

Российская Академия Наук
Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова

На правах рукописи

ЕМЕЛЬЯНОВА
Лариса Вадимовна

ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЕ И БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ
МИНОГИ (*Lampetra fluviatilis*) И ЛЯГУШКИ (*Rana temporaria*)
В ПЕРИОДЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ДЕПРЕССИИ И АКТИВНОСТИ

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2005

Работа выполнена в лаборатории сравнительной биохимии неорганических ионов (заведующий – д.б.н. А.А. Никифоров) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Научный руководитель: д.б.н. М.В. Савина

Официальные оппоненты: член-корр. РАН, д.м.н., проф. В.О. Самойлов
к.б.н., ст.н.с. А.О. Шапов

Ведущее учреждение: Институт цитологии РАН

Защита состоится 8 ноября 2005 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 при Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, по адресу: 194223 Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, д. 44, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Автореферат разослан 4 октября 2005г.

Ученый секретарь диссертационного совета:



д.б.н., проф. М.Н. Маслова

2006-4
16444

2185856

3

ВВЕДЕНИЕ

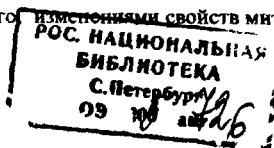
Актуальность проблемы

Метаболическая депрессия является неотъемлемой частью жизненных циклов многих животных и встречается у большинства видов беспозвоночных и всех классов позвоночных. Это явление характеризуется подавлением базальной метаболической скорости на 50-100% и длится до тех пор, пока организм в состоянии противостоять стрессам окружающей среды. Современные методы молекулярной клеточной биологии широко используются для выяснения механизмов регуляции метаболической депрессии. Но до настоящего времени ни молекулярные механизмы, ни процессы, связанные с контролем гипометаболизма, до конца не изучены, и фундаментальное явление метаболической депрессии остается как с биохимической, так и с физиологической точек зрения слабо освещенным. Тем не менее, за последнее десятилетие в исследовании этого феномена сделан колоссальный прогресс, который будет полезен для дальнейшего осмысления поставленной проблемы.

Анализ существующих фактов позволяет заключить, что центром регуляции интенсивности биохимических процессов, прежде всего, следует считать митохондрии. Долгое время полагали, что основной функцией митохондрий является синтез АТФ. Поэтому наибольшее внимание было уделено регуляции сопряженного с синтезом АТФ дыхания митохондрий [Bohnenstuck et al., 1982; Erecinska and Wilson, 1982; Balaban, 1990]. Меньшее значение придавали процессу, при котором потребление кислорода не сопряжено с синтезом АТФ. Этот процесс связан с утечкой протонов через специфические белки (АТФ/АДФ - антипортер, аспартат/глутаматный переносчик, белки-разобщители семейства UCP) внутренней мембраны митохондрий [Skulachev, 1998a; Stuart et al., 2001]. Причем скорость протонной утечки в митохондриях эктотермных позвоночных обнаруживает сезонную динамику [St-Pierre et al., 2000a; Bishop et al., 2002; Boutilier and St-Pierre, 2002]. Пожалуй, самым поразительным физиологическим свойством протонной утечки является участие в защите от повреждающего действия активных форм кислорода, образующихся в митохондриях [Skulachev, 1998a; Kowaltowski et al., 2001].

Кроме того, в конце 90-х годов стало ясно, что митохондрии играют ключевую роль в развитии и регуляции апоптоза и некроза в клетке [Skulachev, 1998b; Skulachev, 1998b; 2000, 2002, Kim et al., 2003a; Kim et al., 2003b], открывая на мембранах неспецифическую пору (mitochondrial permeability transition pore), проницаемую для широкого спектра органических и неорганических веществ. Однако, выбор пути гибели клетки определяется ее энергосостоянием, то есть, эффективностью работы системы окислительного фосфорилирования и соотношением АТФ/АДФ.

В последнее время появилось множество доказательств, что любая патология, связанная с энергетической депрессией, сопровождается, прежде всего, изменением свойств митохондрий.



Низкие концентрации адениновых нуклеотидов, повышенная проницаемость внутренней мембраны, супрессия активности электрон-транспортной цепи и системы окислительного фосфорилирования способствуют развитию многих заболеваний у высших животных, в том числе человека. Но парадоксален и примечателен тот факт, что для низших позвоночных животных эти изменения оказываются вполне приемлемыми и даже полезными в определенные фазы их жизненного цикла. Это подтверждает предположение Л.А. Орбели о том, что в экстремальных условиях и при патологии высшие позвоночные, в том числе и человек, используют для выживания эволюционно более древние механизмы, изучению которых и посвящена данная работа.

Объектами наших исследований были минога речная (*Lampetra fluviatilis*) и лягушка травяная (*Rana temporaria*). Минога – представитель класса Круглоротых, наиболее древнее из ныне живущих позвоночных животных, обладает своеобразным жизненным циклом. После активного морского периода, в течение которого миноги питаются, паразитируя на разнообразных костистых рыбах, начинается анадромная преднерестовая миграция, которая заканчивается выметом половых продуктов и смертью. Миноги моноцикличны. Мигранты, пришедшие в реку осенью, проводят в них всю зиму, не питаясь. Известно, что в гепатоцитах в этот период наблюдается обратимая метаболическая супрессия [Savina and Gamper, 1998]. Однако, сведения о молекулярных механизмах этого явления на уровне митохондрий не были изучены.

В отличие от миног представители класса Амфибий размножаются многократно. Метаболическая депрессия у лягушек наблюдается в период гибернации и связана, главным образом, с гипотермией и гипоксией.

Ряд энергетических характеристик митохондрий печени пойкилотермных позвоночных мы сопоставили с аналогичными характеристиками митохондрий печени гомойотермного позвоночного – мыши (линия ASN).

Для изучения особенностей энергообеспечения митохондрий указанных пойкилотермных животных в работе были проанализированы сезонные изменения в содержании основных энергетических субстратов в плазме крови.

Цели и задачи

Целью работы было

Изучение особенностей энергетического метаболизма пойкилотермных позвоночных на примере миноги речной и лягушки травяной в периоды метаболической депрессии и активности.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать в плазме крови миног и лягушек содержание основных метаболитических субстратов: глюкозы, липидов и свободных аминокислот.

2. Оценить биоэнергетические параметры митохондрий печени: скорости дыхания и фосфорилирования, содержание адениновых нуклеотидов в митохондриях и в самой ткани.

4. Исследовать участие белков-переносчиков анионов внутренней митохондриальной мембраны (АТФ/АДФ - и аспартат/глутаматного антипортёров) в процессе разобщения дыхания и фосфорилирования.

6 Исследовать проницаемость мембран митохондрий в солевой и в неионизированной средах инкубации.

7. Изучить действие индукторов (Ca^{2+} , Р, лаурат) и ингибиторов поры (CsA [циклоспорин А], ЭГТА [этиленгликольтетраацетат], Mg^{2+} , АДФ, БСА [бычий сывороточный альбумин], гепарин) на проницаемость мембран митохондрий.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В период метаболитической депрессии содержание глюкозы и липидов в плазме крови миног и лягушек существенно снижается; количество свободных аминокислот в плазме миног увеличивается, а в плазме лягушек – уменьшается.

2. Биоэнергетические параметры митохондрий печени миног и лягушек обнаруживают сезонную изменчивость. Скорости дыхания в различных метаболитических состояниях супрессированы в период метаболитической депрессии и восстанавливаются при выходе из этого состояния.

3. Содержание АТФ в митохондриях и в ткани печени миног и лягушек снижается в период метаболитической депрессии и увеличивается в состоянии метаболитической активности.

4. В митохондриях пойкилотермных животных утечка протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану обусловлена участием АТФ/АДФ - и аспартат/глутаматного антипортёров.

5. Изолированные митохондрии печени миног высокопроницаемы для ионов в солевых средах в период метаболитической депрессии вследствие открытия неселективной поры, чувствительной к действию ингибиторов: CsA, ЭГТА, Mg^{2+} , АДФ, БСА, гепарин.

6. В неионизированной изоосмотической среде инкубации индукция поры в митохондриях печени возможна в присутствии Ca^{2+} , Р, и лаурата. Действие лаурата, как индуктора, зависит от энергосостояния митохондрий.

Научная новизна

1. Проведен сезонный анализ содержания в плазме крови миног и лягушек глюкозы, липидов и свободных аминокислот.

2. Продemonстрирована сезонная динамика биоэнергетических параметров митохондрий печени у исследованных видов животных.

3. Исследовано содержание адениновых нуклеотидов в печени лягушек в периоды метаболической депрессии и активности.

4. Установлено участие АТФ/АДФ - антипортера и аспартат/глутаматного переносчика в разобщении окислительного фосфорилирования в митохондриях печени миног и лягушек.

5. Исследована мембранная проницаемость митохондрий печени миног и лягушек в периоды метаболической депрессии и активности.

Таким образом, изучены некоторые новые молекулярные механизмы, лежащие в основе метаболической депрессии гепатоцитов пойкилотермных позвоночных.

Теоретическая и практическая значимость

Работа имеет, прежде всего, фундаментальное значение в области эволюционной биохимии и биоэнергетики. Полученные данные дополняют сведения о функционировании и регуляции энергетического метаболизма у эктотермных животных. Кроме этого установлена важная роль митохондрий в развитии обратимого феномена метаболической депрессии. Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшего изучения молекулярных механизмов регуляции энергетики митохондрий, а также в прикладных целях. Обнаруженная нами на пойкилотермных животных митохондриальная дисфункция, проявляющаяся в снижении синтеза АТФ, в снижении эффективности системы субстратного окисления, супрессии электрон-транспортной цепи, индукции неспецифической проницаемости мембран митохондрий, является патологичным для млекопитающих. Поэтому исследование молекулярных механизмов метаболической депрессии у пойкилотермных позвоночных животных в дальнейшем может помочь в разработке новых терапевтических подходов в лечении митохондриальных заболеваний.

