

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ  
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

МИРОНОВА НАТАЛЬЯ ГЕОРГИЕВНА

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ И РЕПАРАЦИИ  
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ-ОТТАИВАНИИ

03.00.22 - криобиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Харьков 1993



00815989 (1)

кафедре молекулярної і прикладної  
ударственного университета

26 26.389

Научный руководитель - доктор биологических наук,  
профессор В.В.Лемешко

Официальные, оппоненты: доктор медицинских наук,  
профессор Е.Я.Панков.  
кандидат биологических наук,  
А.Ю.Петренко

Ведущая организация - Институт геронтологии МЗ Украины  
( г.Киев).

Защита состоится "16" февраля 1993 года в "13"<sup>30</sup> часов  
на заседании специализированного Совета Д 016.60.01 при Инсти-  
туте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины (310015,  
г.Харьков, ул.Переяславская, 23)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИПКиК АН  
Украины.

Автореферат разослан "15-января" 1993 г.

Ученый секретарь специализиро-  
ванного Совета Д 016.60.01

доктор мед.наук А.Н.Гольцев



Актуальность проблемы. Одним из экспериментальных подходов к раскрытию механизмов криоповреждения биологических объектов является выяснение характера и степени структурно-функциональных изменений, происходящих после замораживания и оттаивания, в зависимости от уровня организации, вида и степени дифференциации.

Повреждение клеток и клеточных органелл при низкотемпературном воздействии в значительной мере обусловлено криодеструкцией их мембран [Araki, 1977; Белоус, 1981; Бондаренко и др., 1982]. Среди большого числа параметров, позволяющих оценивать структурно-функциональное состояние клеток в процессе криоконсервации и отогрева, одним из наиболее важных является система окислительного фосфорилирования митохондрий, весьма чувствительная к холодовому воздействию [Scherman, 1972; Лемешко, 1973, 1977; Петренко, 1984; Tsvetkov et al., 1985]. Совершенно очевидно, что для гибели клеток во время их замораживания достаточно повреждения митохондрий и локализованной в них системы генерации энергии [Greiff et al., 1961; Heber et al., 1964; Fuller et al., 1989], а для восстановления пролиферативной активности криоконсервированных клеток необходима репарация системы митохондриального окислительного фосфорилирования [Федец, 1989].

Хорошо известно, что решающую роль в механизме генерации энергии играет внутренняя мембрана митохондрий [Mitchell, 1961], а характер криоповреждения мембран в большой степени зависит от их структурного состояния [Гулевский и др., 1988]. К настоящему времени показано, что структурная организация биомембран претерпевает заметные изменения в процессе онтогенеза [Frolkis et al., 1968; Hansford, 1983]. В литературе имеется также данные, свидетельствующие в пользу предположения о том, что возраст животного, степень зрелости отдельно взятых клеточных популяций может в значительной мере определять чувствительность биологических систем к действию замораживания-оттаивания [Weinbuch et al., 1959; Лемешко и др., 1983, 1986; Суббота и др., 1987, 1988; Говоруха и др., 1989]. С другой стороны, криочувствительность мембран может служить одним из интегральных критериев их структурных изменений в онтоге-

незе.

После замораживания-оттаивания митохондрии способны частично восстанавливать свою активность [Racker, 1972; Лемешко, 1973, Лемешко и др., 1992; Петренко, 1984], хотя механизм репаративных процессов окончательно не выяснен. Возрастные особенности этого явления не исследованы.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось изучение характера изменений окислительного фосфорилирования и ионной проницаемости мембран митохондрий при замораживании и последующем отогреве органелл для выявления возрастных особенностей структурно-функционального состояния митохондриальных мембран и их репарации после криовоздействия.

Исходя из цели были определены следующие задачи:

1. Исследовать дыхательную, фосфорилирующую и АТФазную активность митохондрий печени крыс разного возраста при замораживании-оттаивании.
2. Изучить влияние замораживания-оттаивания на кинетику изменения уровня восстановленности пиридиннуклеотидов митохондрий печени крыс разного возраста, как кофакторов, имеющих непосредственное отношение к регуляции ионной проницаемости внутренней мембраны.
3. Оценить возможное участие  $Ca^{2+}$ -зависимой белковой поры внутренней мембраны в механизме криоповреждения и последующей репарации митохондрий.
4. Исследовать особенности репарации митохондрий печени крыс разного возраста после криовоздействия.

