных, которые находятся в неблагоприятных условиях зимнего голодания, вопросы метаболизма кетоновых тел изучены недостаточно. Выяснение данного вопроса стало целью нашего исследования.

Материалы и методы

Исследования проводили на сеголетках карпа, которых отбирали из зимовального пруда в октябре, феврале и апреле.

Гидрохимический режим воды контролировали с помощью прибора Horiba модели U-7 (Япония).

Содержание кетоновых тел определяли методом, описанным ранее [7], в некоторой модификации. У исследуемых рыб отбирали белые мышцы, мозг, печень и помещали в жидкий азот. Ткани измельчали и делали навески, не допуская размораживания. Безбелковый фильтрат получали из 1 г измельченной ткани с помощью экстракции 3 мл 6 %-ной хлорной кислотой и центрифугирования (5000 об/мин; 15 мин). После добавления в него насыщенного раствора едкого натра и цветного реактива (2 мл салицилового альдегида в 98 мл абсолютного спирта) суммарное содержание ацетоацетата и ацетона определяли спектрофотометрически. Стандартным раствором служил химически чистый ацетон. Содержание метаболитов выражали в мг % ацетона.

Митохондрии выделяли, используя общепринятую методику [8] и дополнительно очищали ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы 0,32—1,2 М [9]. Чистоту выделения и эффективность разрушения митохондрий контролировали с помощью электронной микроскопии.

3-Оксибутиратдегидрогеназную активность определяли, как уже было описано [10]. Среда инкубации состояла из 50 мМ трис-HCl, pH 8,1, 0,5 мМ ЭДТА, 0,3 мМ дитиотритона, 0,4 мг БСА на 1 мл, 1,4 % этанола, 0,5 мМ NAD⁺, общий объем 3 мл. На протяжении 7 мин при температуре 30 °С преинкубировали смесь, состоящую из вносимого 100 мкг белка везикул, 0,3 мл 0,2 %-ного тритона X-100, 15 мкл антимицина А, добавленного для предотвращения повторного окисления NADH-H⁺ в цепи транспорта электронов. Реакцию начинали, внося 20 мкмоль β D,L-оксибутирата. Активность 3-оксибутиратдегидрогеназы регистрировали спектрофотометрически по восстановлению NAD⁺.

Количество оксалоацетата определяли ферментативно по [11], содержание белка — по методу Лоури, глюкозу — о-толуидиновым методом. Статистическую обработку проводили по Ойвину.

Результаты и обсуждение

На протяжении зимовки гидрохимический режим прудов соответствовал норме, что исключало развитие у исследуемой молодежи карпа гипоксии, гиперкапнии, гипотермии. В то же время нами обнаружены изменения содержания кетоновых тел в белой мускулатуре, печени и мозге рыб (табл. 1). Наиболее низкий уровень кетоновых тел в октябре отмечен в белой мускулатуре: уровень ацетоацетата+ацетона в мышцах почти в 2 раза ниже, чем в печени и мозге, 3-оксибутирата соответственно в 8 и 2,5 раза.

Поскольку температура воды при взятии пробы составила 5,2 °С, можно считать вероятным переход рыб, как и всех пойкилотермных организмов, на эндогенное питание. Известно, что в качестве резервного энергетического материала при этом первыми расходуются липиды [12]. Показано, что в эндогенном питании сеголетков карпа в зимний период ведущее значение принадлежит липидам мышц, которых расходуется до 30 % от общих потерь организма [13]. Однако накопления

кетонных тел, образовавшихся при метаболизме липидов, в мышечной ткани мы не наблюдаем. В мышцах в то же время обнаружен высокий уровень 3-оксибутиратдегидрогеназной активности, более чем в 4 раза превышающий аналогичную активность в печени и в 2 раза — в мозге (табл. 2).

В опытах, проведенных в середине зимовки (февраль) при температуре воды 3,5 °С, обнаружено резкое увеличение содержания 3-оксибутирата в мышцах, ацетоацетата в печени, обоих веществ в мозге. Таким образом, увеличение содержания кетонных тел, как и при голодании млекопитающих [14], наблюдается в тканях пойкилотермных животных. Причиной повышения уровня кетонных тел в мышцах и мозге молоди карпа может быть снижение уровня 3-оксибутиратдегидрогеназной активности, вероятно, связанное со значительным расходом в этот период резервных жиров [3, 12, 13]. Существование такого явления связано с возможным использованием кетонных тел в качестве энергетического субстрата для периферических тканей. Запасы глюкозы у пойкилотермных животных невелики [15]. Ее образование в процессе глюконеогенеза хотя и приводит к увеличению содержания в феврале (табл. 3), в данных условиях этого недостаточно для периферических тканей молоди карпа в связи с использованием глюкозы не только как субстрата окисления, но и в других целях (предохранение от замерзания тканевых жидкостей, осморегуляции, синтеза необходимых промежуточных продуктов обмена) [16]. Поэтому, как и у млекопитающих животных, у зимующих рыб возможно существование механизма образования кетонных тел по схеме:



Что касается оксалоацетата, то наблюдается тенденция к снижению его уровня в процессе зимовки, достигающего наименьшего значения для мышечной ткани в феврале, для печени и мозга — в апреле.

