

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ СССР

НАУЧНЫЕ
ДОКЛАДЫ
ВЫСШЕЙ
ШКОЛЫ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

№ 10 (178)

ЖУРНАЛ
ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ,
ИЗДАЕТСЯ
С 1958 г.

1978



МОСКВА ● «ВЫСШАЯ ШКОЛА»

УДК 591.05—591.5—07

БИОХИМИЯ

**ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ
 ПАМИРСКОЙ (*MICROTUS JULDASCHI JULDASCHI*)
 И АРЧЕВОЙ (*MICROTUS JULDASCHI CARRUTHERSI*)
 ПОЛЕВОК И ЕГО ИЗМЕНЕНИЕ
 В УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА**

А. П. Ястребов, Н. К. Сегаль, В. Н. Большаков

Изучали показатели энергетического метаболизма клеток тимуса, костного мозга и селезенки двух форм полевок — памирской и арчевой. При воздействии 20-минутного охлаждения (-15°C) более лабильной оказалась система энергообеспечения исследованных клеток памирской полевки, что свидетельствует о наличии у нее сформированных адаптивных реакций к действию экстремальных факторов. На основании выявленной устойчивой разницы показателей энергетического метаболизма в тканях памирской и арчевой полевок сделано предположение о существовании между ними генетических различий.

Большинство встречающихся в горах мелких млекопитающих относится либо к широко распространенным формам, заселяющим разные высотные пояса, либо к эндемичным горным видам [2]. В связи с этим можно полагать, что такие животные имеют разные метаболические характеристики, которые обусловлены неодинаковой степенью адаптации специализированных горных видов и широко распространенных форм к условиям обитания в высокогорье [19]. Таким образом, выявление различий в метаболизме может быть использовано в качестве дополнительного критерия видовой или подвидовой принадлежности мелких млекопитающих, заселяющих те или иные высотные пояса.

В настоящей статье приведены результаты изучения показателей энергетического метаболизма кроветворной ткани памирской полевки (*Microtus juldaschi juldaschi*) и арчевой полевки (*Microtus juldaschi carruthersi*). По поводу происхождения этих двух горных форм полевок мнения противоречивы. Одни исследователи [3, 14] считают, что они представляют один вид, находящийся на стадии разделения, другие [4, 9] полагают, что это два самостоятельных вида. Известно только, что обе формы полевок обитают в условиях высокогорья, хотя и в разных горных системах (памирская — на Памире, арчевая — на Тянь-Шане). Кроме того, памирская полевка заселяет большие высоты и приурочена лишь к специфическим биотопам высокогорья. Арчевая полевка более эвритопна и может спускаться до уровня 400—500 м.

Мы считаем, что если у изучаемых форм полевок имеются метаболические различия, они должны наиболее отчетливо выявляться в усло-

виях, требующих мобилизации энергетических процессов организма, например при холодом стрессе.

Особый интерес представляет метаболизм лимфатической ткани и отдельно лимфоцитов, поскольку установлено [1, 5—7, 11], что реакция лимфатической ткани на стресс является существенным фактором специфической и неспецифической резистентности организма. В связи с этим изменение функциональной активности лимфоцитов может быть одним из важных механизмов, ограничивающих адаптивные возможности организма к воздействию экстремальных факторов [16]. Нам представляется важным изучение метаболических процессов костного мозга, так как эта ткань у горных и адаптированных к гипоксии животных должна обладать высокой функциональной способностью продуцировать эритроциты, что играет существенную роль в формировании устойчивой адаптации к хроническому действию кислородной недостаточности [20].

Исследование проводили на клетках тимуса, селезенки и костного мозга.