Научная новизна. Установлены характер криоповреждений и некоторые закономерности репаративных процессов в митохондриях печени крыс разного возраста после отогрева. Показано, что уровень восстановленности пиридиннуклеотидов в митохондриях, изменяющийся с возрастом животных, играет значительную роль в репарации органелл после замораживания-оттаивания. Изучена динамика репаративных процессов в зависимости от возраста животных и определены некоторые условия эффективного восстановления функционального состояния митохондрий после криовоздействия.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Замораживание-оттаивание митохондрий печени крыс разного возраста в жидком азоте вызывает в разной степени выраженное снижение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов и час-

тичное разобщение окислительного фосфорилирования.

2. Степень энергетического сопряжения в митохондриях печени, сниженная в результате криовоздействия, частично восстанавливается при определенных условиях инкубации органелл, а эффективность репаративного процесса повышается с возрастом крыс.
3. Обосновано предположение о том, что одним из механизмов криоразобщения окислительного фосфорилирования является активация неселективной белковой поры внутренней мембраны митохондрий.

Теоретическая и практическая значимость. Анализ функционального состояния митохондрий печени 1-, 3-, 12- и 24-месячных крыс в норме и под действием низких температур позволил выявить возрастные особенности криочувствительности и репаративной способности органелл.

Выявленный характер повреждений митохондрий при замораживании и оттаивании позволил определить оптимальный возрастной период, в течение которого митохондрии печени крыс обладают наибольшей криорезистентностью, а также оценить условия, обеспечивающие максимальную степень восстановления их энергоаккумулирующей функции после криоконсервации. Полученные результаты представляют практическую ценность для разработки методов низкотемпературной консервации биологического материала.

Материалы работы используются в лекционных курсах "Биоэнергетика" и "Структура и функция биомембран" на кафедре молекулярной и прикладной биофизики Харьковского госуниверситета.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на научных конференциях радиофизического факультета ХГУ (1987-1991), Всесоюзном симпозиуме "Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза (27-29 октября 1987, Харьков), 1 съезд геронтологов и гериатров УССР (4-6 октября 1988, Днепропетровск), 5 Всесоюзный съезд геронтологов и гериатров (22-25 ноября 1988, Тбилиси), Всесоюзном совещании (Пушино, май 1991), Международной конференции "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины" (10-12 февраля 1988, Харьков), 2 Международной конференции "Успехи современной криобиологии" (21-25 апреля 1992, Харьков).

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из

ведения, главы "Обзор литературы", главы "Материалы и методы", трех глав "Результаты и их обсуждение", заключения, выводов, списка литературы, включающего 230 наименований. Работа изложена на 126 стр., включает 25 рисунков и 10 таблиц.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали самцов крыс линии Вистар в возрасте 1, 3, 12 и 24 мес. Митохондрии печени выделяли методом дифференциального центрифугирования [Jonson et al. 1967]. Часть суспензии свежeweделенных митохондрий (0,5 мл) замораживали до  $-196^{\circ}\text{C}$ , погружая полиэтиленовые ампулы с образцами в жидкий азот. Оттаивание проводили либо на водяной бане при  $40^{\circ}\text{C}$  (быстрое), либо при комнатной температуре (медленное).

Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавт. в модификации Миллера [Miller, 1959].

Скорость дыхания и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени определяли полярографическим методом на первой и шестой минутах инкубации при  $30^{\circ}\text{C}$ . По кривым потребления кислорода рассчитывали скорость дыхания в метаболических состояниях 4 и 3 ( $V_4$  и  $V_3$ ) по Чансу [Chance, 1955], в разобщенном состоянии ( $V_{3p}$ ), дыхательный контроль ДК( $V_3/V_4$ ) и ДКр ( $V_{3p}/V_4$ ). Скорость окисления НАДН регистрировали также полярографически.

Интенсивность синей флуоресценции, как отражение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов, измеряли при 460 нм и возбуждении 330-360 нм [Лемешко, 1973].

Измерение  $\text{H}^+$ - АТФазной активности проводили потенциометрическим методом [Болдырев, 1977].

