

УДК 591.31:[576.311.347+577.337](477)

## ОКИСНЕННЯ СУКЦИНАТУ ТА $\alpha$ -КЕТОГЛУТАРАТУ В МИТОХОНДРІЯХ ЗАРОДКІВ В'ЮНА (*MISGURNUS FOSSILIS* L.) НА РАННІХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ

П.Хороший, Ю.Стефанків, Д.Санагурський

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна,  
e-mail: piterx@mailru.com, biofiz@franko.lviv.ua

Вивчено АДФ- та  $\text{Ca}^{2+}$ -стимульоване дихання мітохондрій зародків в'юна на стадіях 8-ми та 64-х бластомерів. З'ясовано, що мітохондрії ікринок в'юна на різних етапах дроблення перебувають в енергетично відмінних станах, які мають різну ефективність окисного фосфорилування, дихання та транспортування йонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Ключові слова:* мітохондрія, в'юн, субстрати циклу Кребса, дихання мітохондрій, окисне фосфорилування, зародок.

У літературі зібрано багато даних, які свідчать про циклічний і спряжений з поділом-дробленням зародків амфібій, голкошкірих і риб характер споживання кисню [1, 13, 14]. З'ясовано також, що інтенсивність дихання зародків у процесі раннього розвитку зростає, зокрема, у в'юна у 8 разів [6], тоді як зростання споживання кисню в ікринок під час дроблення не пов'язують зі збільшенням кількості мітохондріального білка [8, 9].

Для соматичних клітин ссавців виявлено дві реципрокні гормонально-нуклеотидно-субстратні системи регуляції аеробного енергозабезпечення: адреналін-цАМФ-сукцинат і ацетилхолін-цГМФ- $\alpha$ -кетоглутарат [4]. Було доведено, що у відповідь на активацію симпатoadреналової системи вибірково активується окиснення у мітохондріях субстрату циклу Кребса сукцинату, тоді як у стані спокою, за переважних впливів парасимпатичної системи, вибірково активованим є окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату [3, 10, 11]. Це стає можливим завдяки зростанню активності відповідних дегідрогеназ циклу трикарбонових кислот і приєднанню нових шляхів підтоку субстратів через реакції переамінування [5].

Оскільки циклічні зміни активностей дегідрогеназ циклу Кребса відомі для ранніх стадій поділу яєць в'юна [2], то логічно пов'язати їх із циклічністю зміни споживання кисню в цьому разі. Тому наша мета вивчити особливості окиснення субстратів циклу трикарбонових кислот сукцинату й  $\alpha$ -кетоглутарату на різних стадіях поділу ікри в'юна.

Головним об'єктом дослідження були зародки прісноводної риби в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) на різних стадіях розвитку. Дорослі особини риб виллов-

лювали у водоймах Львівської області. За лабораторних умов в'юнів сортували за статтю й утримували в акваріумах при температурі 4°C. Яйцеклітини утримували й запліднювали за Нейфахом [6]. Овуляцію стимулювали за допомогою внутрішньочеревного введення акліматизованим при 18°C самкам гонадотропіну зоріогонічного (в/о Мінського заводу ендокринних препаратів) – 750 од., або внутрішньом'язово – 500 од. Взяті, відповідно, через 24 або 36 год ікру запліднювали в чашках Петрі у відстояній водопровідній воді суспензією спермії, отриманої із сім'яників самців. Через 5–10 хв після запліднення зиготи ретельно відмивали від надлишку спермій і в контрольних серіях інкубували в розчині Гольф ретера при температурі 20–22°C. Візуально за стадіями розвитку стежили під бінокулярним мікроскопом МБС-9, порівнюючими їх з описаними у літературі [7].

Запліднену ікру риби попередньо зважували. Гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Ельвегейма при 3 000 об/хв, три вертикальні ходи товчачика, з розрахунку 1 г ікри на 1 мл середовища виділення, що містило, ммоль: KCl – 25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 10;  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ ; EGTA – 5; альбумін – 0,5 %; TPIS-HCl – 10 (pH-7,4); цукрозу – 0,25 моль. Готовий гомогенат переміщали в центрифужні пробірки й центрифугували при 150 g (5 хв) та 350 g (5 хв) без зупинки ротора. Супернатант переливали в чисті центрифужні пробірки та осаджували фракції мітохондрій при 5500 g (15 хв).