Для определения дыхания суспензии клеток и сопряженного с ним фосфорилирования использовали полярографический метод. Изучали также реакцию клеток на действие экзогенных субстратов (30 мМ сукцината натрия) и определяли критический уровень кислорода (КУК), ограничивающий дыхание суспензии клеток;

Т а б л и ц а 1

Уровень	Натуральные независимые переменные		
	пол (x_1)	температура 20-минутного воздействия (x_2), °С	вид (x_3)
Верхний (+)	Самки	+18	Памирская полевка
Нижний (—)	Самцы	—15	Арчевая полевка

этот уровень выражает парциальное давление кислорода (в мм рт. ст.) в полярографической ячейке, при котором наблюдалось торможение дыхания. Выделение, хранение и последующую инкубацию клеток осуществляли в среде следующего состава: KCl — 5,6 мМ, NaCl — 145 мМ, Na_2HPO_4 — 5 мМ, NaH_2PO_4 — 1 мМ. Инкубацию клеток проводили в ячейке объемом 0,15 мл с закрытым платиновым электродом при температуре 37°C. Для характеристики состояния окислительного метаболизма клеток определяли следующие показатели: 1) скорость эндогенного дыхания клеток, измеряемую в наноатомах кислорода, поглощенного 1 млн. клеток за 1 мин; 2) отношение скорости дыхания в присутствии сукцината ($V_{\text{сукц}}$) к скорости эндогенного дыхания ($V_{\text{вд}}$); 3) отношение скорости дыхания в присутствии 22 мкМ 2,4-динитрофенола (ДФ) к скорости эндогенного дыхания ($\dot{V}_{\text{ДФ}} / V_{\text{вд}}$), по которому оценивали степень сопряженности дыхания и фосфорилирования; 4) долю амиталрезистентного дыхания клеток ($V_{\text{ам}}$) при концентрации амитала в ячейке 2,6 мМ.

Условия холодом стресса создавали помещением животного в холодильную камеру при —15°C на 20 мин.

Исследования выполнены на 11 памирских и 11 арчевых полевках обоего пола. Постановку опытов и обработку результатов проводили по плану полного факторного эксперимента типа 2^3 *. Отличия между исследуемыми параметрами считали достоверными, если $b_u \geq t_{0,95} S_{b_i}$ [13].

Принятый нами способ кодирования независимых переменных приведен в таблице 1.

Результаты изучения энергетического метаболизма клеток тимуса у двух форм полевок, находившихся в обычных условиях и при воздействии холодом стресса, представлены в таблице 2.

* Приносим благодарность Г. Г. Рунковой за помощь при статистической обработке полученных данных.

Анализ полученных результатов показывает, что клетки тимуса арчевых полевок более интенсивно потребляют кислород, чем клетки тимуса памирских полевок ($b_3 > t_{0,95}S_{b_i}$). Однако энергетическая эффективность дыхания клеток тимуса у арчевых полевок более низкая: сопряжение дыхания и окислительного фосфорилирования у них незначительно. Эти различия обусловлены принадлежностью к подвиду. Самый низкий показатель сопряжения отмечен у арчевых полевок (1,08 и 1,16), т. е. у животных, клетки тимуса которых имеют наиболее высокую

Т а б л и ц а 2

Кодированные независимые переменные			$V_{\text{энд}} (\hat{Y}_1)$	$V_{\text{днф}}/V_{\text{энд}} (\hat{Y}_2)$	$V_{\text{ам}}/V_{\text{днф}} (\hat{Y}_3)$	$V_{\text{сукц}}/V_{\text{энд}} (\hat{Y}_4)$	$V_{\text{ам}}/V_{\text{сукц}} (\hat{Y}_5)$
x_1	x_2	x_3					
—	—	—	3,45	1,08	0,66	1,13	0,83
+	—	—	7,22	1,08	0,66	1,13	0,80
—	+	—	3,45	1,16	0,66	1,03	0,73
+	+	—	7,22	1,16	0,66	1,03	0,69
—	—	+	1,85	1,17	0,66	1,27	0,89
+	—	+	1,88	1,17	0,66	1,27	0,88
—	+	+	1,85	1,26	0,66	1,37	0,81
+	+	+	1,88	1,26	0,66	1,37	0,59