Апробация работы

Результаты исследования докладывались на Третьем Съезде Биохимического Общества в г. Санкт-Петербург 2002. Всероссийском симпозиуме «Механизмы терморегуляции и биоэнергетики: взаимодействие функциональных систем» в г. Иваново 2002, Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» в г. Пушкино 2003; Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хроматографические приборы» в г. Москва 2004; IX зимней школе на тему «Биоинформатика: от молекулярных механизмов к функциональным системам» на зоологической станции Тварминне, Финляндия, 2005.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 статей, одна из которых в зарубежном журнале и 8 тезисов, четыре из которых опубликованы в иностранных изданиях.

Структура диссертации

Диссертация состоит из глав: Введение, Обзор литературы, Материал и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы, Список литературы, который включает 300 источников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

В работе использовались минога речная, лягушка травяная и белая беспородная мыш. Миног вылавливали в октябре – ноябре в дельте Невы во время преднерестовой миграции из Балтийского моря в реку и содержали в ваннах с холодной (3-4°C) хорошо аэрируемой водой. Лягушек вылавливали в неурбанизированных зонах Ленинградской области и содержали без кормления в террариумах при температуре 3-4 °C, мышей содержали в виварии при регулярном кормлении и при комнатной температуре.

Измерение уровня глюкозы в плазме крови

Образцы крови животных брали из сердца (лягушки) и брюшной вены (минога). Кровь центрифугировали в гепаринизированных микропробирках в течение 5 мин при 6000 об/мин при температуре 3-4 °C.

Метод основан на взаимодействии глюкозы плазмы крови с орто-толуидином с образованием окрашенного в зеленый цвет продукта, определяемого фотометрически при длине волны 610 нм.

Исследование липидов плазмы крови

Липиды плазмы крови экстрагировали по методу Фолча [Folch et al, 1957]. Для выделения суммарных фосфолипидов, триацилглицеридов и свободных жирных кислот проводили одномерную тонкослойную хроматографию в системе гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота [Чеботарева, 1979]. Для достижения оптимального разделения липидов на пластинках определяли содержание липидного фосфора в экстракте по методу Лоури [Lowry et al., 1974]. Идентификацию пятен на пластинках проводили по свидетелям и цветным реакциям. Относительное содержание отдельных классов липидов определяли по профилю интегральной интенсивности изображения пятен с помощью программы анализа изображения Matrox Inspector. Абсолютные концентрации липидов (мг/мл плазмы) рассчитывали, исходя из количества нанесенного на пластинку фосфора и относительному содержанию фосфолипидов и других липидов в липидном экстракте. Для определения содержания жирных кислот в разных классах липидов снятые с пластинок пятна суммарных триглицеридов и фосфолипидов подвергали щелочному метилированию, а свободных жирных кислот – кислоту метилированию. Анализ метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот проводили на газо-жидкостном хроматографе Pye 104 (модель 24) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение вели на колонке (1.5м x 4 мм), покрытой хромосорбом W

с размером частиц 80-100 мэш (Perkin Eimer, США) при температуре 192 °С. В качестве жидкой фазы использовали 3% диэтиленгликольсукцинат. Газом-носителем служил гелий со скоростью потока 50мл/мин. Идентификацию жирных кислот проводили по относительному времени удерживания известных стандартов жирных кислот. Количество отдельной жирной кислоты определяли по площади пика, вычисляемой как произведение высоты пика на его ширину при полувысоте; содержание выражали в процентах от суммы.

Определение свободных аминокислот в плазме крови

Высушенный депротеинизированный образец плазмы дансилировали дансилхлоридом в ацетонитриле, 40 мин выдерживали в темноте, охлаждали и высушивали под вакуумом [Беленький и др., 1982]. Пробу помещали в морозильную камеру и хранили в темноте при -25 °С до анализа. Перед анализом к сухому остатку добавляли 0.1 N HCl, перемешивали, центрифугировали и вводили пробу в колонку. Хроматографическое разделение дансиламинокислот проводили на жидкостном хроматографе ХЖ-1311 с применением колонки размером 300 × 0.5 мм, упакованной сорбентом Nucleosil 5 C₁₈, в режиме линейно-ступенчатого градиента ацетонитрила в 0.01 М формиатном буфере (pH 3.53) при скорости элюирования 5 мл/мин. Детектирование флуориметрическое при длине волны возбуждения 254 нм и области флуоресценции 500- 700 нм. По методу абсолютной калибровки были построены калибровочные зависимости для каждой аминокислоты.

Выявление гликогена и липидов в печени

Для выявления липидных включений фиксация ткани проводилась по методу Идельмана [Idelman, 1965] в модификации для световой микроскопии. Кусочки печени толщиной 2-3 мм в течение 30 мин фиксировали в 4% глутаральдегиде, приготовленном на буфере Миллонига [Millonig, 1961]. Для проводки использовали спирты с возрастающей крепостью. Препараты заливали смесью эпона. Срезы окрашивали метиленовой синью.

Для фиксации гликогена использовали 2.5% глутаральдегид в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2-7.4). Обезживание кусочков печени проводили спиртами постепенно нарастающей крепости и абсолютным ацетоном. Полимеризацию проводили эпоном. Готовые срезы окрашивали раствором красителя аурамин-SO₂ [Кудрявцева и др. 1970] или обычным реактивом Шиффа.

Выделение митохондрий

Митохондрии из печени всех животных выделяли методом дифференциального центрифугирования при температуре не выше 2°С с применением совкаина и гепарина (в случае миног и лягушек) в средах выделения для ингибирования фосфолипазы A₂ [Savina et al., 1975]. Концентрацию белка митохондрий определяли методом Лоури [Lowry et al., 1951].

Измерение скоростей дыхания митохондрий

Регистрацию скорости дыхания митохондрий проводили при 26°C на полярографе LP-7 с использованием платинового электрода типа Кларка. Концентрация белка митохондрий в полярографической ячейке составляла 1 мг/мл.

На митохондриях печени изучались разные метаболические состояния митохондрий: базальное дыхание (в присутствии субстратов), состояние 3 (субстрат и АДФ), состояние 4 (в присутствии субстратов и исчерпании экзогенной АДФ в среде инкубации), разобщенное дыхание в присутствии 2,4 – ДНФ (2,4-динитрофенол) и FCCP (карбонилицианид -*n*-трифторметоксифенилгидразон). Для определения участия АТФ/АДФ - и аспартат/г-тутаматного - антипортеров в разобщающем действии жирных кислот использовали ингибиторы этих переносчиков: карбоксиатрактитат (Катр) и глутамат (Глут) соответственно. Скорости дыхания, дыхательные контроли (состояние 3/состояние 4), АДФ/О, скорости фосфорилирования были рассчитаны из полярографических кривых. Концентрации добавляемой АДФ определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Значения ресопрягающих эффектов (ослабление разобщающего действия жирной кислоты) рассчитывали по формуле $(J_u - J_{ur})/(J_u - J_o)$, где J_o и J_u - скорости дыхания митохондрий соответственно до и после добавления лаурата, J_{ur} - скорость дыхания в присутствии Катр и лаурата или Глут и лаурата.

Исследование набухания митохондрий

Набухание митохондрий (0.5 мг белка/мл) исследовали в пластиковой кювете при комнатной температуре по изменению оптической плотности митохондриальной суспензии при длине волны 540 нм на спектрофотометре СФ-46.

Определение содержания адениновых нуклеотидов в митохондриях и кусочках печени

После декапитации печень животных немедленно замораживали в жидком азоте. Кусочки замороженной ткани растирали до порошкообразного состояния в охлажденной фарфоровой ступке с жидким азотом. Измельченную ткань экстрагировали ледяной 0.4 М HClO_4 (10 мл/мл ткани) и нейтрализовали 4.0 М K_2CO_3 (10 мл на 100 мл экстракта). Гомогенат центрифугировали, супернатант хранили при -80°C до анализа.

Митохондрии экстрагировали аналогичным образом непосредственно после выделения либо после 5-10 мин инкубации в присутствии субстратов.

Измерение уровня адениновых нуклеотидов в образцах проводили методом обращенно-фазной хроматографии с применением хроматографа марки «Кнауег» (Германия) и колонки, заполненной сорбентом «Kromasil 100A-C18» (150x4, 4 мкм) (Россия) при длине волны 260 нм. Для полного разделения АТФ, АДФ и АМФ применяли градиентную элюцию фосфатного буфера [Manfredi et al., 2002].

Обработка данных производилась с применением двустороннего критерия Стьюдента и регрессионного анализа для программ Microsoft Excel 7.0 и OriginPro 7.0 for Windows 2003. Расчет количественного состава нуклеотидов в биологических образцах проводился методом внешнего и внутреннего стандартов с помощью программы Мультихром 1.52.0.0 для Windows. Данные в таблицах представлены как среднее и ошибка среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Энергообеспечение миног и лягушек в периоды метаболической депрессии и активности

1.1 Содержание глюкозы в плазме крови и гликогена в печени

Концентрация глюкозы в плазме крови миног и лягушек в осенне-зимний период метаболической депрессии снижается в 3-4 раза достигая минимального уровня в апреле-мае, 1-2 мМ (рис. 1 А, Б). Гистологические исследования, проведенные нами, показали, что содержание гликогена в печени миног низкое независимо от сезона (41-125 мг%). У лягушек, как и у высших животных, основным депо гликогена является печень. В ноябре, перед зимовкой, в печени содержание гликогена составляет 8000 мг% и постепенно утилизируется в течение зимней спячки, достигая значения 2540 мг% в марте [Львова, 1978].

