

В. В. ХАСКИН, И. Н. СИНДАРОВСКАЯ

**ТЕРМОКИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ АТФ НА ИНТАКТНЫЕ
МЫШЕЧНЫЕ ВОЛОКНА КРЫС, АДАПТИРОВАННЫХ
К РАЗНЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 5 VI 1970)

Длительное воздействие низкой температуры на организм гомеотермного животного приводит к приспособительным изменениям энергетики скелетных мышц. Эти изменения в общем направлены на повышение физиологической эффективности теплообразования и выражаются в увеличении теплопродукции, приходящейся на элементарный сократительный акт⁽¹⁾. Известные биохимические данные о влиянии холодовой адаптации на окислительные процессы в мышцах⁽²⁻⁴⁾ позволяют предполагать, что указанное увеличение происходит преимущественно за счет теплоты восстановительной фазы цикла мышечной деятельности и, в меньшей степени, за счет теплопродукции покоя. Прямая количественная проверка этого предположения, а также оценка возможных изменений начальной теплоты сокращения сильно затруднены, так как существующие методы калориметрии изолированных мышц⁽⁵⁻⁸⁾ не могут быть в желаемой мере использованы для исследования мышц теплокровных животных. Вместе с тем существует весьма ценный опыт применения микрокалориметрической техники для измерения энталпии биохимических, в частности окислительных, реакций⁽⁹⁻¹²⁾.

Нами предпринята попытка охарактеризовать адаптационные изменения теплообразования в мышцах с помощью калориметрии суспензии интактных мышечных волокон. В качестве средства частичного воспроизведения энергетического цикла возбуждения мышцы использовалось добавление АТФ. Примененный в этих экспериментах дифференциальный микрокалориметр — респиrometer позволяет одновременно регистрировать мощность тепловыделения и потребление кислорода небольшим количеством измельченной ткани. Конструкция ячеек предусматривает возможность добавления к инкубируемой смеси различных веществ в ходе опыта.

Использовали мышечную ткань взрослых самцов белых крыс, предварительно акклиматизированных при низкой температуре (+4—+6°) и при комнатной температуре (20—22°) в течение 6 недель. После декапитации у животных препарировали глубокую часть *m. quadriceps*, состоящую преимущественно из «красных» медленных волокон. Ткань измельчали в охлаждаемой миниатюрной мясорубке (диаметр отверстий решетки 0,8 мм) и навеску кашицы 150 мг вносили в ячейку прибора. Инкубационная среда (2,5 мл) содержала 230 μM NaCl, 16 μM KCl, 4 μM MgCl₂, 6 μM K₂HPO₄, 8 μM глюкозы и 50 μM α -кетоглутарата; pH 7,4. В нескольких опытах этот состав дополняли 2 μM ЭДТА. Температура инкубации 25°, продолжительность опытов 90 мин., отсчеты потребления кислорода — каждые 5 мин. В части опытов через 30 мин. после начала регистрации в ячейку вносили 0,4 мл 0,02 M раствора АТФ-Na, т. е. всего 8 μM .

На основе полученных термограмм строили термокинетические кривые, отражающие действительную динамику мощности тепловыделения W во времени:

$$W = W' + \tau dW / dt,$$

где W' — записанная мощность, τ — постоянная времени калориметра ($\tau = 350$ сек). Для оценки общего количества теплоты Q , выделившейся за время опыта (между моментами t и t'), измеряли площадь термограммы между осью экспериментального нуля прибора и записанной кривой мощности:

$$Q'_t = \int_t^{t'} W'(t) dt.$$

Объем потребленного за то же время кислорода V_{O_2} определяли аналогичным образом:

$$V_{O_2} = k \int_t^t \Delta p(t) dt,$$

где k — манометрическая константа прибора; Δp — изменения давления (отсчеты по манометру). Наконец, величины Q и V_{O_2} использовали для расчета калорического эквивалента кислорода $E = Q/V_{O_2}$.