Отриманий осад мітохондрій ресуспендували в середовищі виділення, яке додавали з розрахунку отримання суспензії 20–22 мг білка на 1 мл. Дихання реєстрували полярографічно за допомогою закритого електрода Кларка. Мітохондрії (МХ) інкубували при кімнатній температурі (20–22°C) у середовищі, що містило, ммоль: KCl – 50;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1; TPIS-HCl – 5 (pH-7,4); цукрозу – 0,15 моль. Як субстрати окиснення використовували сукцинат – 4 ммоль та  $\alpha$ -кетоглутарат – 4 ммоль. Дихання стимулювали додаванням у полярографічну комірку АДФ (200 мкмоль) та  $\text{CaCl}_2$  (200 мкмоль). Білок визначали за методом Лоурі [12]. Достовірність відмінностей оцінювали за критерієм Стьюдента.

З'ясовано, що під час дроблення зародків в'юна активність дегідрогеназ циклу Кребса змінюється [1]. Зокрема, найбільші перепади активностей зафіксовані для двох ферментів – сукцинатдегідрогенази (СДГ) та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (КГДГ), тоді як активність інших дегідрогеназ змінюється в незначних межах. Тому в дослідженнях основну увагу ми приділяли вивченню особливостей окиснення у мітохондріях ікри в'юна на різних стадіях поділу двох субстратів циклу трикарбонових кислот – сукцинату (СК) і  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ).

Як видно з табл. 1, суттєвих відмінностей в окисненні СК мітохондріями ікри на стадії 8-ми та 64-х бластомерів не виявлено. Заслуговує на увагу недостовірне зростання швидкості  $V_2$  на стадії 64-х бластомерів порівняно з МХ на стадії 8-ми бластомерів (приблизно втричі), що зумовило більший дихальний контроль за Ларді ( $V_3/V_2$ ) у другому випадку.

Таблиця 1

Окиснення субстратів циклу Кребса в мітохондріях ікри в'юна на різних стадіях розвитку за умов стимулювання дихання додаванням АДФ,  $M \pm m$

Субстра- ти окис- нення, ммоль	n	Стадія поділу	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	Стимулю- вання ди- хання, V <sub>3</sub> /V <sub>2</sub>	Дихальний контроль, V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>
			Нг-ат. О за 1 хв на 1 мг білка				
СК 4	3	8	2,43 ± 1,22	24,9 ± 1,45	7,29 ± 0,41*	12,2 ± 2,15	3,44 ± 0,27
СК 4	3	64	7,29 ± 4,01	25,2 ± 1,64	9,81 ± 3,35	5,05 ± 2,96	3,64 ± 1,58
КГ 4	4-5	8	1,69 ± 0,24	20,8 ± 2,72	4,87 ± 0,73	13,1 ± 2,04	2,75 ± 0,45
				25,1 ± 0,86	4,89 ± 1,32	7,42 ± 3,30	2,97 ± 1,96
КГ 4	3	64	0	24,0 ± 1,93	8,32 ± 2,05**	–	3,14 ± 0,53
				21,9 ± 5,45	11,6 ± 1,50**	2,74 ± 0,49	1,85 ± 0,23

Примітки. СК – сукцинат, КГ – α-кетоглутарат. Додавання АДФ – 200 мкмоль.

\*Різниця між окисненням сукцинату та α-кетоглутарату достовірна,  $p < 0,05$ .

\*\*Різниця достовірна між показниками мітохондрій на різних стадіях розвитку,  $p < 0,05$ .

АДФ-стимульоване дихання в разі окиснення СК 4 ммоль не відрізнялось на різних стадіях розвитку зародків. Як показники фосфорилування доданої АДФ, так і швидкість дихання залишались у цьому випадку на одному рівні, а коефіцієнт АДФ/О дещо зростав (+5%).

У разі окиснення КГ 4 ммоль МХ ікри на різних стадіях поділу виявлено, що тоді, коли вони були на стадії 64-х бластомерів, швидкість V<sub>2</sub> не реєструвалась. Зафіксовано певне недостовірне зростання АДФ-стимульованого дихання на стадії 64-х бластомерів (+15%) порівняно із стадією 8-ми бластомерів. Використовуючи подвійну стимуляцію додаванням АДФ, ми намагались пересвідчитись щодо внеску ендогенного СК в окиснення мітохондріями екзогенного КГ. Як видно з табл. 1, у цьому випадку швидкість АДФ-стимульованого дихання (V<sub>3</sub>) за другого додавання вища на стадії 8-ми бластомерів, тобто простежується протилежна тенденція до результатів споживання кисню у випадку першого додавання АДФ. Водночас з'ясовано, що швидкість V<sub>4</sub> за обох додатків АДФ була вищою у МХ ікри на стадії 64-х бластомерів (+70,8 та 137 %,  $p < 0,05$ ). Це зумовило те, що за другого додавання АДФ дихальний контроль за Чансом (V<sub>3</sub>/V<sub>4</sub>) у МХ на стадії 64-х бластомерів був знижений (–60,5%), але недостовірно.