1.2 Содержание отдельных классов липидов и индивидуальных жирных кислот в плазме крови

В плазме миног уровень суммарных липидов в зимний период преднерестовой миграции высок (16.0 ± 3.2 мг/мл) и резко снижается весной, начиная с марта месяца (табл. 1). В плазме крови лягушек в начале гибернации уровень общих липидов составляет 4.8 ± 1.0 мг/мл (табл. 2). Во время гибернации их содержание постепенно снижается в 2.5 раза. Таким образом, содержание липидов в плазме крови амфибий значительно ниже в сравнение с миногами. В отличие от миног у лягушек подготовка к спячке сопровождается, главным образом, резервированием гликогена в печени, и в гораздо меньшей степени жира - в жировых тельцах. У миног печень преимущественно депонирует жир, о чем также свидетельствуют результаты проведенного нами гистологического анализа. Осенью в печени много липидных капель, весной их практически нет. В осенние месяцы анадромной миграции жир составляет 50% от сухого веса печени. В марте вес печени снижается на 40% вследствие истощения запасов липидов [Savina and Gamper, 1998].

Так же как и у млекопитающих, липиды плазмы крови миног и лягушек (табл. 1, 2) включают фосфолипиды, холестерин и его эфиры, свободные жирные кислоты и триглицериды. Исключение составляют воска, которых нет в плазме крови млекопитающих. В плазме миног они составляют довольно значительный процент (7.5-24.6% в зависимости от сезона) от общего содержания липидов. Плазма крови лягушек также содержит воска. В абсолютном значении

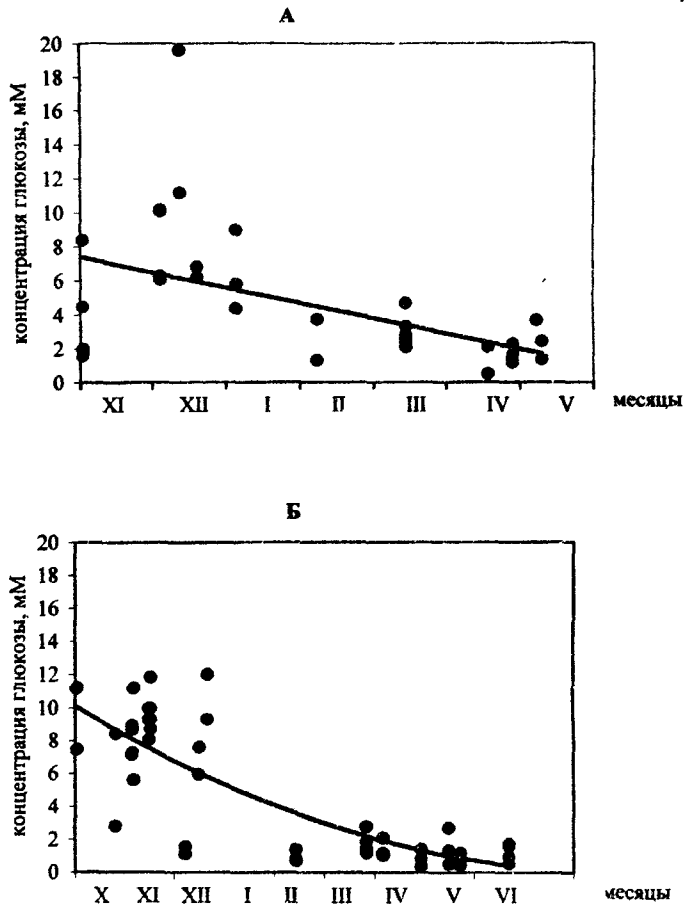


Рис. 1. Сезонная динамика содержания глюкозы в плазме крови миног (А) и лягушек (Б). Изменение уровня глюкозы в крови пойкилотермных животных в течение всего экспериментального периода описывается уравнениями линейной регрессии $y = -0.03x + 7.40$, $r = -0.53$ ($p < 0.001$) для миног и $y = -0.04x + 9.31$, $r = -0.80$ ($p < 0.001$) для лягушек. Эксперименты проводились в 2002 – 2003 г.г. Римскими цифрами по оси абсцисс указаны месяцы

содержание восков в плазме лягушек многократно меньше чем в плазме миног, однако, в процентном отношении они представлены значительными величинами (6-14%). По-видимому, воска широко представлены в пищевых цепочках миног и амфибий (планктон, беспозвоночные животные).

Таблица 1. Динамика содержания отдельных классов липидов в плазме крови миног.

Классы липидов	Октябрь-ноябрь	Декабрь	Март	Апрель
мг/мл плазмы (представлено содержание в %)				
Фосфолипиды	2.8 ± 0.6 (17.5)	3.4 ± 0.7 (21.9)	2.4 ± 0.5 (14.7)	1.5 ± 0.3 (22.1)
Триацилглицериды	сл	1.5 ± 0.3 (9.7)	3.9 ± 0.8 (23.9)	1.1 ± 0.2 (16.2)
Свободные жирные кислоты	сл	0.5 ± 0.1 (3.2)	0.9 ± 0.2 (5.5)	0.2 ± 0.04 (2.9)
Холестерин	3.6 ± 0.7 (22.5)	2.4 ± 0.5 (15.5)	3.0 ± 0.6 (18.4)	1.3 ± 0.3 (19.0)
Эфиры холестерина	7.5 ± 1.5 (46.9)	3.9 ± 0.8 (25.2)	4.2 ± 0.8 (25.8)	2.2 ± 0.4 (32.4)
Воска	2.1 ± 0.4 (13.1)	3.8 ± 0.8 (24.5)	1.9 ± 0.4 (11.7)	0.5 ± 0.1 (7.4)
Общие липиды	16.0 ± 3.2 (100.0)	15.5 ± 3.1 (100.0)	16.3 ± 3.3 (100.0)	6.8 ± 1.3 (100.0)

Таблица 2. Динамика содержания отдельных классов липидов в плазме крови лягушек.

Классы липидов	Октябрь-ноябрь	Декабрь	Март	Апрель	Май
мг/мл плазмы (представлено содержание в %)					
Фосфолипиды	0.8 ± 0.2 (16.6)	1.0 ± 0.2 (21.7)	0.5 ± 0.1 (13.9)	0.4 ± 0.1 (21.1)	0.5 ± 0.1 (20.8)
Триацилглицериды	сл	0.8 ± 0.2 (17.4)	0.4 ± 0.1 (11.1)	0.1 ± 0.02 (5.3)	0.1 ± 0.02 (4.2)
Свободные жирные кислоты	сл	0.1 ± 0.02 (2.2)	0.3 ± 0.06 (8.4)	0.2 ± 0.04 (10.5)	0.1 ± 0.02 (4.2)
Холестерин	1.2 ± 0.2 (25.0)	0.7 ± 0.1 (15.2)	0.7 ± 0.1 (19.4)	0.4 ± 0.08 (21.1)	0.5 ± 0.1 (20.8)
Эфиры холестерина	2.5 ± 0.5 (52.1)	1.5 ± 0.3 (32.6)	1.2 ± 0.2 (33.3)	0.6 ± 0.1 (31.5)	0.9 ± 0.2 (37.5)
Воска	0.3 ± 0.06 (6.3)	0.5 ± 0.1 (10.9)	0.5 ± 0.1 (13.9)	0.2 ± 0.04 (10.5)	0.3 ± 0.06 (12.5)
Общие липиды	4.8 ± 1.0 (100.0)	4.6 ± 0.9 (100.0)	3.6 ± 0.7 (100.0)	1.9 ± 0.4 (100.0)	2.4 ± 0.5 (100.0)

Содержание фосфолипидов, основная функция которых сводится к образованию мембранных структур, в плазме миног 1.5-3.4 мг/мл. У лягушек, в силу вообще низкого общего содержания липидов в плазме, концентрация фосфолипидов в зависимости от сезона колеблется от 0.4 до 0.98 мг/мл. Что касается процентного содержания фосфолипидов, то у миног и у лягушек эти величины очень близки (14-23%). Таким образом, ни эволюционный статус животного, ни его физиологическое состояние (стадия многомесячного голодания) не оказывают существенного влияния на удельное содержание фосфолипидов в плазме крови. Что касается

жирнокислотного состава фосфолипидов, то у миног зарегистрировано более высокое содержание моноеновых кислот (45.4-49%) и полиеновых кислот ω -3 типа (8.9-17%) по сравнению с лягушками, у которых содержание моноеновых кислот ниже (26.3-37%), а полиеновых кислот ω -6 типа существенно выше (24.6-27.6%).

Холестерин вместе с производными (эфиры холестерина) составляет у миног до 50-70% от липидов плазмы и снижается до 40% только в зимние месяцы и ранней весной. У лягушек в процентном отношении суммарное содержание холестерина и его эфиров колеблется в близких к миногам значениях (48 - 77%). Данный факт объясняется тем, что пойкилотермные животные в период метаболической депрессии расходуют запасы липидов (холестерина и фосфолипидов в том числе), которые были сделаны в период активного питания. Поддержание высоких уровней холестерина и фосфолипидов на протяжении этого периода, в частности, необходимо для синтеза половых продуктов.

Что касается свободных жирных кислот и триглицеридов, то в крови миног в самом начале преднерестовой миграции (октябрь, ноябрь) и в крови лягушек осенью они не обнаружены. В марте содержание триглицеридов и свободных жирных кислот в плазме миног заметно увеличивается в 2-2.6 раза. У лягушек на протяжении гибернации концентрация этих липидов постепенно снижается и достигает минимального уровня в апреле – мае. Оценка индивидуальных жирных кислот показывает, что жидкость триглицеридов миног обусловлена моноеновыми (22-34%) и в большей мере полиеновыми кислотами ω -3 типа (29-54%), тогда как у лягушки - также моноеновыми (36-52%) и полиеновыми кислотами ω -6 типа (12.7-23%), которые являются более тугоплавкими по сравнению с ω -3 кислотами. То есть, триглицериды миног более жидкотекучи по сравнению с таковыми у лягушек, что подтверждается и низкими значениями индексов ненасыщенности у последних (226.5 – 328.0 у миног и 114.6 – 141.6 у лягушек). Этот факт можно объяснить своеобразием трофических цепочек животных и их физиологическими особенностями. Качественный состав свободных жирных кислот удивительно похож у круглоротых и амфибий и разительно отличается от состава эстерифицированных жирных кислот. Большая часть (до 90%) свободных жирных кислот представлена насыщенными и моноеновыми кислотами.