На рис. 1 представлены графики влияния АТФ на дыхание и теплопродукцию мышечной ткани крыс *in vitro*. Постепенное ослабление фоновой метаболической активности (кривые AB и ab) — обычно наблюдаемое в сходных условиях явление, связанное с медленной инактивацией окислительной системы клеток. Добавление АТФ приводит к резкому увеличению теплопродукции. Термокинетические кривые показывают, что это увеличение имеет фазный характер: в первые минуты наблюдается сильная вспышка тепловыделения, затем W резко снижается, но остается заметно выше фонового уровня, сначала приближаясь (10—30 мин. после прибавления АТФ), а затем изменяясь практически параллельно ему. Прирост интенсивности дыхания происходит более плавно, не обнаруживая начальной вспышки. Действие высокой концентрации АТФ на интактные мышечные волокна многообразно, и, конечно, вызванное АТФ увеличение теплопродукции имеет многокомпонентную природу. Однако главную роль, очевидно, играют два процесса: реакция гидролиза АТФ под действием мышечных АТФаз и активации окисления со стороны механизма дыхательного контроля. Не исключено, что начальная вспышка тепловыделения относится к хорошо изученной «начальной вспышке» отщепления концевой фосфата миофибриллярной АТФазой — процессу образования и распада фосфомозина (¹³). Такая принадлежность косвенно подтверждается тем, что присутствие в среде инкубации ЭДТА резко изменяет термокинетику реакции, вызывая почти полное гашение начальной вспышки (рис. 2). В специальных опытах, воспроизводящих условия главного эксперимента,

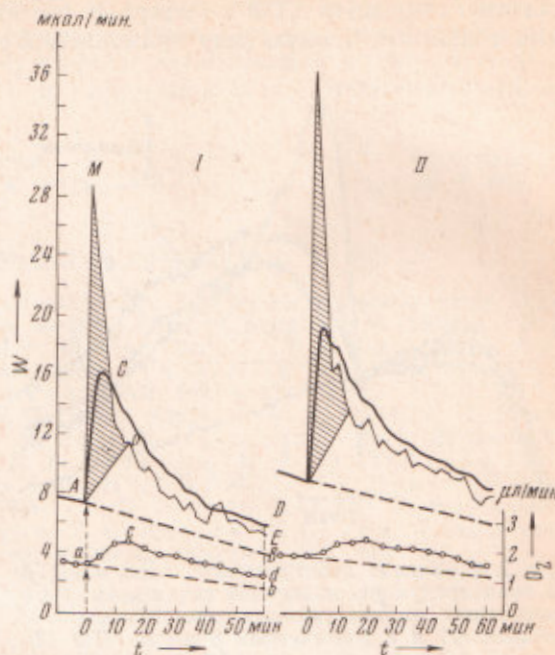


Рис. 1. Действие АТФ на дыхание и теплопродукцию мышечной ткани крыс, адаптированных к комнатной температуре (I) и холоду (II). Усредненные графики, полученные на основании 6 опытов без АТФ и 6 опытов с применением АТФ для каждой группы животных. AB и ab — соответственно графики теплопродукции и потребления O_2 в опытах без добавления АТФ; ACD и acd — зарегистрированные кривые теплопродукции и потребления O_2 после добавления АТФ; $AMPE$ — построенные термокинетические кривые влияния добавленной АТФ; заштрихованные площади $AMPA$ соответствуют энthalпии гидролиза АТФ вместе с теплотами диссоциации и нейтрализации. Момент введения АТФ обозначен стрелками

было найдено, что практически все количество конечного фосфата отщепляется от добавленной АТФ в течение первых 15—20 мин.

В последнее время существенно уточнены условия, влияющие на энтропию гидролиза АТФ в буферных системах (¹⁴, ¹⁵). Учитывая эти данные и зная рН, ионную силу применяемой среды инкубации, а также концентрацию в ней Mg^{2+} и HPO_4^{2-} , мы определили вероятную величину суммарной теплоты гидролиза АТФ в наших опытах, включая теплоты диссоциации и нейтрализации, — 16,3 ккал/моль.

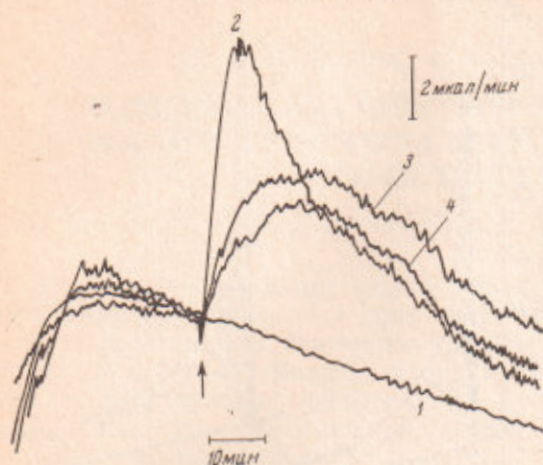


Рис. 2. Сравнение действия АТФ, АДФ и ЭДТА на теплопродукцию мышечной ткани крыс. 4 совмещенных индивидуальных термограммы: без добавок (1) и с добавлением 8 μ мол. АТФ (2), 8 μ мол. АДФ (3), 8 μ мол. АТФ, введенных на фоне инкубационной среды, содержащей 2 μ моли ЭДТА (4)