Під час аналізу показників окисного фосфорилування в разі окиснення екзогенного КГ 4 ммоль, зазначимо, що вони загалом не відрізнялись на різних

стадіях поділу (табл. 2). Простежувалось лише недостовірне зростання коефіцієнта АДФ/О за двох додавань АДФ (+19,0% та +18,8% відповідно) та швидкості фосфорилування на стадії 64-х бластомерів.

Таблиця 2

Окисне фосфорилування у мітохондріях ікри в'юна на різних стадіях поділу за окиснення субстратів циклу Кребса

Субстрати окиснення, ммоль	n	Стадія поділу	Час фосфорилування, с на 1 мг б	АДФ/О мкмоль АДФ на нг-ат. О	Швидкість фосфорилування
СК 4	3	8	266 ± 33,8	1,88 ± 0,27	46,7 ± 5,95
СК 4	3	64	259 ± 28,7	1,98 ± 0,33	48,8 ± 4,97
КГ 4	4-5	8	242 ± 52,2	2,75 ± 0,45	61,7 ± 19,1
			228 ± 98,8	2,97 ± 0,96	70,9 ± 28,0
КГ 4	3	64	165 ± 29,4	3,28 ± 0,64	77,0 ± 11,6
			169 ± 33,5	3,53 ± 0,36	75,2 ± 11,5

Примітки: див табл. 1.

Отже, великих відмінностей в окисненні цих двох субстратів на різних стадіях поділу ікри в'юна за умов стимулювання дихання МХ додаванням АДФ немає. Загалом, ці відмінності стосувались лише окиснення КГ і в цьому разі виявлено достовірні відмінності у диханні в стані 4.

У разі порівняння АДФ-стимульованого дихання МХ ікри в'юна у метаболічних станах 2 та 3 окиснення СК та КГ фактично не відрізнялося як на стадії 8-ми, так і на стадії 64-х бластомерів. Однак у стані 4 на стадії 8-ми бластомерів ( $V_4$ , швидкість дихання після фосфорилування доданої АДФ) виявлено достовірну різницю в диханні у разі окиснення двох субстратів, зокрема у випадку СК вона була вищою (+49,7%,  $p < 0,005$ ) (див. табл. 1).

Отже, споживання кисню мітохондріями ікри в'юна на різних стадіях поділу за умов окиснення різних субстратів практично не відрізняється. Відмінності в окисному фосфорилуванні за умов цих двох субстратів циклу Кребса цілком можна пояснити особливостями організації дихального ланцюга. Проте, очевидно, ефективність споживання кисню мітохондріями ікри в'юна на різних стадіях дроблення є вищою у разі окиснення екзогенного КГ.

Поглинання іонів  $Ca^{2+}$  мітохондріями є енергозалежним процесом. Як видно з табл. 3, в разі окиснення екзогенного СК додавання 200 мкмоль  $Ca^{2+}$  спричиняло стимуляцію дихання МХ, яке було сильніше виражене в ікринок на стадії 8-ми бластомерів, аніж на стадії 64-х. Значення  $V_3$  у цьому випадку, відповідно, на 31,3% більше, а  $V_4$  – на 45,3% менше (див. табл. 3).

Таблиця 3

Дихання мітохондрій ікри в'юна на різних стадіях поділу в разі окиснення субстратів циклу Кребса за стимуляції дихання додаванням іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , 200 мкмоль

Субстрати окиснення, ммоль	n	Стадія поділу	$V_2$	$V_3$	$V_4$	Стимуляція дихання, $V_3/V_2$	Дихальний контроль, $V_3/V_4$
			ат. О за 1 хв на 1 мг білка				
СК 4	3	8	0	$48,7 \pm 4,19^*$	$10,8 \pm 1,00$	0	$4,51 \pm 0,27^{**}$
СК 4	3	64	$2,45 \pm 0,38$	$37,1 \pm 7,23$	$15,7 \pm 1,99$	$13,7 \pm 2,70$	$2,48 \pm 0,68$
$\alpha$ -КГ 4	3	8	0	$25,9 \pm 6,01$	$10,3 \pm 3,26$	0	$2,69 \pm 0,31$
$\alpha$ -КГ 4	3	64	0	$26,9 \pm 5,61$	$11,0 \pm 1,96$	0	$2,42 \pm 0,12$

Примітки. ЯК – сукцинат, КГ –  $\alpha$ -кетоглутарат. Додавання  $\text{Ca}^{2+}$  – 200 мкмоль.