Проницаемость внутренней мембраны митохондрий для одновалентных ионов ( $\text{K}^+$ ) оценивали по кинетике набухания органелл в изотонических растворах нитрата калия, регистрируемой по изменению оптической плотности при 620 нм [по Brierly, 1970].

Статистическую обработку результатов опытов по методу Стьюдента-Фишера [Терентьев и соавт., 1977] проводили на ПЭВМ "Электроника-85".

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние замораживания-оттаивания на функциональное состояние митохондрий печени крыс разного возраста. Митохондрии характеризуются выраженной зависимостью функции окислительного фосфорилирования и других эндэргонических функций от структурного состояния мембран, возрастные особенности которого могут

быть выявлены по степени нарушения функций при воздействии физических и физико-химических факторов, в том числе при замораживании-оттаивании. В связи с этим, различия в структурном состоянии мембран, изменяющемся наиболее естественным образом в онтогенезе крыс, могут обуславливать и различную криочувствительность как мембранных структур клетки, так и клеток в целом. Исходя из вышесказанного, в настоящей работе исследовали криочувствительность митохондрий печени 1-, 3-, 12- и 24-месячных крыс.

Как следует из полученных данных, скорость окисления субстратов (глутамат с малатом, сукцинат) в состоянии 4 и 3 по Чансу и в присутствии разобшителя, а также величины ДК и ДКр при инкубации митохондрий печени крыс в полярографической ячейке при 30°С существенно не различались у крыс разного возраста. Замораживание-оттаивание (З-О) приводило к значительному снижению ДК (в 3,0-3,6 раза) и ДКр (в 2,9-3,6 раза), в основном за счет увеличения дыхания в состоянии 4 и некоторого ингибирования в состоянии 3 и в присутствии 2,4-динитрофенола.

Степень выраженности указанных изменений зависела от времени предварительной инкубации З-О митохондрий в полярографической ячейке и возраста животных. Так на первой минуте инкубации с глутаматом и малатом З-О митохондрий при 30°С V3 была достоверно ( $p < 0,01$ ) ниже по сравнению с нормой: на 18% в митохондриях печени 12- и 24-мес. крыс и на 23-26% в митохондриях 1- и 3-мес.крыс. Аналогичные изменения наблюдались при окислении сукцината. Максимальное снижение V3р по сравнению с нормой при окислении глутамата с малатом отмечено в митохондриях 1-мес. крыс - на 30%, а минимальное - на 16% в митохондриях 24-мес. крыс. Существенных отличий между значениями V3 и V3р не наблюдалось, что согласуется с имеющимися в литературе данными о том, что уменьшение скорости дыхания в состоянии 3 в большей мере обусловлено ингибированием активности дыхательной цепи, чем ингибированием активности адениннуклеотидтранслоказы или АТФ-синтетазы [Petrenko et al, 1986; Tsvetkov et al., 1987].

После замораживания-оттаивания митохондрий печени крыс величина V4 повышается в 2,5 -3,0 раза по сравнению с нормой при окислении глутамата с малатом и сукцинатом, соответственно, без выраженных возрастных различий. Вместе с тем, скорость окисления НАДН митохондриями молодых крыс после замораживания-

оттаивания превышала такую в митохондриях взрослых и старых животных более, чем вдвое. Сходные результаты получены как в среде с антимицином А и (или) цитохромом С, так и без указанных добавок и, в целом, свидетельствует об увеличении проницаемости, отражающей разную степень повреждения внутренней и наружной мембран митохондрий в зависимости от возраста животных.

При измерении  $H^+$ -АТФазной активности 3-О митохондрий в среде без разобшителя, как отражающей косвенно величину протонной проницаемости внутренней мембраны, было показано ее повышение в 2,4-2,8 раза по сравнению с нормой без достоверных возрастных различий. Добавление 2,4-динитрофенола в среду инкубации вызывало повышение скорости гидролиза АТФ в 6-8 раз, тогда как в норме - в 18-27 раз, в зависимости от возраста. Наименьшее значение ДНФ-стимулируемой  $H^+$ -АТФазной активности в норме и, особенно, после замораживания-оттаивания получено для митохондрий 1 мес. крыс. При этом абсолютная величина самой ДНФ-стимулируемой активности изменялась мало, что согласуется с [Bruni et al., 1978; Tsvetkov et al, 1987]. Исходя из имеющихся данных о том, что фактор F1  $H^+$ -АТФазного комплекса малочувствителен к действию замораживания как в свободном, так и в связанном с мембраной состоянии [Рэкер, 1979; Мишнева, 1983], полученные нами данные о значительном (в 4,5-6,0 раз) увеличении олигомицинрезистентной  $H^+$ -АТФазной активности 3-О митохондрий на первой минуте инкубации, могут указывать на диссоциацию факторов F1 и F0 под действием низких температур, что ранее обсуждалось в работах [Volger, 1978; Лемешко, 1984] в качестве наиболее существенной причины увеличения протонной проницаемости внутренней мембраны после замораживания-оттаивания.