В расчете на добавляемое количество АТФ (8 μ мол.) это составляет 130 мкал. На рис. 1 площади, соответствующие этому количеству теплоты, заштрихованы. Остальное количество, выделившееся после добавления АТФ, очевидно, должно быть отнесено за счет усиления дыхания. Следует отметить, что в системе, содержащей интактные клетки, вероятно, маскирует эффект торможения митохондриального окисления под влиянием экзогенной АТФ, так как ее концентрация быстро снижается, а увеличение

концентрации АДФ приводит к стимуляции дыхания. Заменяя АТФ на АДФ, нам удалось получить термограмму, хорошо согласующуюся с приростом дыхания и не содержащую начальной вспышки теплопродукции (рис. 2). Таким образом, картина стимуляции теплопродукции аденозинтрифосфатом сходна с динамикой теплообразования при мышечном сокращении, хотя и имеет другую временную характеристику.

Переходя к сравнению калориметрических данных, относящихся к животным двух изученных групп (рис. 1), следует иметь в виду, что фоновый уровень теплопродукции мышечной ткани (опыты без АТФ) при холодной адаптации заметно возрастает: в расчете на 150 мг ткани за час он составляет у животных, адаптированных к комнатной температуре, 342 ± 10 мкал, а у животных, адаптированных к холоду, 448 ± 12 мкал ($p < 0,01$). Соответственные уровни потребления кислорода: 69 ± 6 и 89 ± 8 μ л ($0,05 < p < 0,1$). Величины калорического эквивалента кислорода в обоих случаях приблизительно равны 5 кал/мл. Добавление АТФ сильнее действует на теплопродукцию клеток животных, адаптированных к холоду; это касается как максимума тепловой мощности при начальной вспышке, так и общего количества дополнительно образующегося тепла: 231 ± 17 мкал для ткани животных «теплой» группы и 298 ± 21 мкал для ткани крыс, адаптированных к холоду ($p < 0,05$). Если из этих количеств вычтеть полную теплоту гидролиза добавленной АТФ (вместе с теплотами диссоциации и нейтрализации), равную 130 мкал, то получим соответственно 101 и 168 мкал тепла, связанного с активацией метаболизма. Однако прирост потребления кислорода тканью животных обеих групп одинаков: (в том же порядке) 34 ± 4 и 33 ± 3 μ л. Поэтому калорический эквивалент кислорода для стимулированной теплопродукции ткани животных, адаптированных к комнатной температуре, равен $3,0 \pm 0,6$, а у животных, адаптированных к холоду, $5,1 \pm 0,4$ кал/мл ($p < 0,05$). Природа

этого различия требует специального изучения. Возможно, что оно связано с повышенным уровнем нефосфорилирующего окисления и относительно меньшим влиянием дыхательного контроля на утилизацию наиболее калорийных субстратов в мышцах животных, адаптированных к холоду. Во всяком случае, холодовая адаптация повышает уровень «отставленного» теплообразования при возбужденном метаболизме в мышце не только благодаря усилению клеточного дыхания, но и за счет повышения его калорийческой эффективности.

Институт физиологии
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
29 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. П. Иванов, Е. Я. Ткаченко, М. Я. Якименко, Физиол. журн. СССР, 6, № 10 (1970). ² J. P. Hannon, *Federat. Proc.*, 19, Suppl. 5, 139 (1960). ³ R. E. Smith, D. J. Hoijer, *Physiol. Rev.*, 42, 1, 60 (1962). ⁴ В. П. Скулачев, Аккумуляция энергии в клетке, «Наука», 1969. ⁵ A. V. Hill, *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 103, 721, 117 (1928). ⁶ И. А. Ломов, ДАН, 169, 1, 223 (1966). ⁷ J. T. Fales, K. L. Zierler, *J. Appl. Physiol.*, 22, 1, 180 (1967). ⁸ D. R. Wilkie, *J. Physiol. (London)*, 195, 1, 157 (1968). ⁹ M. Ros, H. Gutfreund, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 122, 1, 204 (1967). ¹⁰ Л. А. Пирузян, М. А. Розенфельд, И. А. Максимова, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 699 (1967). ¹¹ P. Monk, I. Wadso, *Acta chem. scand.*, 22, 6, 1842 (1968). ¹² В. А. Энгельгард, Вестн. АН СССР, № 5, 25 (1969). ¹³ Ю. Тономура, Т. Канасава, К. Секия, В кн.: Молекулярная биология. Проблемы и перспективы, «Наука», 1964, стр. 213. ¹⁴ R. A. Alberty, *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 14, 3899 (1969). ¹⁵ R. C. Phillips, P. George, R. J. Putman, *J. Biol. Chem.*, 244, 12, 3330 (1969).