\* Різниця між окисненням сукцинату та  $\alpha$ -кетоглутарату достовірна,  $p < 0,05$ .

\*\* Різниця достовірна між показниками мітохондрій на різних стадіях розвитку,  $p < 0,05$ .

Дихальний контроль за Чансом ( $V_3/V_4$ ) також був вищим у мітохондріях ікринок на стадії 8-ми бластомерів (+21,9%,  $p < 0,05$ ) (див. табл. 3).

У цьому разі показники транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ ікринок на стадії 8-ми бластомерів мали дещо більший, але недостовірний, час поглинання доданого  $\text{Ca}^{2+}$  (+11,5 %) та нижчий коефіцієнт  $\text{Ca}^{2+}/\text{O}$  (-40,8 %). Швидкість транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у МХ майже не відрізнялась у обох випадках (табл. 4).

Під час окиснення екзогенного КГ мітохондріями ікринок на різних стадіях дроблення швидкість  $\text{Ca}^{2+}$ -стимульованого дихання ( $V_3$  та  $V_4$ ) практично не відрізнялась на стадіях 8-ми та 64-х бластомерів (див. табл. 3). Проте показники, що характеризують поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  МХ, на різних стадіях дроблення були дещо відмінними.

Зокрема, час транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у МХ ікринок на стадії 8-ми бластомерів був тривалішим, а швидкість цього процесу – меншою, ніж у МХ ікринок на стадії 64-х бластомерів (+52,9 та -66,1%,  $p < 0,1$ ). Коефіцієнт  $\text{Ca}^{2+}/\text{O}$  навпаки, був вищим у мітохондріях ікринок на стадії 64-х бластомерів (+64,1%) (див. табл. 4).

Отже, МХ ікринок на стадії 64-х бластомерів здатні сильніше поглинати  $\text{Ca}^{2+}$  і, на нашу думку, кальцієва ємність цих мітохондрій вища.

У разі порівняння  $\text{Ca}^{2+}$ -стимульованого дихання за умов енергозабезпечення під час окиснення двох різних субстратів ЦТК помічаємо, що ці показники є значно вищими у випадку окиснення СК 4 ммоль. Наприклад,  $V_3$  у МХ ікринок на стадії 8-ми бластомерів за окиснення СК 4 ммоль була вищою, ніж за окиснення КГ (78,8 %,  $p < 0,05$ ), як і на стадії 64-х бластомерів (+37,9 %). У цьому разі час транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондрії під час окиснення СК є меншим на обох стадіях (-108%,  $p < 0,05$  – стадія 8-ми; -51,8% – стадія 64-х бластомерів), а швидкість транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ є більшою (+138 %,  $p < 0,1$  – стадія 8-ми;

+436%,  $p < 0,1$  – стадія 64-х бластомерів), аніж у випадку окиснення КГ. Коефіцієнт  $\text{Ca}^{2+}/\text{O}$  ж практично не змінюється.

Таблиця 4

Показники транспортування  $\text{Ca}^{2+}$ , спряженого зі стимуляцією дихання, в мітохондрії ікри в'юна на різних стадіях поділу,  $M \pm m$

Субстрати окислення, ммоль	n	Стадія поділу	Час транспортування $\text{Ca}^{2+}$ , с $\times$ $\times 1$ мг б.	$\text{Ca}^{2+}/\text{O}$ мкМ $\text{Ca}^{2+}$ на нг-ат. O	Швидкість транспортування $\text{Ca}^{2+}$
ЯК 4	3	8	51,4 $\pm$ 12,2*	5,36 $\pm$ 1,40	260 $\pm$ 73,3
ЯК 4	3	64	46,1 $\pm$ 6,63*	7,55 $\pm$ 1,78	257 $\pm$ 26,6
КГ 4	3	8	107 $\pm$ 10,7	4,93 $\pm$ 1,64	109 $\pm$ 8,50
КГ 4	3	64	70,0 $\pm$ 15,7	8,09 $\pm$ 3,51	181 $\pm$ 34,0

Примітки див. до табл. 3.

Отримані нами результати узгоджуються з відомими фактами про особливості окиснення СК та КГ у МХ різних тканинах тварин [3,4]. Очевидно, СК відіграє головну роль в енергозабезпеченні поглинання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозолу мітохондріями, що теж підтверджує відомі раніше факти. Однак у цьому разі на стадії 8-ми бластомерів МХ ікринок в'юна сильніше реагують на додавання екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  і показники дихання тоді вищі від окиснення СК.