1.3. Аминокислотный состав плазмы

Данные по суммарному пулу аминокислот обнаруживают противоположную динамику у миног и лягушек на протяжении "голодного" периода (табл. 3). У моноциклических, погибающих весной после вымета половых продуктов, миног в ноябре суммарный пул аминокислот составляет 1118 ± 91 μ моль/л, в феврале он возрастает на 32% и составляет 1486 ± 87 , а в апреле пул достигает максимального значения 1943 ± 91 μ моль/л, т.е. увеличивается на 74% в сравнении с осенью. У многократно размножающихся лягушек в октябре пул аминокислот составляет $1401 \pm$

47 $\mu\text{моль/л}$, в ноябре и декабре-январе он снижается на 27-20% и составляет, соответственно, 1030 ± 89 и 1133 ± 90 $\mu\text{моль/л}$. В апреле пул свободных аминокислот достигает минимального значения – 827 ± 112 $\mu\text{моль/л}$, т.е. в сравнении с осенними величинами уменьшается более чем на 40%

Содержание лейцина и изолейцина в плазме крови миног с ноября по апрель стабильно - 10-12%, несмотря на количественное изменение суммарного пула аминокислот за этот период. То же самое можно сказать о валине, его сезонные колебания составляют 5-7 5%. У лягушки содержание в плазме крови разветвленных аминокислот существенно выше – от 11 до 18% лейцина + изолейцина и от 7 до 12% валина. В октябре аминокислотный пул в плазме лягушек почти на 30 % представлен разветвленными аминокислотами. Преобладание разветвленных аминокислот указывает на строго контролируемый протеолиз белков.

Далее по удельному вкладу в общий пул аминокислот следует аланин (α – и β - формы). У миног в плазме крови с ноября по апрель α -аланин составляет 8-10% от суммарного пула, а β -аланин- 10-12%, у лягушек -7-12% и 3-6%, соответственно. У миног «транспортная» функция α – аланина, скорее всего, используется для «перекачки» белка мышц в белки гонад. У лягушек, по-видимому, происходит окислительный катаболизм α – аланина. Присутствие β – аланина свидетельствует о распаде пиримидинов, который в тканях миног происходит интенсивнее в сравнении с лягушками.

Существенный вклад в аминокислотный пул крови миног и лягушек вносят такие аминокислоты как треонин (7-11% от суммарного пула для миног и 6-9% - для лягушек) и лизин (6-11% - миноги и 4-7% -лягушки). Эти две аминокислоты не имеют своих трансаминаз и не могут переаминироваться. поэтому они слабо утилизируются тканями, и их уровни в плазме крови остаются высокими. Кроме того, известно, что лизин не синтезируется и не катаболизирует в мышце и, таким образом, его содержание в плазме есть индекс протеолиза белков мышц.

Уровни глицина и серина, из которого образуется глицин, достаточно высоки. В плазме миног в ноябре глицин составляет 7% от суммарного пула, а в феврале и апреле – 9-11%. Колебания содержания серина составляют 3.5-5%. У лягушек глицин осенью и весной составляет 5-6% от суммарного пула, а в зимние месяцы – 9-12%. Содержание серина колеблется от 3-5% осенью и весной до 6-8% - в зимний период.

Уровни глутамина в плазме крови миног невысоки, только в начале преднерестовой миграции он составляет порядка 7%, а в зимний и весенний периоды снижается до 3-4% . Глутамат в плазме крови миног в зависимости от сезона колеблется от 1 до 5% от общего аминокислотного пула, а у лягушек – от 2 до 8%. У лягушек с октября по апрель в плазме крови нами зарегистрированы невысокие концентрации глутамина – от 3 до 5% от всего пула аминокислот.

Таблица 3. Сезонное содержание свободных аминокислот в плазме крови миног и лягушек (мкмоль/л плазмы). В скобках представлено содержание в % от общего пула аминокислот.

Аминокислоты	лягушки						
	Ноябрь	Февраль	Апрель	Октябрь	Ноябрь	Декабрь-январь	Апрель
α -аланин	89.0 $\pm$ 6.1 (8.0)	146.6 $\pm$ 10.7 (9.9)*	166.8 $\pm$ 19.3 (8.6)*	102.3 $\pm$ 7.6 (7.3)	121.3 $\pm$ 9.5 (11.8)	90.9 $\pm$ 14.2 (8.0)	78.5 $\pm$ 16.3 (9.5)*
β -аланин	125.4 $\pm$ 19.6 (11.2)	177.5 $\pm$ 13.3 (11.9)*	179.3 $\pm$ 20.7 (9.2)*	34.6 $\pm$ 2.7 (2.5)	62.7 $\pm$ 5.6 (6.1)*	65.3 $\pm$ 8.8 (5.8)*	49.6 $\pm$ 11.7 (6.0)
α -аминомасляная кислота	5.9 $\pm$ 1.0 (0.5)	7.3 $\pm$ 1.0 (0.5)	5.7 $\pm$ 2.0 (0.3)	-	6.5 $\pm$ 0.8 (0.6)	4.6 $\pm$ 1.6 (0.4)	-
β -аминомасляная кислота	7.6 $\pm$ 1.2 (0.7)	12.3 $\pm$ 5.6 (0.8)	8.8 $\pm$ 1.5 (0.5)	64.3 $\pm$ 7.8 (4.6)	38.7 $\pm$ 3.3 (3.8)*	32.7 $\pm$ 2.0 (2.9)*	12.0 $\pm$ 2.3 (1.5)**
Аргинин	11.5 $\pm$ 2.5 (1.0)	10.9 $\pm$ 2.5 (0.7)	17.5 $\pm$ 3.8 (0.9)	58.3 $\pm$ 6.3 (4.2)	10.8 $\pm$ 0.8 (1.0)*	7.8 $\pm$ 1.7 (0.7)*	15.3 $\pm$ 6.8 (1.9)*
Аспарагин	19.7 $\pm$ 4.2 (1.8)	11.8 $\pm$ 3.2 (0.8)	16.0 $\pm$ 3.1 (0.8)	29.0 $\pm$ 3.4 (2.1)	8.9 $\pm$ 0.6 (0.9)*	11.7 $\pm$ 0.7 (1.0)*	11.0 $\pm$ 1.9 (1.3)*
Валин	55.2 $\pm$ 10.9 (4.9)	100.8 $\pm$ 18.1 (6.7)	146.0 $\pm$ 19.7 (7.5)*	166.5 $\pm$ 9.6 (11.9)	72.5 $\pm$ 6.3 (7.0)*	102.5 $\pm$ 17.6 (9.0)*	69.1 $\pm$ 9.9 (8.4)*
Гистидин	33.3 $\pm$ 7.9 (2.9)	35.5 $\pm$ 5.5 (2.4)	56.8 $\pm$ 10.1 (2.9)	38.8 $\pm$ 4.2 (2.8)	48.6 $\pm$ 5.0 (4.7)	48.5 $\pm$ 9.1 (4.3)	16.9 $\pm$ 2.9 (2.0)**
Глутамин	76.0 $\pm$ 6.4 (6.8)	56.5 $\pm$ 9.1 (3.8)	53.7 $\pm$ 8.1 (2.8)	62.0 $\pm$ 4.8 (4.4)	34.7 $\pm$ 2.7 (3.4)*	34.8 $\pm$ 4.7 (3.1)*	33.1 $\pm$ 7.1 (4.0)*
Глутаминовая кислота	34.9 $\pm$ 4.3 (3.1)	72.6 $\pm$ 6.1 (4.9)*	15.9 $\pm$ 2.7 (0.8)**	29.5 $\pm$ 5.2 (2.1)	80.6 $\pm$ 5.2 (7.8)*	65.7 $\pm$ 13.5 (5.8)*	15.6 $\pm$ 3.3 (1.9)*
Глицин	78.7 $\pm$ 10.6 (7.0)	159.5 $\pm$ 10.4 (10.7)*	178.4 $\pm$ 12.2 (9.2)*	71.3 $\pm$ 9.1 (5.1)	118.9 $\pm$ 14.5 (11.5)*	99.1 $\pm$ 27.5 (8.7)*	49.6 $\pm$ 9.2 (6.0)**
Лейцин, изолейцин	120.2 $\pm$ 1.0 (10.8)	150.3 $\pm$ 17.7 (10.1)	225.4 $\pm$ 23.7 (11.6)**	249.6 $\pm$ 15.3 (17.8)	110.2 $\pm$ 11.1 (10.7)*	174.4 $\pm$ 31.7 (15.4)*	131.3 $\pm$ 23.0 (15.8)*
Лизин	127.0 $\pm$ 21.5 (11.4)	81.6 $\pm$ 30.3 (5.5)*	161.7 $\pm$ 4.2 (8.3)*	62.3 $\pm$ 5.1 (4.4)	41.4 $\pm$ 7.5 (4.0)*	77.4 $\pm$ 13.5 (6.8)	46.2 $\pm$ 6.7 (5.6)*
Метионин	5.5 $\pm$ 0.7 (0.5)	10.0 $\pm$ 2.7 (0.7)	11.2 $\pm$ 1.9 (0.6)	20.3 $\pm$ 2.1 (1.4)	10.4 $\pm$ 1.0 (1.0)*	16.7 $\pm$ 4.5 (1.5)	14.3 $\pm$ 2.0 (1.7)
Орнитин	58.1 $\pm$ 16.9 (5.2)	55.0 $\pm$ 16.6 (3.7)	119.1 $\pm$ 10.2 (6.1)**	41.5 $\pm$ 4.4 (3.0)	39.1 $\pm$ 6.4 (3.8)	54.6 $\pm$ 4.5 (4.8)*	41.1 $\pm$ 8.1 (5.0)*
Пролин	16.5 $\pm$ 2.7 (1.5)	30.8 $\pm$ 5.0 (2.1)*	40.5 $\pm$ 6.0 (2.1)*	26.9 $\pm$ 1.1 (1.9)	15.0 $\pm$ 2.3 (1.5)*	15.4 $\pm$ 2.4 (1.4)*	20.6 $\pm$ 3.2 (2.5)*
ОН-пролин	5.0 $\pm$ 0.6 (0.4)	8.3 $\pm$ 1.7 (0.6)	6.3 $\pm$ 0.8 (0.3)	6.6 $\pm$ 0.7 (0.5)	8.7 $\pm$ 1.3 (0.8)	14.4 $\pm$ 4.7 (1.3)	4.9 $\pm$ 0.9 (0.6)*
Серин	60.2 $\pm$ 9.4 (5.4)	74.1 $\pm$ 7.7 (5.0)	68.7 $\pm$ 6.2 (3.5)	46.6 $\pm$ 6.4 (3.3)	80.9 $\pm$ 8.9 (7.9)*	65.8 $\pm$ 13.5 (5.8)	41.6 $\pm$ 8.4 (5.0)*
Таурин	22.6 $\pm$ 4.3 (2.0)	37.8 $\pm$ 6.9 (2.5)	37.9 $\pm$ 5.8 (2.0)	44.0 $\pm$ 5.3 (3.1)	19.4 $\pm$ 2.4 (1.9)*	19.8 $\pm$ 5.0 (1.7)*	14.8 $\pm$ 2.0 (1.8)*
Треонин	119.6 $\pm$ 18.3 (10.7)	161.2 $\pm$ 22.5 (10.8)	127.8 $\pm$ 20.6 (6.6)	124.4 $\pm$ 8.5 (8.9)	79.6 $\pm$ 14.5 (7.7)*	71.7 $\pm$ 27.5 (6.3)*	45.7 $\pm$ 9.2 (5.5)*
Триптофан	16.3 $\pm$ 4.1 (1.5)	37.8 $\pm$ 12.2 (2.5)*	13.2 $\pm$ 2.4 (0.7)*	6.3 $\pm$ 0.9 (0.4)	-	28.7 $\pm$ 8.0 (2.5)*	9.2 $\pm$ 0.1 (1.1)*
Тирозин	-	-	223.7 $\pm$ 34.3 (11.5)	76.4 $\pm$ 8.4 (5.5)	-	-	70.7 $\pm$ 13.7 (8.5)
Фенилаланин	30.5 $\pm$ 6.5 (2.7)	48.3 $\pm$ 6.2 (3.3)	62.9 $\pm$ 5.9 (3.2)**	39.9 $\pm$ 2.1 (2.8)	21.5 $\pm$ 2.4 (2.1)*	31.3 $\pm$ 4.2 (2.8)	36.1 $\pm$ 6.6 (4.4)
Суммарный пул	1118 $\pm$ 91 (100.0)	1486 $\pm$ 87 (100.0)	1943 $\pm$ 91 (100.0)	1401 $\pm$ 47 (100.0)	1030 $\pm$ 89 (100.0)	1133 $\pm$ 90 (100.0)	827 $\pm$ 112 (100)