Таблица 1. Содержание кетонных тел в мышцах, печени и мозге молоди карпа в процессе зимовки (мг % ацетона; $M \pm m$, $n=9$)

Исследуемые ткани	Октябрь	Февраль	Апрель	
			1-я группа	2-я группа
Ацетоацетат+ацетон				
Мышцы	0,36±0,02	0,44±0,02*	0,27±0,01*	0,48±0,01*
Печень	0,53±0,03	1,52±0,06*	0,49±0,06	0,77±0,06*
Мозг	0,66±0,06	2,23±0,09*	0,62±0,10	0,89±0,10*
3-Оксибутират				
Мышцы	0,04±0,01	0,14±0,01*	0,13±0,01*	0,15±0,01
Печень	0,32±0,06	0,28±0,02	0,40±0,03	0,43±0,03
Мозг	0,10±0,03	0,27±0,01*	0,18±0,01*	0,29±0,02*

* В табл. 1—3 различия по отношению к показателям октября и между исследуемыми группами статистически достоверны, $p < 0,001-0,05$.

Таблица 2. 3-Оксибутиратдегидрогеназная активность в мышцах, печени и мозге молоди карпа в процессе зимовки (нмоль NAD^+ на 1 мг белка за 1 мин; ($M \pm m$; $n=9$))

Исследуемые ткани	Октябрь	Февраль	Апрель	
			1-я группа	2-я группа
Мышцы	8,06±1,02	1,05±0,10*	1,44±0,52*	5,50±0,98*
Печень	1,74±0,19	2,20±0,43	1,80±0,88	1,81±0,38
Мозг	3,53±0,33	2,25±0,44*	1,90±0,21*	3,40±0,39*

Данные изменения, по-видимому, способствуют снижению уровня активности ферментов ЦТК, что характерно для рыб в условиях зимовки [17], и приводят к переориентации ацетил-CoA на синтез кетоновых тел по вышеприведенной схеме.

По окончании зимовки в апреле молодь рыбы мы разделили на две группы: к первой были отнесены внешне здоровые, подвижные, активные, быстро реагирующие на раздражение годовики карпа. Ко второй группе — малоподвижные, вялые, не реагирующие на внешнее раздражение особи. Эти две группы рыб отличались друг от друга биохимическими параметрами (табл. 1—3). Пониженное содержание

Таблица 3. Содержание оксалоацетата и глюкозы в мышцах, печени и мозге молоди карпа в процессе зимовки ($M \pm m$, $n=9$)

Исследуемые ткани	Октябрь	Февраль	Апрель	
			1-я группа	2-я группа
Оксалоацетат, мкмоль на 1 г сырой ткани				
Мышцы	0,15±0,01	0,08±0,02*	0,17±0,08	0,09±0,03*
Печень	0,41±0,07	0,38±0,20	0,17±0,07*	0,08±0,03*
Мозг	0,33±0,04	0,35±0,19	0,07±0,01*	0,01±0,01*
Глюкоза, мг %				
Мышцы	2,50±0,06	35,60±7,40*	2,10±0,40	0,70±0,10*
Печень	113,06±12,10	132,60±11,70	6,90±0,50*	0,30±0,05*
Мозг	4,74±0,14	31,50±2,60*	1,40±0,10*	0,10±0,01*

оксалоацетата в печени и глюкозы в мозге у рыб второй группы по сравнению с первой может служить доказательством наличия вышеописанного компенсаторного механизма образования кетоновых тел в качестве добавочного энергетического субстрата. Более высокая 3-оксибутиратдегидрогеназная активность в периферических тканях подтверждает данный вывод. Концентрация кетоновых тел представляет собой баланс между образованием их в печени и утилизацией в периферических тканях [4]. Существование указанного равновесия в данном случае объяснимо тем, что в печени на протяжении зимовки уровень 3-оксибутиратдегидрогеназной активности практически не изменяется. Это может свидетельствовать об отсутствии утилизации кетоновых тел в печени. Дисбаланс между синтезом кетоновых тел в печени и расходом в мозге и мышцах, вероятно, является причиной накопления этих веществ в периферических тканях, что вызывает интоксикацию организма, нарушение буферного гомеостаза и служит одной из возможных причин гибели зимующей молоди рыб.

Таким образом, в условиях зимнего голодания роль дополнительного источника энергии для мозга молоди карпа наряду с глюкозой принадлежит кетоновым телам, образование и использование которых является адаптивным компенсаторным механизмом энергообеспечения периферических тканей зимующих рыб, в первую очередь, мозга.