Примечания: 1. В каждом варианте было выполнено по 22 измерения каждого параметра.

$$\begin{aligned}
 2. \quad \hat{Y}_1 &= 3,61 + 0,95x_1 - 1,73x_3 - 0,93x_1x_3, \quad t_{0,95}S_{b_i} = 0,99, \quad S^2ad = \\
 &= 0,10 < FS^2(\bar{Y}) = 4,54; \quad \hat{Y}_2 = 1,17 + 0,041x_2 + 0,046x_3, \quad t_{0,95}S_{b_i} = 0,049, \\
 S^2ad &= 0,004 < FS^2(\bar{Y}) = 0,013; \quad \hat{Y}_3 = b_u < t_{0,95}S_{b_i}, \quad t_{0,95}S_{b_i} = 0,063, \\
 S^2ad &= 0,005 < FS^2(\bar{Y}) = 0,02; \quad \hat{Y}_4 = 1,201 + 0,118x_3 + 0,048x_2x_3, \quad t_{0,95}S_{b_i} = \\
 &0,053, \quad S^2ad = 0,000 \leq FS^2(\bar{Y}) = 0,015; \quad \hat{Y}_5 = 0,780 - 0,039x_1 - 0,073x_2 - \\
 &- 0,029x_1x_2 + 0,017x_3 - 0,020x_1x_3 - 0,020x_2x_3 - 0,024x_1x_2x_3, \quad t_{0,95}S_{b_i} = \\
 &= 0,021, \quad S^2ad = 0,000 \leq FS^2(\bar{Y}) = 0,000.
 \end{aligned}$$

скорость эндогенного дыхания (3,45 и 7,22 наноатомов кислорода в расчете на 1 млн. клеток в 1 мин). Скорость потребления кислорода клетками тимуса памирских полевок существенно ниже, чем арчевых полевок. Однако степень сопряжения окисления и фосфорилирования выше на 35%, что свидетельствует о более эффективном использовании кислорода.

При добавлении сукцината натрия к суспензии дышащих клеток тимуса было отмечено, что экзогенный субстрат несколько ускоряет дыхание клеток памирских полевок, в то время как в клетках арчевых полевок дыхание практически не изменяется ($b_3 > t_{0,95}S_{b_i}$). В результате анализа значений коэффициента $V_{\text{ам}}/V_{\text{сукц}}$ было установлено, что различие между двумя формами полевок по этому показателю, отражающему долю амиталрезистентного дыхания в общем дыхании суспензии клеток, незначительно, хотя и существенно: 15% для самок и 11% для самцов (b_3 вблизи $t_{0,95}S_{b_i}$). При этом наиболее амиталчувствительными оказались клетки тимуса самцов и самок памирских полевок и самцов арчевых полевок. Полученные данные свидетельствуют о разной энергетической эффективности использования кислорода клет-

ками тимуса двух форм полевов в условиях покоя, причем более эффективным представляется энергетический аппарат памирских полевов.

Физиологически адекватное использование кислорода характерно для видов, обладающих сформированными адаптационными механизмами к гипоксии [12]. При этом реализация потенциальных энергетических мощностей наиболее отчетливо выявляется лишь в условиях активной жизнедеятельности. Так, при холодовом стрессе доля амитадрезистентного дыхания клеток тимуса обеих форм полевов возрастает ($b_2, b_{2;3} \gg t_{0,95}S_{b_i}$), однако по-разному: у арчевых полевов на 17%, у памирских на 48%. При этом изменение коэффициента происходит в первую очередь за счет самок; у самцов $V_{ам}/V_{сукп}$ изменяется при холодовом стрессе на одинаковую величину (11%). Снижение сопряженности тканевого дыхания и фосфорилирования при воздействии низких температур является важной адаптивной реакцией гомойотермных животных [17, 18]. По нашему мнению, выявленные метаболические реакции клеток тимуса памирских полевов могут указывать на более высокую степень приспособления этой формы полевов к экстремальным воздействиям.