Для митохондрий показано, что ионная проницаемость внутренней мембраны зависит не только от интегральных свойств липидного компонента мембраны и состояния F0-F1 комплекса, но также находится под влиянием метаболических процессов, в частности, уровня восстановленности пиридиннуклеотидов [Löischer et al., 1976; Rizzuto et al., 1987], который, в свою очередь, зависит от степени энергизации внутренней мембраны.

В норме максимальная интенсивность синей флуоресценции, как отражение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов, на-

блюдалась в митохондриях печени 12-мес. крыс, достоверно ( $p < 0,01$ ) отличаясь от 1- и 24-мес. После замораживания-оттаивания митохондрий, в начальный момент времени инкубации при 30 °С максимальное снижение интенсивности флуоресценции - на 65% по сравнению с нормой - наблюдали в митохондриях 1-мес. крыс, а минимальное - на 30% в митохондриях 24-мес.; при этом наиболее высокий уровень флуоресценции сохранялся в митохондриях 12-мес. животных, достоверно отличаясь от такового в митохондриях 1- и 24-мес. Отмеченное изменение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов в митохондриях крыс может иметь непосредственное отношение к регуляции перекисного окисления липидов [Лемешко и др., 1982], интенсивность которого может изменяться после криовоздействия [Бондаренко, Белоус 1982]. При дальнейшей инкубации, уже через одну минуту, наблюдали существенное повышение интенсивности флуоресценции в 3-0 митохондриях всех возрастных групп животных. Причем, если в митохондриях 1- и 3-мес. крыс этот уровень достигал 60-80% от контроля, то в митохондриях 12- и 24-мес. крыс он практически приближался к норме (100% и 90%, соответственно).

Полученные данные свидетельствуют о частичном восстановлении функциональной активности изолированных митохондрий в процессе инкубации при 30 °С после быстрого замораживания до -196 °С и быстрого отогрева, принципиальная возможность которого была показана ранее [Racker et al., 1972; Лемешко, 1973; Петренко, 1984].

Частичное восстановление структурно-функциональной целостности митохондрий печени крыс после замораживания-оттаивания.

Изучение возрастных особенностей репарации митохондрий после замораживания-оттаивания может служить одним из путей в исследовании механизмов криоповреждения мембран.

Изменение структурного состояния мембран в онтогенезе показано в ряде работ [Grina, Barber, 1972; Tauchi, Sato, 1980; Nohl, Kramer, 1980; Kanamura et al., 1984; Wynne, James, 1990 и др.].

Криовоздействие, вызывая нарушение барьерных свойств внутренней мембраны и метаболического равновесия, приводит к существенному разобщению процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс. Значительные изменения такого рода наблюдались в том случае, когда измерение дыхательного контро-

ля проводилось сразу же после внесения 3-О митохондрий в полярографическую ячейку. Вместе с тем, предварительная, шестиминутная инкубация этих митохондрий в ячейке в среде с субстратом приводила к достоверному увеличению дыхательного контроля по сравнению с первой минутой инкубации на 24% - в митохондриях печени 12-мес. и на 35% - в митохондриях печени 24-мес. крыс, при незначительном повышении этого параметра в митохондриях печени 1 и 3 мес. крыс. Наблюдаемое повышение степени сопряжения окислительного фосфорилирования после 6 минут инкубации обусловлено, в основном, снижением скорости окисления глутамата и малата митохондриями в состоянии 4, в разной степени выраженной для разных возрастных групп (таблица 1). Вместе с тем, V3 была заметно снижена после замораживания-оттаивания как на первой минуте инкубации, так и еще в большей степени после 6 минут инкубации. Так в митохондриях 1- и 3-месячных крыс она была на 50% меньше, а в митохондриях 12- и 24-месячных - на 35% - по сравнению с контролем. Величина V3p после замораживания-оттаивания и последующей шестиминутной инкубации была также достоверно выше в митохондриях печени взрослых и старых крыс по сравнению с 1- и 3- мес., в отличие от значений V3p в норме.