А. О. Жиденко, В. В. Грубинко, О. Ф. Явоненко

РОЛЬ КЕТОНОВИХ ТІЛ В ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННІ ПОЙКІЛОТЕРМНИХ ОРГАНІЗМІВ В УМОВАХ ЗИМОВОГО ГОЛОДУВАННЯ

Резюме

Досліджено вплив природного зимового голодування на вміст кетонових тіл, оксалоацетату, глюкози та рівень 3-оксибутиратдегидрогеназної активності в тканинах молоді коропа. Встановлено наявність компенсаційного механізму енергозабезпечення в периферійних тканинах шляхом утворення кетонових тіл в печінці і розподіл останніх в тканинах білих м'язів та мозку. Для останнього кетонові тіла в процесі зимівлі є додатковим субстратом окислення.

Чернігів. пед. ін-т ім. Т. Г. Шевченка

A. A. Zhidenko, V. V. Grubinko, A. F. Yavonenko

ROLE OF KETONE BODIES IN THE ENERGY SUPPLY
OF POIKILOTHERMAL ORGANISMS UNDER WINTER STARVATION

Summary

Natural winter starvation has been studied for its effect on the content of ketone bodies, oxaloacetate, glucose, 3-oxobutyrate-dehydrogenase activity level in the carp fry tissue. A compensatory mechanism of the energy supply in peripheral tissues is found proceeding by formation of ketone bodies in the liver and their distribution in the tissues of white muscles and brain. For the latter the ketone bodies in wintering serve as an additional oxidation substrate.

T. H. Schevchenko Pedagogical Institute, Chernihiv

1. Шульман Г. Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб.— М.: Пищ. пром-сть, 1972.— 368 с.
2. Creac'h Y. Protein thiols and free amino acids of carp tissues during prolonged starvation // Arch. Sci. Physiol.— 1966.— 20, N 1.— P. 115—121.
3. Мухина Р. И., Верина З. И. К вопросу о физиологических основах зимовки сеголетков карпа // Сб. науч. тр. ВНИИПРХ.— М.: 1973.— С. 214—224.
4. Анিকেева С. П., Панченко Л. Ф., Штернберг Ю. М. Биохимические и регуляторные функции кетоновых тел в организме // Вопр. мед. химии.— 1987.— 33, № 6.— С. 11—23.
5. Wu G., Thompson J. R. Ketone bodies inhibit leucine degradation in chick skeletal muscle // Int. J. Biochem.— 1987.— 19, N 10.— P. 937—942.
6. Булах Е. И., Баев В. И., Братцева С. А. Кетоновые тела в тканях животных при острой гипоксии, охлаждении и измененной газовой среде // Укр. биохим. журн.— 1974.— 46, № 1.— С. 96—100.
7. Баев В. И., Булах Е. И. Способ определения кетоновых тел в тканях // Мат-лы IV конф. и выступлений по изобретению и рационализации в медицине.— Л.: Медицина, 1973.— С. 89—90.
8. Зинич В. Н. Метод измерения 2-оксоглутаратдегидрогеназной активности интактных митохондрий // Укр. биохим. журн.— 1986.— 58, № 2.— С. 73—77.
9. Арутюнян А. В., Гулян Э. А., Нерсисян Ц. М. и др. АМР-дезаминазная активность ядерной и митохондриальной фракции ткани мозга // Там же.— 1978.— 50, № 5.— С. 554—558.
10. Brady L. J., Hoppel, Brady P. S. Hepatic mitochondria innermembrane properties, γ -oxidation and carnitine palmitoyltransferases A and B // Biochem J.— 1986.— 233, N 2.— P. 427—433.
11. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой.— Л.: Изд. Ленингр. ун-та, 1982.— 272 с.
12. Лав Р. М. Химическая биология рыб.— М.: Пищ. пром-сть, 1976.— 187 с.
13. Баженова К. Я., Маханько В. А. Участие различных органов и тканей в эндогенном питании сеголетков карпа в зимний период // Сб. науч. тр. ВНИИПРХ.— М.: 1975.— 12.— С. 70—75.
14. Ardaw M., Sallen M., Majzoub M. F. Glutamine and ketone — body metabolism in the small intestine of starved peaklactating rats // Biochimie.— 1988.— 70, N 6.— P. 749—755.
15. Морозова А. Л., Астахова Л. П., Силкина Е. Н. Углеводный обмен при плавании рыб // Элементы физиологии и биохимии общего и активного обмена у рыб.— Киев: Наук. думка, 1978.— С. 122—144.
16. Хочачка П. В., Сомеро Д. Н. Биохимическая адаптация.— М.: Мир, 1988.— 568 с.
17. Арсан О. М. Роль температуры водной среды в регуляции процессов гликолиза и трикарбонового цикла в организме рыб // Гидробиол. журн.— 1986.— 22, № 3.— С. 57—61.

Чернягов. пед. ин-т им. Т. Г. Шевченко

Получено 20.09.89