Данные о критическом уровне кислорода, ограничивающем дыхание суспензии клеток костного мозга и селезенки, а также абсолютные величины эндогенного дыхания приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Кодированные независимые переменные			Костный мозг		Селезенка	
x_1	x_2	x_3	$V_{энд} (\hat{Y}_1)^*$	КВК (\hat{Y}_2)**	$V_{энд} (\hat{Y}_3)^{***}$	$V_{ам}/V_{ДНФ} (\hat{Y}_4)^{***}$
—	—	—	2,7	30,4	4,59	0,74
+	—	—	4,0	23,8	4,59	0,74
—	+	—	3,9	25,3	4,59	0,74
+	+	—	5,3	22,8	4,59	0,74
—	—	+	1,3	22,8	3,27	0,74
+	—	+	2,7	15,3	3,27	0,74
—	+	+	2,5	23,8	3,27	0,74
+	+	+	3,9	30,4	3,27	0,74

Примечания: 1. Знаками сноски отмечено количество измерений каждого параметра: одним—17 измерений, двумя—16, тремя—18. 2. $\hat{Y}_1 = 3,29 + 0,67x_1 +$

$$+ 0,60x_2 - 0,60x_3, t_{0,95}S_{b_i} = 0,51, S^2_{ad} = 0,33 < FS^2(\bar{Y}) = 1,20; \hat{Y}_2 = 22,89 + 3,27x_1x_2 + 4,27x_2x_3, t_{0,95}S_{b_i} = 3,03, S^2_{ad} = 27,7 < FS^2(\bar{Y}) = 51,1; \hat{Y}_3 = 3,93 - 0,66x_3, t_{0,95}S_{b_i} = 0,65.$$

Анализ данных, полученных при изучении клеток костного мозга, показывает, что адаптивная реакция на холодовый стресс сформирована у памирских полевов не только в клетках тимуса. Скорость поглощения кислорода клетками костного мозга памирских полевов оказалась ниже, чем у арчевых полевов. Наиболее четкая ответная реакция на холодовый стресс по этому показателю наблюдается у памирских полевов (снижение скорости эндогенного дыхания самками в 1,45 раза и самцами в 1,92 раза; $b_i, b_2, b_3 > t_{0,95}S_{b_i}$). Если учесть особенности метаболизма костного мозга в условиях стресса, то снижение скорости поглощения кислорода суспензией клеток костного мозга в ответ на охлаждение животного можно расценить как реакцию адаптивную, поскольку она может быть связана с более эффективным использованием кислорода [20].

В пользу этого свидетельствует определение критического уровня кислорода. Было установлено, что в ответ на холодовый стресс КУК для клеток костного мозга памирских полевков снижается ($b_{1;2}, b_{2;3} > t_{0,95} S_{b_i}$). Следует подчеркнуть, что для клеток костного мозга арчевых полевков КУК либо не изменяется (у самок), либо, наоборот, повышается (у самцов), что характеризует срыв адаптации. Тот факт, что критический уровень кислорода, ограничивающий дыхание, снижается, указывает на способность клеток костного мозга максимально использовать кислород при низких его концентрациях в тканях. Эта способность является важным признаком адаптации ткани к экстремальным воздействиям вообще и к кислородной недостаточности в частности [8, 10].

При изучении показателей энергетического метаболизма кроветворной ткани при холодовом стрессе у белых лабораторных мышей не были выявлены достоверные изменения по сравнению с контролем. Это еще раз подтверждает высказанное нами предположение о том, что быстрая реакция энергетического аппарата тканей на холодовый стресс почти целиком зависит от предшествующей адаптации организма к действию экстремальных факторов.