Вместе с тем подобная шестиминутная инкубация митохондрий в норме вызывала снижение дыхательного контроля, наиболее выраженное для 24 мес. крыс, вследствие почти 2-х кратного увеличения V4 и достоверного снижения как V3 так и V3p.

Инкубация в течении 6 мин замороженно-оттаянных митохондрий при 30°С приводила, как и в случае V4, к статистически значимому замедлению скорости гидролиза АТФ в среде без ДНФ, что свидетельствует об уменьшении протонной утечки через внутреннюю мембрану митохондрий. В то же время ДНФ-стимулируемая H<sup>+</sup>-АТФазная активность практически не изменялась по сравнению с одномоментной инкубацией, за исключением 1-мес. животных, для которых наблюдалась тенденция снижения активности по сравнению с другими возрастными группами. Олигомицинрезистентная H<sup>+</sup>-АТФазная активность после шестиминутной инкубации снижалась по сравнению с первой минутой в 2,8 раза в митохондриях 1- и 3-мес. крыс и в 3,0-3,3 раза в митохондриях 12- и 24-мес. крыс, оставаясь, тем не менее, достоверно выше нормы. Учитывая, что к шестой минуте инкубации снижается как скорость дыхания в состоянии 4, так и величина АТФазной активности 3-О митохондрий, можно предпола-

Таблица 1

Влияние замораживания-оттаивания (З-О) на дыхательную активность (натом О/мин мг белка) митохондрий печени крыс (n=6-9).

Измеряе-: Вариант :		Возраст животных мес.			
мый па- : опыта :		-----			
раметр :		1	3	12	24
V4	Норма, 1 мин***	30,6+1,0	28,1+1,0	28,8+1,0	30,3+1,8
	норма 6 мин	45,3+3,7	52,5+3,3	44,6+2,0	59,5+3,5
	З-О, 1 мин	71,4+4,0**	70,4+3,0**	68,8+6,1**	76,3+6,4**
	З-О, 6 мин	42,2+1,3	39,9+2,5	35,5+2,1*	40,2+2,8
-----					
V3	Норма, 1 мин	213+8	207+7	210+5	206+7
	Норма, 6 мин	138+7	118+11	146+7	95+12
	З-О, 1 мин	154+3**	155+5**	174+8**	162+12**
	З-О, 6 мин	104+6	105+8	128+7	125+12
-----					
V3p	Норма, 1 мин	212+8	209+7	216+4	213+8
	Норма, 6 мин	139+7	138+11	172+4	109+18
	З-О, 1 мин	154+4**	156+7**	176+8 **	173+9**
	З-О, 6 мин	115+6	121+8	147+10*	139+12*

Примечание:\*-p<0,05 по сравнению с 1 мес.

\*\*p<0,05 по сравнению с нормой.

\*\*\* - время инкубации митохондрий в полярографической ячейке.

гать, что диссоциация факторов F1 и F0 является в значительной мере обратимой.

Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о высокой надежности  $H^+$ -АТФазного комплекса митохондрий в онтогенезе, во-вторых - о его устойчивости по отношению к криовоздействию [ Мишнева, 1983] и, в-третьих - о репарированности F1-F0 комплекса после замораживания-оттаивания.

Судя по результатам шестиминутной инкубации митохондрий после замораживания-оттаивания, криорезистентность и степень выраженной репарации характерна для митохондрий печени крыс среднего возраста и может служить одним из критериев относительно большой надежности системы окислительного фосфорилирования в этот возрастной период при замораживании-оттаивании. Возможно, это связано как с возрастными изменениями макроструктурных характеристик органелл и их метаболизма, так и с особенностями липидного состава мембран митохондрий, изменяющегося в онтогенезе [Wynne, James, 1990; Kim et al., 1989] и, прежде всего, с возрастным увеличением отношения холестерина/фосфолипиды.