На нашу думку, отримані дані свідчать про те, що МХ ікринок в'юна на різних етапах дроблення перебувають в енергетично відмінних станах, які мають різну ефективність окисного фосфорилування, дихання та транспортування іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Показники дихання мітохондрій ікри в'юна на стадіях 8-ми й 64-ох бластомерів у разі окиснення ЯК 4 ммоль практично не відрізняються. У випадку окиснення  $\alpha$ -КГ 4 ммоль виявлено достовірну різницю в диханні після додавання АДФ між МХ ікри на стадії 8-ми і 64-х бластомерів. У останніх вона більша. Дихання МХ ікринок на обох стадіях майже однакове в разі окиснення обох субстратів, проте ефективність окиснювального фосфорилування вища у випадку окиснення КГ 4 ммоль. Показники  $\text{Ca}$ -стимульованого дихання є вищими у МХ ікринок на стадії 8-ми бластомерів, аніж на стадії 64-х. У цьому випадку енергозабезпечення транспортування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у МХ на першій з цих стадій є ліпшим завдяки інтенсивнішому використанню екзогенної СК.

1. Гойда Е.А., Санагурский Д.И., Стельмах Н.С. Скорость потребления кислорода и трансмембранный потенциал при измерении темпа дробления бластомеров у вьюна // 6-е Всесоюз. совещ. эмбриологов. Тез. докл. М.: Наука, 1981. С. 37.

2. *Гойда Е.А.* Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. С. 169-173.
3. *Долиба Н.М.* Влияние ацетилхолина на транспорт ионов кальция и окисление субстратов в митохондриях печени // Тр. IV-й Всесоюз. междунивер. конф. по биологии клетки. Тбилиси: Изд-во Тбил. ун-та, 1985. Ч.1. С.251-252.
4. *Кондрашова М.Н., Андреев А.А., Бабский А.М.* и др. Реципрокные саморегулирующиеся гормонально-субстратные системы: катехоламины – сукцинат; антагонисты катехоламинов –  $\alpha$ -кетоглутарат // Тез. докл. V Всесоюзн. Биохим. съезда. М., 1986. Т. 2. С. 201–202.
5. *Кондрашова М.Н.* Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. 1991. Т. 56. Выг. 3. С. 388–404.
6. *Нейфах А.А.* Радиационная инактивация клеточных ядер как метод исследования их роли в развитии дыхания у зародышей рыб // Биохимия, 1960. Т. 25. № 4. С. 658–668.
7. Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975.
8. *Озернюк Н.Д., Звиадзе Н.Г., Пальмбах Л.Р.* Интенсивность дыхания, концентрация и распределение митохондрий во время онтогенеза данио // Изв. АН СССР. Сер. биолог. 1980. № 6. С. 941–944.
9. *Озернюк Н.Д.* Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.:Наука. 1985. С. 92–101.
10. *Шостаковская И.В., Бабский А.М.* Влияние адреналина на транспорт кальция и окислительное фосфорилирование в митохондриях// Укр. биохим. журн. 1984. Т. 54. № 1. С. 57–62.
11. *Kondrashova M.N., Goradze V.G., Medvedev B.I., Babsky A.M.* Succinic acid oxidation as the only energy support of intensive  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. Vol. 109. N 2. P. 376–381.
12. *Lowery O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J.Biol.Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P. 265–275.
13. *Zeuthen E.* Mitotic respiratory rhythms in single eggs of *Psammochinus miliaris* and *Ciona intestinalis* // Biol. Bull. 1955. Vol. 108. N 3. P. 366–385.
14. *Zeuthen E.* Cyclic in oxygen consumption in cleaving eggs // Exp. Cell. Res. 1960. Vol. 19. N 1. P. 1–6.

**OXIDATION OF SUCCINATE AND ALPHA-KETOGLUTARATE  
IN MITOCHONDRIA OF LOACH EMBRYO AT DIFFERENT  
STAGE OF CLEAVAGE****P. Khoroshyj, Yu. Stephankiv, D. Sanagurski**

*Ivan Franko National University of L'viv,  
Hrushevskoho st. 4, L'viv 79005, Ukraine,  
e-mail: piterx@mailru.com, biofiz@franko.lviv.ua*

We have study ADP- and  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated respiration of mitochondria from embryo of loach at stages 8 and 64 blastomeres. It has been shown that mitochondria of loach embryo on different stage of embryogenesis are in different energetic condition, which are characterized by different efficiency of transport Ca, oxidative phosphorylation and respiration.

*Keywords:* mitochondria, loach, substrates of Krebs cycle, mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation, embryo.

Стаття надійшла до редколегії 04.07.2001

Прийнята до друку 12.07.2001