*- $p < 0.05$ (по сравнению с данными в ноябре или октябре)

*- $p < 0.05$ (по сравнению с данными в феврале или декабре-январе)

В отличие от лягушек, многи аммонотеличны, поэтому в их плазме крови практически отсутствуют аминокислоты орнитинового цикла. Низкое содержание аргинина и орнитина в плазме лягушек зимой свидетельствует, по всей вероятности о том, что синтез мочевины в этот период у лягушек резко замедлен из-за снижения АТФ - зависимого синтеза цитруллина в митохондриях печени.

Большой интерес представляет количественная "вспышка" тирозина, предшественника меланина, в апреле и триптофана, предшественника серотонина, в декабре-феврале в плазме крови миног. Если в ноябре и в феврале тирозин отсутствует полностью, то в апреле он составляет 11.5% от суммарного аминокислотного пула. У лягушек тирозин зарегистрирован в октябре (5%) и в апреле (9%). У миног вклад триптофана в общий пул аминокислот в ноябре составляет 1.5%, в декабре – 2.5% и снижается в апреле до 0.6%. В плазме крови лягушек в ноябре триптофан не регистрируется. Максимальное содержание триптофана наблюдается в декабре-январе (2.5%) и снижается в апреле (1.1%)

Все остальные аминокислоты в плазме крови миног и лягушек представлены минорными фракциями: гистидин - 2-3%, фенилаланин - 2-4%, таурин – 2-3%, метионин – 0.5-1.5%, аспарагин - 0.8-2% и пролин 1.5-2.5%.

Таким образом, аминокислотный профиль плазмы крови длительно голодающих пойкилотермных позвоночных – миног и лягушки – обнаруживает сезонные изменения и свидетельствует о контролируемом протеолизе и подавлении биосинтетических процессов в многомесячные периоды синхонии и гибернации.

2. Биэнергетические параметры митохондрий печени миног и лягушек в периоды метаболической депрессии и активности

2.1 Оценка параметров дыхания митохондрий Сравнение с млекопитающими

Скорости дыхания митохондрий печени миног и лягушек в различных метаболических состояниях обнаруживают выраженную зависимость от сезона. Особенно четко это прослеживается на митохондриях миног. При изучении дыхания (базальное дыхание и состояние 4) митохондрий, очевидно, что в апреле скорости дыхания в присутствии пирувата и малата в сравнении с декабрем - февралем увеличиваются почти в 3 раза, в присутствии сукцината ± ротенона - в 1.4 – 2 раза (табл. 4).

В митохондриях активных лягушек скорости базального дыхания и дыхания в состоянии 4 в присутствии НАД - и ФАД - зависимых субстратов в 1.5 – 2 раза возрастают по сравнению с митохондриями депрессированных животных (табл. 5).

У миног и лягушек, находящихся в активном метаболическом состоянии, скорости дыхания митохондрий в состоянии 4 в присутствии НАД – зависимых субстратов практически достигают скоростей дыхания митохондрий мышей (табл. 6)

Таблица 4. Сезонные изменения основных биоэнергетических параметров митохондрий печени миног, инкубированных в среде, содержащей (мМ): 250 сахаразы, 3 трис-НСl (рН 7.3), 3 MgCl₂, 3 KН₂РO₄. Комочные концентрации добавок в мМ: 5 пирувата, 1 малата, 5 сукцината, 0.005 ретенона.

Субстраты	Базальное дыхание	Состояние 3	Состояние 4	Разобщенное дыхание	ДК	АДФ/О	Скорость фосфорилирования
	нмоль О ₂ /мин/мг белка						нмоль АДФ/мин/мг белка
Декабрь – февраль							
Пируват + малат (n=9)	3.48 ± 0.46*	7.05 ± 0.76*	4.17 ± 0.63*	4.35 ± 0.56*	1.98 ± 0.29*	2.05 ± 0.46	23.36 ± 8.21*
Сукцинат (n=5)	6.24 ± 1.18	12.54 ± 0.90*	6.45 ± 1.62*	12.97 ± 1.70	2.27 ± 0.96	1.15 ± 0.31*	15.63 ± 4.35*
Сукцинат + rotenon (n=4)	6.81 ± 1.69	15.27 ± 2.36*	10.47 ± 1.90	18.70 ± 0.24*	1.81 ± 0.24*	1.51 ± 0.34	22.47 ± 6.33*
Март							
Пируват + малат (n=9)	5.20 ± 0.42*	14.32 ± 1.86*	6.02 ± 0.34*	9.62 ± 2.40	2.4 ± 0.29*	2.51 ± 0.17	46.39 ± 5.15*
Сукцинат (n=5)	6.73 ± 0.73	16.66 ± 0.61*	7.95 ± 0.37	6.42 ± 2.46	2.28 ± 0.37	2.02 ± 0.24	30.07 ± 3.42*
Сукцинат + rotenon (n=4)	7.00 ± 0.42	10.34 ± 0.52*	7.23 ± 0.51*	14.77 ± 1.87	1.45 ± 0.11	1.49 ± 0.15	25.47 ± 3.93*
Апрель							
Пируват + малат (n=9)	10.65 ± 1.06	42.65 ± 4.01	12.64 ± 1.06	31.53 ± 8.33	3.53 ± 0.44	2.75 ± 0.14	229.3 ± 35.61
Сукцинат (n=5)	10.94 ± 2.50	27.01 ± 3.91	12.43 ± 1.85	30.25 ± 6.13	2.20 ± 0.25	2.72 ± 0.21	105.23 ± 23.31
Сукцинат + rotenon (n=4)	12.11 ± 3.40	33.37 ± 5.76	13.24 ± 1.80	25.09 ± 6.00	2.44 ± 0.30	1.63 ± 0.18	75.91 ± 7.10

* - p<0.05 (по сравнению с данными в апреле)

* - p<0.05 (по сравнению с данными в апреле)

Таблица 5. Сезонные изменения основных биоэнергетических параметров митохондрий печени лягушек, инкубированных в среде, содержащей (мМ): 250 сахарозы, 3 трис-HCl (pH 7.3), 3 MgCl₂, 3 KCl, PO₄. Конечные концентрации добавок в мМ: 5 глутамата, 5 пирувата, 1 малата, 5 сукцинната, 0.005 rotenона.