С целью выяснения оптимальных условий репарации митохондрий при их инкубации после замораживания-оттаивания в данной работе изменяли состав среды. При включении в среду инкубации 1 мМ ЭГТА наблюдали замедление V4 на первой минуте инкубации после криовоздействия, причем статистически значимое только для митохондрий 1-месячных крыс. На шестой минуте инкубации в присутствии комплексона  $Ca^{2+}$  отмечено замедление V4 как в митохондриях 1-, так и 24-мес. крыс и снижение до нормы - в митохондриях 3- и 12-мес. животных. ЭГТА почти не влиял на изменение V3 и V3p, за исключением замедления их снижения в митохондриях 24-мес. крыс по сравнению со средой без ЭГТА.

Замораживание-оттаивание приводит к частичной потере фосфолипидов митохондриями, в связи с их ферментативным гидролизом и перекисным окислением [Белоус и др. 1978; Souza et al. 1989]. Однако вклад реакций свободнорадикальной модификации фосфолипидов в нарушение функционального состояния митохондрий печени крыс разного возраста после действия низких температур остается невыясненным. Добавление антиоксиданта ионола в среду инкубации достоверно снижает V4 уже на 1 мин инкубации 3-О-митохондрий во всех возрастных группах по сравнению с инкубацией без антиокси-

данта. Это снижение было максимально выражено (на 60%) в митохондриях печени 1-мес. и минимально - (на 35%) в митохондриях печени 24-мес. крыс. При дальнейшей шестиминутной инкубации наблюдается замедление V4, более существенное, чем при инкубации без ионола. Вместе с тем, добавление ионола приводило к некоторому снижению V3 и V3p по сравнению с инкубацией без антиоксиданта. Интенсивность флуоресценции пиридиннуклеотидов в начальный момент времени инкубации была выше на 10-25% по сравнению с инкубацией без антиоксиданта, в зависимости от возраста животных.

Наличие в среде олигомицина, ингибирующего протонную проводимость через фактор F0, а также АДФ и отсутствие неорганического фосфата, как условий, препятствующих  $Ca^{2+}$ -зависимому разобщению, приводило к полному предотвращению, индуцируемого замораживанием-оттаиванием повышения V4 как на первой, так и на шестой минутах инкубации, а также предотвращению активации V4 в норме в процессе длительной (6 мин) инкубации митохондрий. Влияние указанных условий инкубации на интенсивность флуоресценции было наиболее значительным на ранней стадии инкубации криповрежденных митохондрий. Важно отметить при этом, что интенсивность флуоресценции отражает более тонкие эффекты замораживания-оттаивания, поскольку при полном предотвращении прироста V4, уровень флуоресценции у молодых крыс оставался сниженным даже на 6-ой минуте инкубации.

Согласно полученным результатам, митохондриям печени молодых крыс свойственна более высокая чувствительность к замораживанию-оттаиванию и менее выраженная репарация внутренней мембраны. Существенные возрастные различия проявляются в отношении ДК и ДКр, интенсивности флуоресценции пиридиннуклеотидов, а также эффективности репарации в различных условиях инкубации после криовоздействия. В целом, относительно более высокая криорезистентность митохондрий печени 12-месячных крыс, вместе с данными о сохранении ими высокого дыхательного контроля в широком диапазоне осмотических давлений среды [Удовикова, Лемешко, 1991], может служить косвенным критерием более высокой структурно-функциональной надежности системы окислительного фосфорилирования в среднем возрасте.

Исследование возможной активации замораживанием-оттаиванием неспецифической  $Ca^{2+}$ -зависимой белковой поры внутренней

мембраны. Механизм увеличения проницаемости мембран при понижении температуры связывают с фазовым разделением липидов [Клеemann et al., 1976] и с образованием трансмембранных дефектов в липидном бислое [Lee et al., 1980; Белоус и др., 1987]. Вместе с тем, согласно гипотезе Лемешко В.В. и соавт., [Лемешко и др. 1992] в случае сопрягающей мембраны митохондрий увеличение проницаемости при действии низких температур может быть в значительной степени обусловлено активацией так называемой неспецифической белковой поры [Crompton et al., 1988, Davidson et al., 1987]. С целью исследования ее роли в механизме увеличения  $K^+$ -проницаемости внутренней мембраны митохондрий после замораживания-оттаивания изучали кинетику набухания органелл в изотоническом растворе нитрата калия. Замораживание-оттаивание вызывает увеличение скорости набухания митохондрий как в случае быстрого, так и в случае медленного оттаивания по сравнению с интактными митохондриями. Добавление АДФ, также как и ЭГТА или  $Mg^{2+}$  к суспензии митохондрий при замораживании-оттаивании и (или) в среду инкубации приводило к существенному уменьшению скорости набухания.