Интересно, что клетки селезенки не воспроизводят полностью тех изменений окислительного метаболизма на действие холодового стресса, которые выявляются в клетках тимуса и костного мозга (табл. 3). Однако и в этих клетках выявлен различный уровень энергетического метаболизма у двух форм полевков и особенности реакции на холодовый стресс ($b_3 > t_{0,95} S_{b_i}$). Вероятно, более высокая устойчивость к амиталу ($V_{ам}/V_{днф}$) клеток селезенки, по сравнению с тимоцитами обусловлена наличием в ней В-клеток, процессы дыхания и фосфорилирования в которых частично разобщены [15].

На основании проведенных исследований можно полагать, что памирские полевки более приспособлены к условиям высокогорья и воздействиям стрессорных факторов. Однако сделать окончательное заключение о генезе повышенной устойчивости к экстремальным факторам у указанных форм полевков не представляется возможным. Между тем, принимая во внимание устойчивую разницу исходного метаболического состояния в тканях памирских и арчевых полевков, нельзя исключить существующие между ними генетические различия.

Литература

1. Бернет Ф. Клеточная иммунология. М., Мир, 1971.
2. Большаков В. Н. Пути приспособления мелких млекопитающих к горным условиям. М., Наука, 1972.
3. Большаков В. Н., Россоломо О. Л., Покровский А. В. Систематический статус памиро-алтайских полевков группы *Microtus juldaschi* (Mammalia, Cricetidae). — Зоол. журн. 1969, т. 48, вып. 7.
4. Виноградов Б. С., Павловский Е. И., Флеров К. К. Звери Таджикистана. М.—Л., 1935.
5. Горизонтов П. Д. Стресс и реакция органов кроветворения. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1974, № 2.
6. Горизонтов П. Д. Роль симпатической нервной системы в ранних неспецифических реакциях кроветворных органов. — Патол. физиология и эксперим. терапия., 1975, № 3.
7. Горизонтов П. Д. Лимфоидная ткань и неспецифическая резистентность организма. — Арх. патологии, 1976, т. 38, вып. 3.
8. Гринберг Л. Н. Регуляция дыхания митохондрий кислородом. — В сб.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., Наука, 1973.
9. Громов И. М. Грызуны. — В кн.: Млекопитающие фауны СССР. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1963.
10. Коваленко Е. А. О теории динамики газов в организме. — В сб.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., Наука, 1973.

11. Линг Н. Р. Стимуляция лимфоцитов. М., Медицина, 1971.
12. Меерсон Ф. З. Общий механизм адаптации и профилактики. М., Медицина, 1973.
13. Налимов В. В., Чернова Н. А. Статистические методы планирования экстремальных экспериментов. М., Наука, 1965.
14. Покровский А. В., Гилева Э. А., Ищенко В. Г. Экспериментальное исследование памирской и арчевой полевок и их гибридов. — Тр. Ин-та экологии растений и животных Уральск. науч. центра АН СССР, 1973, вып. 86.
15. Сегаль Н. К. О различии реакций Т- и В-лимфоцитов на воздействия экстремальных факторов. — В сб.: Материалы конференции гематологов. В печати.
16. Сегаль Н. К., Ястребов А. П. Метаболическая активность лимфоцитов в реактивности организма в условиях экстремальных воздействий. — В сб.: Вопросы гомеостаза и реактивности при аллергии. Свердловск, 1975.
17. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., Наука, 1972.
18. Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду. Новосибирск, 1975.
19. Шварц С. С., Большаков В. Н., Пястолова О. А. Новые данные о различных путях приспособления животных к изменению среды обитания. — Зоол. журн., 1964, т. 43, вып. 4.
20. Ястребов А. П. О связи эритропоза с окислительным обменом костного мозга. — Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1971, № 2.

Рекомендована кафедрой патологической физиологии Свердловского медицинского института

Поступила
30 марта 1978 г.