Субстраты	Базальное дыхание	Состояние 3	Состояние 4	Разобщенное дыхание	ДК	АДФ/О	Скорость фосфорилирования
нмоль О ₂ /мин/мг белка				нмоль АДФ/мин/мг белка			
Октябрь – март							
Глутамат + малат (n=5)	4.62 ± 0.65*	9.84 ± 2.79*	7.21 ± 2.01*	10.12 ± 2.72*	1.38 ± 0.04	1.38 ± 0.05	26.76 ± 2.21
Пируват + малат (n=9)	4.03 ± 0.68	8.79 ± 1.04	5.38 ± 0.74	7.19 ± 1.02	1.72 ± 0.22	2.61 ± 0.51	53.14 ± 14.05
Сукцинат (n=5)	8.77 ± 2.08	17.23 ± 3.98*	12.80 ± 2.98*	27.43 ± 6.61	1.33 ± 0.03	1.42 ± 0.46	30.93 ± 9.44
Сукцинат + ротенон (n=4)	5.56 ± 1.13	9.19 ± 1.27*	6.60 ± 1.04	14.14 ± 3.88*	1.41 ± 0.04	1.74 ± 0.54	21.07 ± 4.62
Май – сентябрь							
Глутамат + малат (n=6)	9.63 ± 0.84	21.93 ± 2.88	15.51 ± 2.13	23.48 ± 3.91	1.61 ± 0.34	2.36 ± 0.53	37.13 ± 8.84
Пируват + малат (n=9)	7.36 ± 1.44	14.72 ± 2.94	9.98 ± 2.32	10.22 ± 2.41	1.60 ± 0.13	3.76 ± 0.64	71.17 ± 17.16
Сукцинат (n=5)	13.86 ± 2.95	27.34 ± 3.15	25.06 ± 2.88	30.48 ± 6.20	1.08 ± 0.05	0.88 ± 0.35	17.00 ± 6.31
Сукцинат + ротенон (n=4)	12.10 ± 4.13	20.36 ± 3.35	14.69 ± 3.85	24.02 ± 4.66	1.60 ± 0.25	1.03 ± 0.18	28.75 ± 7.47

* - p<0.05 (по сравнению с данными в мае-сентябре)

* - p<0.05 (по сравнению с данными в мае-сентябре)

Таблица 6. Биоэнергетические параметры митохондрий печени мышей, инкубированных в среде, содержащей (мМ): 250 сахарозы, 3 трис- HCl (рН 7.3), 3 MgCl_2 , 3 KH_2PO_4 . Конечные концентрации добавок в мМ: 5 глутамата, 1 малата, 5 сукцината, 0.005 ротенона.

Субстраты	Базальное дыхание	Состояние 3	Состояние 4	Разобщенное дыхание	ДК	АДФ/О	Скорость фосфорилирования
	нмоль O_2 /мин/мг белка						нмоль АДФ/мин/мг белка
Глутамат + малат (n=14)	14.95 $\pm$ 1.21	81.91 $\pm$ 5.91	16.36 $\pm$ 0.89	76.03 $\pm$ 9.74	5.25 $\pm$ 0.52	1.79 $\pm$ 0.12	249.69 $\pm$ 39.81
Сукцинат (n=4)	38.62 $\pm$ 3.54	135.60 $\pm$ 22.55	44.35 $\pm$ 6.14	135.98 $\pm$ 37.02	3.05 $\pm$ 0.19	1.40 $\pm$ 0.10	269.24 $\pm$ 82.66
Сукцинат + ротенон (n=4)	34.72 $\pm$ 2.69	131.13 $\pm$ 24.18	43.16 $\pm$ 6.93	133.07 $\pm$ 27.75	3.05 $\pm$ 0.22	1.20 $\pm$ 0.02	173.05 $\pm$ 21.75

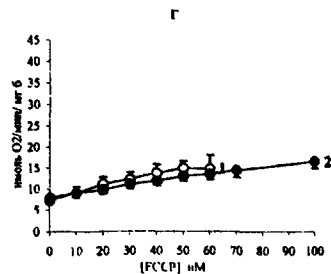
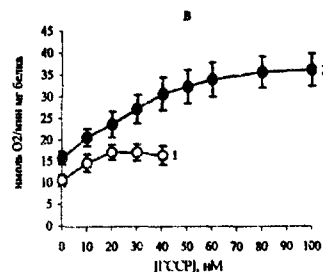
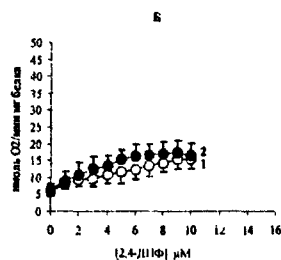
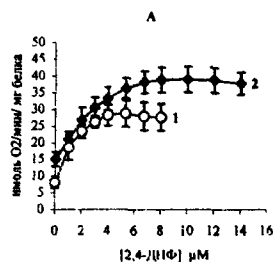


Рис. 3. Влияние 2,4-ДНФ и FCCP на нефосфорилирующее дыхание митохондрий. Среда инкубации содержала (мМ). 250 сахарозы, 3 трис - HCl (рН 7.3), 3 MgCl_2 , 3 KH_2PO_4 , 5 сукцината, 0.005 ротенона и олигомицин 4.5 $\mu\text{g}/\text{мл}$. А, В – минога; Б, Г – лягушка. Кривые 1 – зима, 2 – весна.

Анализ дыхания в состоянии 3 (табл. 4) показал, что в апреле в сравнении с зимним периодом скорости окислительного фосфорилирования в присутствии пирувата и малата в митохондриях миноги возрастают в 3.5 раза, а интенсивность фосфорилирования в присутствии сукцината возрастает в 2 раза.

Весной улучшается сопряженность митохондрий печени миног, о чем также свидетельствуют существенные изменения величин ДК, АДФ/О и скорости фосфорилирования. Скорость фосфорилирования увеличивается в 10 раз в присутствии субстратов первого дыхательного комплекса и в 3 раза в присутствии субстратов второго комплекса (табл. 4).

Между тем, в митохондриях активных лягушек скорости дыхания в состоянии 3 возрастают только в 1.6 – 2 раза в присутствии НАД - и ФАД-зависимых субстратов. Величины ДК, АДФ/О и скорости фосфорилирования не обнаруживают значимых сезонных изменений (табл. 5).

Для того чтобы дать дополнительную оценку сезонным изменениям в активности электрон-транспортной цепи следует обратиться к анализу нефосфорилирующего дыхания, разобщенного 2,4-ДНФ и FCCP. При стимуляции нефосфорилирующего дыхания митохондрий 2,4-ДНФ в присутствии сукцината, ротенона и олигомицина можно видеть, что максимальная разобщающая концентрация разобщителя для митохондрий миног не превышает 4 μM в январе и достигает 8 - 10 μM в апреле (рис. 3 А), для лягушек - 8 μM зимой и 10 μM весной (рис. 3 Б). Указанные концентрации ДНФ ускоряют нефосфорилирующее дыхание митохондрий пойкилотермных животных почти одинаково - в 2.5 - 3 раза не зависимо от сезона.

Аналогичная закономерность выявляется при использовании другого искусственного разобщителя - FCCP. Этот протонифер ускоряет дыхание митохондрий печени миноги в 1.6-2 раза при концентрации 20 нМ в январе и 100 нМ в апреле (рис. 3 В). Весной для максимального разобщения дыхания митохондрий лягушек необходимо 100 нМ FCCP, что в 2 раза превышает концентрацию, необходимую для разобщения в период гибернации животных (рис 3 Г).

Приведенные данные свидетельствуют о подавлении активности системы субстратного окисления и низких значениях мембранного потенциала митохондрий пойкилотермных животных в периоды синхронии и гибернации.

2.2. Содержание адениновых нуклеотидов в митохондриях и кусочках печени

В зимние месяцы суммарный пул адениновых нуклеотидов в митохондриях печени миног снижается на 23-34% ($3.46 \pm 1.04 - 3.79 \pm 0.2$ нмоль/мг белка) в сравнении с осенними и весенними месяцами (4.93 ± 0.62 нмоль/мг белка). Концентрация АТФ колеблется в пределах $0.7 \pm 0.08 - 0.99 \pm 0.16$ нмоль/мг белка. Что касается митохондрий лягушек, известно, что суммарный пул адениновых нуклеотидов в январе снижается на 27-32% (9.25 нмоль/мг белка) по сравнению с данными в сентябре (12.60 нмоль/мг белка) и в апреле (13.6 нмоль/мг белка) [Савина и др., 1992]

Минимальные концентрации АТФ наблюдаются в декабре-январе (2.6 – 3.35 нмоль/мг белка). Следует отметить, что концентрации адениновых нуклеотидов в митохондриях лягушек существенно превосходят значения, полученные нами на митохондриях печени миног.

Ранее проведенные исследования [Savina and Gamper, 1998] показали, что в январе – феврале содержание АТФ в гепатоцитах миног снижается с 1.3 до 0.69 нмоль/мг вл массы, а у единичных особей достигает 0.2-0.11 нмоль/мг вл массы. В ткани печени миног в январе – феврале содержание АТФ колеблется в пределах 0.63-0.74 нмоль/мг вл массы и увеличивается до 1.01 нмоль/мг вл массы в апреле. Энергетический потенциал гепатоцитов заметно возрастает от 0.3 – 0.5 зимой до 0.7 в апреле – мае.

В ткани печени активных лягушек суммарный пул нуклеотидов в 2 – 2.5 раза выше (1.38 ± 0.07 – 1.67 ± 0.18 нмоль/мг вл массы) по сравнению с гибернирующими животными (0.65 ± 0.12 – 0.8 ± 0.11 нмоль/мг вл массы). Концентрация АТФ значимо уменьшается с октября (0.63 ± 0.1 нмоль/мг вл массы) по февраль (0.21 ± 0.04 нмоль/мг вл массы) и повышается с апреля (0.74 ± 0.21 нмоль/мг вл массы) по июнь (1.18 ± 0.1 нмоль/мг вл массы). Заряд Аткинсона колеблется от 0.64 до 0.87 в зависимости от сезона.

Таким образом, в период метаболической депрессии пойкилотермные животные обратимо супрессируют скорости дыхания и фосфорилирования. Низкий мембранный потенциал, о чем также свидетельствуют кривые по титрованию нефосфорилирующего дыхания разобщителями (2,4-ДНФ, FCCP), недостаточен для оптимального синтеза АТФ. В митохондриях печени миног это наиболее очевидно.