В митохондриях известно несколько криолабильных участков, в том числе цитохромоксидаза дыхательной цепи и фактор F1, F0. Сопоставляя полученные нами результаты с имеющимися в литературе данными о гормонально-метаболической регуляции ионной проницаемости внутренней мембраны [Davidson et al., 1986], можно предположить, что к числу наиболее криочувствительных участков в структуре митохондрий можно отнести также аденин-нуклеотидтрансферазу, из-за ее свойства переходить в состояние  $K^+$ -канала, или даже неспецифической поры. В соответствии с этим криоактивация такой поры (канала) замораживанием-оттаиванием может быть наряду с другими факторами, причиной криоразобщения окислительного фосфорилирования [Лемешко и др., 1992].

Согласно таблице 1, после замораживания-оттаивания митохондрий наблюдалось значительное увеличение дыхания в состоянии 4 на первой минуте инкубации в полярографической ячейке. Инкубация в течение 6 мин приводила к замедлению дыхания в этом состоянии. Если предположить, что высокая скорость дыхания в состоянии 4 на первой минуте инкубации обусловлена криоактивацией неспецифической белковой поры, то исключение неорганического фосфата, включение олигомицина и АДФ должно способство-

вать закрыванию поры. Действительно, такой состав инкубационной среды обеспечивает снижение скорости дыхания в состоянии 4 до уровня незамороженного контроля и значительно увеличивает коэффициент стимуляции дыхания 2,4-динитрофенолом.

Хорошо известно, что окисление НАДН и гидролиз НАД<sup>+</sup> в матриксе является одним из необходимых условий активации неспецифической белковой поры внутренней мембраны митохондрий [Crompton et al., 1986]. С другой стороны, замораживание-оттаивание сопровождается резким снижением уровня восстановленности пиридиннуклеотидов, причем, интенсивность флуоресценции значительно повышается в процессе инкубации органелл при 30<sup>o</sup>С. Изменения состава среды (исключение фосфата неорганического, добавление АДФ и олигомицина) также приводили к повышению уровня флуоресценции даже незамороженных митохондрий, хотя после замораживания-оттаивания эффект от изменения состава среды был значительно выше. При этом наблюдались возрастные особенности, которые состояли в том, что для митохондрий взрослых и старых крыс интенсивность флуоресценции в среде без органического фосфата с добавлением олигомицина и АДФ практически не отличалась от незамороженного контроля. Необходимо отметить, что указанные уровни восстановленности пиридиннуклеотидов достигались уже к концу первой минуты инкубации органелл в ячейке, когда существенно уменьшается и К<sup>+</sup> проницаемость внутренней мембраны митохондрий. Условия, которые обеспечивают повышение уровня восстановленности митохондриальных пиридиннуклеотидов, окисленных в результате замораживания-оттаивания, предотвращают возможность развития процесса дальнейшего открывания неспецифической поры внутренней мембраны, по-видимому, смещая равновесие этого процесса в сторону закрывания поры. Таким образом, повышение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов после замораживания-оттаивания может служить как отражением, так и причиной репарации митохондрий по механизму обратимого закрывания криоактивированной неспецифической белковой поры внутренней мембраны митохондрий.

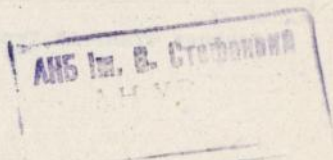
Совершенно очевидно, что при низкотемпературном воздействии имеет место определенная последовательность событий, начальным звеном которых является нарушение термодинамической стабильности мембран, а завершающим - биохимическая модификация их структур.