3. Ресопрягающие эффекты карбоксилатрактилата (Катр) и глутамата (Глут) на разобщающее действие лаурата

В клетках печени позвоночных животных от 15 до 40% кислорода, потребляемого митохондриями, не связано с синтезом АТФ и обусловлено пассивной утечкой протонов через внутреннюю мембрану органелл. В изолированных митохондриях этот процесс может быть индуцирован разобщителями окислительного фосфорилирования. Среди природных разобщителей большой интерес представляют свободные длинноцепочечные жирные кислоты. Разобщающее действие жирных кислот может быть опосредовано белками внутренней мембраны митохондрий, в частности АТФ/АДФ - и аспартат/глутаматным антипортерами. Наши исследования показали, что разобщающий эффект лаурата подавляется совместным действием ингибиторов АТФ/АДФ - антипортера Катр и лиганда аспартат/глутаматного антипортера Глут. Это свидетельствует о том, что в митохондриях печени миног и лягушек, так же как и в митохондриях печени мышей, в разобщении принимают участие АТФ/АДФ - и аспартат/глутаматный антипортеры. Для количественной оценки степени участия в разобщении этих переносчиков могут быть применены величины ресопрягающих эффектов соответственно Катр и Глут [Самарцев и др., 1999]. Под

ресопрягающим действием понимают величину, выражающую степень подавления стимуляции жирной кислотой дыхания митохондрий. Ресопрягающий эффект удобно выражать в %. В осенний и зимний периоды метаболической депрессии в митохондриях величины ресопрягающих эффектов Катр составляют 52 и 49% соответственно. Последующая за Катр добавка Глут не оказывает ингибирующего действия на дыхание митохондрий, разобоченных лауратом в ноябре, и оказывает ресопрягающий эффект (28%) в декабре-январе. В марте Катр и Глут полностью ресопрягают разобочающее действие лаурата и частично ингибируют эндогенное дыхание митохондрий, обусловленное присутствием в митохондриях эндогенных жирных кислот. Инкубация митохондрий в среде с БСА, связывающего эндогенные жирные кислоты, практически нивелирует сезонные различия в скоростях нефосфорилирующего дыхания, а Катр и Глут не оказывают ресопрягающих эффектов.

В митохондриях печени лягушки ресопрягающие эффекты Катр и Глут не обнаруживают значимых статистических сезонных изменений. В митохондриях зимних лягушек ресопрягающие эффекты Катр и Глут равны (52%), а в весенних - действие Катр незначительно усиливается (67%), а действие Глут снижается (40%). Величины ресопрягающих эффектов, наблюдаемые в митохондриях печени лягушек, близки к таковым в митохондриях печени мышей (Катр 68 - 70%, Глут 26-38%).

4. Мембранная проницаемость митохондрий печени миног и лягушек. Индукция поры. Действие эффекторов поры на набухание митохондрий в разных средах инкубации. Сравнение с млекопитающими

4.1. Проницаемость мембран митохондрий в растворе нитрата аммония

Как видно на рисунке 4 А, в среде 125 мМ NH_4NO_3 , 5 мМ трис-НСI (рН 7.3) митохондрии печени миног (кривая 1), в отличие от митохондрий лягушек (кривая 2) и мышей (кривая 3), пассивно набухают в результате транспорта протонов в матрикс. Одновременный вход ионов NO_3^- и NH_4^+ , как NH_3 и H^+ , сопровождается проникновением молекул воды, что приводит к увеличению объема матрикса и последующему снижению светорассеяния.

Энергизация сукцинатом приводит к резкому сжатию митохондрий печени миног в течение всего периода преднерестовой миграции (рис. 4 Б, кривые 1 и 2). Внесение пирувата и малата приостанавливает пассивное набухание зимой (рис. 4 Б, кривая 3) и вызывает сжатие митохондрий с выраженным лаг периодом весной (рис. 4 Б, кривая 4).

Митохондрии печени лягушек, преинкубированные с субстратами I и II комплексов электрон-транспортной цепи, энергизуются не независимо от сезона, что также приводит к повышению оптической плотности митохондриальной суспензии (рис. 4 Б, кривые 5, 6).

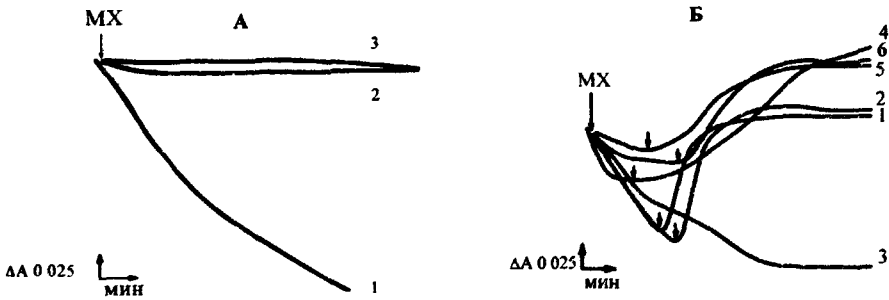


Рис. 4. Проницаемость мембран митохондрий печени миног, лягушек, мышей в растворе нитрата аммония (А) Действие энергизации на протонную проницаемость мембран митохондрий печени миног и лягушек (Б). Среда инкубации содержала (мМ) 125 NH_4NO_3 , 5 трис- NO_3 (рН 7.3) Стрелками показана добавка митохондрий (МХ) и субстратов Митохондрии (0.5 мг белка/мл) печени вносили в кювету с инкубационной средой перед регистрацией оптической плотности А 1 – МХ миног, 2 – МХ лягушек, 3 – МХ мышей Б 1 – МХ миног + 5 мМ сукцината + олигомицин 4.5 $\mu\text{г/мл}$ (февраль - апрель), 2 – МХ миног + 5 мМ сукцината + 5 $\mu\text{М}$ ротенона + олигомицин 4.5 $\mu\text{г/мл}$ (февраль - апрель); 3 – МХ миног + 5 мМ пирувата + 1 мМ малата + олигомицин 4.5 $\mu\text{г/мл}$ (февраль), 4 – МХ миног + 5 мМ пирувата + 1 мМ малата + олигомицин 4.5 $\mu\text{г/мл}$ (апрель), 5 – МХ лягушек + 5 мМ сукцината + 5 $\mu\text{М}$ ротенона + олигомицин 4.5 $\mu\text{г/мл}$ (январь-май), 6 МХ лягушек - 5 мМ пирувата + 1 мМ малата + олигомицин 4.5 $\mu\text{г/мл}$ (январь-май) ΔA – изменение оптической плотности митохондриальной суспензии

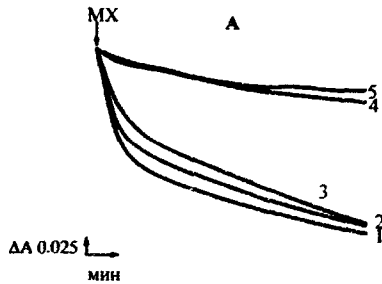


Рис. 5. Действие ингибиторов поры на набухание митохондрий печени миног в период метаболической депрессии Среда инкубации содержала (мМ) 125 NH_4NO_3 , 5 трис- NO_3 (рН 7.3), 5 мМ пирувата, 1 мМ малата и олигомицин 4.5 $\mu\text{г/мл}$ Стрелкой показана добавка митохондрий (0.5 мг/мл) (МХ) До внесения в среду митохондрий были сделаны следующие добавки: 1 – без добавок, 2 – 1 $\mu\text{М}$ CsA или 10 мг/мл БСА, 3 – 25 ед гепарина/мл; 4 – 1 мМ ЭГТА, 5 – 1 $\mu\text{М}$ CsA + 0.5 мМ MgCl_2 + 0.3 мМ АДФ или 1 $\mu\text{М}$ CsA + 10 мг/мл БСА + 25 ед гепарина/мл + 1 мМ ЭГТА

В зимний период преднерестовой миграции набухание энергизованных пируватом и малатом митохондрий печени миног чувствительно к действию ингибиторов поры (CsA, БСА, гепарин, ЭГТА, Mg^{2+} , АДФ) (рис 5) Наиболее выраженное ингибирование оказывают ЭГТА (кривая 4) и CsA + Mg^{2+} + АДФ, также как CsA + БСА + гепарин + ЭГТА (кривая 5).

В апреле - мае митохондрии печени миног, преинкубированных с НАД-зависимыми субстратами (пируват и малат), не набухают. Действие ингибиторов поры на мембранную проницаемость митохондрий не выражено.

Зимой в печени миноги все метаболические процессы протекают крайне медленно. Такие факторы, как низкий пул адениновых нуклеотидов, снижение активности ферментов аэробного метаболизма, спад мембранного потенциала, по всей видимости, являются сигналом для индукции поры в митохондриях печени миноги в этот период.

Эффекты таких ингибиторов как ЭГТА, гепарин, CsA, Mg^{2+} , АДФ приводят к снижению набухания энергизованных митохондрий миног зимой, указывая на тот факт, что в индукции поры в этот период могут быть задействованы ионы кальция, активация фосфолипазы A_2 , а также белки митохондрий АТФ/АДФ – антипортер, циклофилин Д [Zoratty and Szabo, 1995; Broekemeier and Pfeiffer, 1995; Crompton, 1999].

В последнее время установлена важная роль поры в индукции некротических изменений в клетке [Kroemer et al., 1998; Kim et al., 2003a; Kim et al., 2003b]. Эти изменения имеют место в печени половозрелых миног и прогрессируют с приближением весны [Sterling et al., 1967; Hardisty and Potter, 1971].

4.2. Проницаемость митохондриальных мембран печени миног в неионизированной изотонической среде

Опыты с измерением оптической плотности митохондрий в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 3 мМ трис-НСl (рН 7.3), показали, что мембрана митохондрии миноги в дезэнергизованном состоянии не проницаема для молекул воды и сахарозы. Это позволяет заключить, что в митохондриях миног пора находится в низкопроводящем состоянии, когда не возможен транспорт сахарозы.

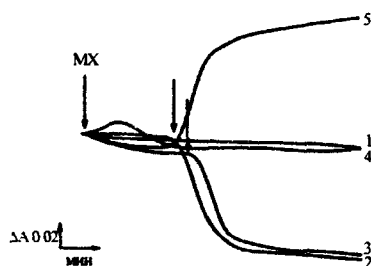


Рис. 6. Проницаемость мембран митохондрий печени миног в неионизированной изотонической среде в разные периоды преднерестовой миграции. Митохондрии (0.5 мг белка/мл) инкубировали в среде, содержащей (мМ) 250 сахарозы, 3 трис-НСl, рН 7.3. Стрелками указаны добавки субстратов: 1 – без добавок; 2 – 5 мМ пирувата + 1 мМ малата + олигомицин 4.5 мкг/мл (февраль); 3 – 1 мМ CsA + 5 мМ пирувата + 1 мМ малата + олигомицин 4.5 мкг/мл (февраль); 4 – 5 мМ пирувата + 1 мМ малата + 4.5 мкг/мл олигомицин (апрель); 5 – 5 мМ сукцината + 5 мМ ротенона + олигомицин 4.5 мкг/мл (февраль - апрель).

Субстраты I комплекса зимой вызывают набухание, практически не чувствительное к действию CsA (рис. 6, кривые 2, 3). Вместе с тем, в период метаболической активности животных митохондрии не набухают в присутствии пирувата, малата и олигомицина (рис. 6, кривая 4). Энергизация сукцинатом приводит к сжатию митохондрий в течение всего периода анадромной миграции миног (рис. 6, кривая 5).

В присутствии сукцината пору в митохондриях можно индуцировать воздействием таких эффекторов как Ca^{2+} , P, и лаурат. Однако действие лаурата, как индуктора, определяется энергосостоянием митохондрий. Зимой лаурат в концентрации 30 μM ослабляет индуцирующий эффект Ca^{2+} (20 μM) и P, (1 mM) в митохондриях миног. Жирная кислота, будучи протонофором, по-видимому, рассеивает $\Delta\psi$, и предотвращает тем самым накопление Ca^{2+} в митохондриях. Весной энергетическая ситуация в печени резко улучшается, и лаурат ведет себя, как классический индуктор поры. Кроме того, весной для индукции поры в митохондриях миног необходимы концентрации Ca^{2+} , P, и лаурата, вдвое превышающие таковые зимой. Обращает внимание и тот факт, что весной набухание митохондрий миног не чувствительно к действию CsA.

Таким образом, изучение энергетического метаболизма пойкилотермных животных представляет интерес не только с позиции расшифровки феномена обратимой метаболической супрессии. Исследование молекулярных механизмов метаболической депрессии может помочь в решении проблем, связанных с митохондриальной дисфункцией. В самые последние годы стало ясно, что такие заболевания, как энцефаломиопатия [Gellerich et al., 2004], нейродегенеративные болезни (болезнь Паркинсона, Альцгеймера) [Luft, 1994; Greenamyre et al., 2001; Shults, 2004; Aliev et al., 2004], а также патофизиологические процессы (сепсис, ишемия/реперфузия, рак) [Cassarino and Bennett, 1999; Modica-Napolitano and Singh, 2004; Halestrap et al., 2004] и старение [Beckman and Ames, 1998] сопровождаются морфофункциональными повреждениями митохондрий, такими как уменьшение концентрации адениновых нуклеотидов, повышение проницаемости митохондриальных мембран, снижение активности ферментов дыхательной цепи. Все эти особенности митохондрий отмечены нами в печени пойкилотермных животных в период метаболической депрессии.

ВЫВОДЫ

1. В период метаболической депрессии энергетические траты и развитие гонад у миног и лягушек осуществляются исключительно за счет мобилизации эндогенных субстратов, о чем свидетельствуют многократное снижение уровня глюкозы и липидов в плазме крови и преобладание протеолитических процессов в тканях над биосинтетическими.

2. В митохондриях печени миног и лягушек наблюдается обратимая супрессия энергетического метаболизма. Она проявляется в снижении скоростей дыхания в различных метаболических состояниях и снижении содержания АТФ в митохондриях и ткани печени.

3. Скорости дыхания митохондрий печени пойкилотермных животных в период гипометаболизма существенно ниже, чем у млекопитающих. Однако в активном состоянии митохондрии печени миног и лягушек в присутствии НАД - зависимых субстратов обнаруживают скорости потребления кислорода, свойственные митохондриям печени мышей.

4. В разобщении окислительного фосфорилирования в митохондриях печени миног и лягушек, также как в митохондриях мышей принимают участие АТФ/АДФ – антипортер и аспартат/глутаматный переносчик. Разобщающая активность этих белков подавляется карбоксинафтрилатом и глутаматом.

5. Высокоамплитудное набухание изолированных митохондрий печени миног в среде нитрата аммония в период метаболической депрессии обусловлено индукцией неселективной поры. Пора чувствительна к действию ингибиторов: CsA, ЭГТА, Mg^{2+} , АДФ, БСА, гепарин.

6. В неионизированной изотонической среде инкубации митохондрии печени миног не набухают, что свидетельствует о существовании поры в низкопроводящем состоянии.

7. В неионизированной изотонической среде инкубации при энергизации митохондрий сукцинатом пора индуцируется Ca^{2+} , P_i и лауратом. Эффект лаурата на набухание митохондрий миног может быть двояким в зависимости от их энергосостояния. Зимой в низкоэнергизованных митохондриях лаурат снижает индуцирующее действие Ca^{2+} и P_i , наоборот, весной – усиливает действие эффекторов.

8. Проявления митохондриальной дисфункции в печени миног в период метаболической депрессии (снижение скорости дыхания и фосфорилирования, снижение мембранного потенциала, уменьшение концентрации АТФ, повышение проницаемости митохондриальных мембран) идентичны таковым, наблюдаемым у млекопитающих, в том числе у человека, при патофизиологических процессах (нейродегенеративные заболевания, ишемия/реперфузия, старение).

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Емельянова Л.В., Савина М.В., Самарцев В.Н., Брайловская И.В. Мягкое разобщение в митохондриях печени пойкилотермных позвоночных (миноги и лягушки) в период метаболической депрессии // Тез. III Съезд Биохимического Общества. - Санкт-Петербург. - 2002. - С. 243.
2. Самарцев В.Н., Емельянова Л.В., Савина И.В., Брайловская И.В. К вопросу о термогенезе в тканях пойкилотермных позвоночных // Тез. Всероссийский симпозиум. Механизмы

терморегуляции и биоэнергетики: Взаимодействие функциональных систем. – Иваново – 2002. – С. 49.

3. Емельянова Л.В., Самарцев В.Н., Савина М.В. Гормональная индукция энергизации гепатоцитов миноги речной в весенний период преднерестовой миграции // Тез. Международная конференция. Рецепция и внутриклеточная сигнализация. – Пушкино. - 2003. – С. 231-233.
4. Емельянова Л.В., Самарцев В.Н., Брайловская И.В., Савина М.В. Участие ADP/ATP антипортера в разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени лягушки (*Rana temporaria*) // Журн. эвол. биохим. физиол. – 2003. – Т. 39. - № 6. – С. 524-529.
5. Емельянова Л.В., Самарцев В.Н., Савина М.В. Влияние разобщителей на нефосфорилирующее дыхание митохондрий печени миноги речной (*Lampetra fluviatilis*) и лягушки травяной (*Rana temporaria*) в осенне-зимний период метаболической депрессии // Журн. эвол. биохим. физиол. – 2004. – Т. 40. - № 1. – С. 84-86.
6. Емельянова Л.В., Савина М.В.; Королева Е.М. Аминокислотный пул крови длительно голодающих пойкилотермных позвоночных // Росс. Физиол. Ж. – 2004. - Т. 90. - № 4. – С. 447-457.
7. Larisa V. Emelyanova, Elena M. Koroleva, Margarita V. Savina. Glucose and free amino acids in the blood of lampreys (*Lampetra fluviatilis* L.) and frogs (*Rana temporaria* L.) under prolonged starvation // Comp. Biochem. Physiol. – 2004. V. 138A. – P. 527-532.
8. Емельянова Л.В. Нарушение функций митохондрий гепатоцитов миноги *Lampetra fluviatilis* L. в зимний период преднерестовой миграции. Вестник молодых ученых 2'2004: 50-57. 2004.
9. Емельянова Л.В., Похелайнен Е.Л., Королева Е.М., Савина М.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография как инструмент эволюционной биохимии // Тез. Всероссийский симпозиум Хроматография и хроматографические приборы. – Москва. – 2004. – С. 95.
10. Emelyanova L.V., Savina M.V. Metabolic state in liver cells of lamprey (*Lampetra fluviatilis* L.) over prolonged starvation // Abstr. The VI International congress on the biology of fish. - Manaus-Amazonas-Brazil. – 2004.
11. Emelyanova L.V., Savina M.V., Belyaeva E.A. A new sight on an old problem: a one more step to underscore mechanism(s) of metabolic depression // Abstr. The VI International congress on the biology of fish. - Manaus-Amazonas-Brazil. – 2004.
12. Emelyanova L.V., Savina M.V. Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction is the pathology for the mammals and the physiological norm for poikilothermic vertebrates // Abstr. Mitochondrial Medicine 2004 – Streams of Energy. - Pittsburgh, Pennsylvania, USA. – 2004.
13. Larisa V. Emelyanova, Margarita V. Savina, and Elena A. Belyaeva. Role of mitochondrial dysfunction in mechanism of reversible metabolic depression of over-wintering lamprey liver during pre-spawning migration // Abstr. Mitochondrial Physiology 2005. – Schröcken, Vorarlberg, Austria. – 2005. – P. 62.

№ 18 127

РНБ Русский фонд

2006-4

16774

Тиражирование и брошюровка выполнены в
Центре «Университетские телекоммуникации».
Санкт-Петербург, Саблинская ул., 14. Тел. (812)233-46-69
Объем 1 п.л. Тираж 100 экз.