## ВЫВОДЫ

1. Установлен характер изменений функционального состояния митохондрий печени 1-, 3-, 12- и 24-месячных крысах линии Вистар после быстрого замораживания в жидком азоте и последующего быстрого оттаивания, проявляющийся в разной степени снижения дыхательного контроля, увеличения скорости окисления субстратов (малат+глутамат, сукцинат) в состоянии 4 и гидролиза АТФ, а также ингибирования дыхания в состоянии 3 и в присутствии разобшителя.
2. Выраженные возрастные особенности изменений структурно-функционального состояния митохондрий печени после быстрого замораживания-быстрого оттаивания проявляются :
  - в более высокой скорости окисления экзогенного НАДН митохондриями молодых крыс по сравнению с 12- и 24-месячными (как в присутствии, так и в отсутствии антимицина А и экзогенного цитохрома С);
  - в сохранении высокого уровня восстановленности пиридиннуклеотидов в митохондриях печени 12-мес. крыс, по сравнению с другими возрастными группами животных.
3. Показано, что уровень восстановленности пиридиннуклеотидов, изменяющийся с возрастом животных, играет значительную роль в репарации митохондрий при 30°C в присутствии субстратов (глутамат+малат) после быстрого замораживания-быстрого оттаивания.
4. Установлено, что более высокая криорезистентность и более выраженная репарация внутренней мембраны после замораживания-оттаивания свойственна митохондриям печени 12- месячных крыс, тогда как наиболее высокую криочувствительность проявляют митохондрии печени 1 месячных крыс.
6. Показано, что одним из возможных механизмов увеличения проницаемости внутренней мембраны митохондрий при действии низких температур является криоактивация  $Ca^{2+}$ - и  $\Delta\psi$ -зависимой белковой поры внутренней мембраны, а условия инкубации, способствующие закрыванию поры ( наличие ЭГТА, олигомицина, АДФ и исключение неорганического фосфата) определяют эффективность репарации.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Миронова Н.Г., Маланда П., Бондаренко М.А. Влияние замораживания-оттаивания на митохондрии печени крыс разного возраста/ Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза. Всес.симп.: Тез.докл.- 1987.- С.121-122.
2. Лемешко В.В., Миронова Н.Г., Маланда П., Белостоцкая Л.И. Криповреждения митохондриальной системы окислительного фосфорилирования как критерий оценки структурной перестройки мембран в онтогенезе// Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Международ.конференц.:Тез.докл.,Харьков.- 1988.-С.21.
3. Миронова Н.Г., Лемешко В.В. Возрастные особенности репарации митохондрий печени крыс после криовоздействия//1 съезд геронтологов и гериатров УССР, Днепрпетровск:Тез.докл.-1988.-С.163.
4. Белостоцкая Л.И., Козлова Е.В., Миронова Н.Г., Шевченко А.А., Новикова О.А., Листопад А.П., Лемешко В.В. Структурно-функциональные изменения свойств митохондрий печени крыс при старении// 5 Всес. съезд геронтологов и гериатров, Тбилиси:Тез.докл.-1988.-Т.1.-С.66.
5. Лемешко В.В., Белостоцкая Л.И., Миронова Н.Г. и др. Изучение состояния мембранной энергетики при развитии и старении организма / Отчет по НИР.- 1990. N гос.регистрации 0187.0009268, инвентарный номер ВНИЦентра 02.9.100031710.-С.77-103.
6. Миронова Н.Г. Н<sup>+</sup>-АТФазная активность митохондрий печени крыс разного возраста после замораживания-оттаивания // Сборник научных работ аспирантов ХГУ (естественные и физико-математические науки). - Из-во "Основа". Харьков.-1992.-С.66-72.
7. Лемешко В.В., Миронова Н.Г., Белостоцкая Л.И., Удовикова Е.А. Механизмы криповреждения, репарации и криопротекции митохондрий печени крыс//Успехи современной криобиологии.2 Межд.конф. Харьков:Тез.докл.-1992.-С.94-95.



Ответственный за выпуск В.И.Грищенко

---

Подп.к печ. 5.01.93 Формат 60x84 1/16. Бумага тип. Печать офсетная.  
Усл.печ.л. 1,0 Уч.-изд.л. 1,0 Тираж 100 экз. Зак №182.Бесплатно

---

Ротапринт ФТИНТ АН Украины, 310164, Харьков, просп. Ленина, 47.



AB 26.389