

Л. С. Орличенко, Н. Н. Береговская, А. Я. Литошенко

**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ И мтДНК
ВО ФРАКЦИЯХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС**

Во фракциях митохондрий печени крыс разного возраста (молодые — 3—4 месяца, взрослые — 6—8 месяцев, старые — 24—26 месяцев) определяли количество мтДНК и белков, кодируемых мтДНК и яДНК. Три фракции митохондрий с различными константами седиментации отличаются содержанием и соотношением мтДНК и белков. Такие же изменения наблюдаются с возрастом в каждой фракции митохондрий. У старых крыс они выражены больше, чем у взрослых. С возрастом также неравномерно изменяется абсолютное и относительное содержание фракций в единице массы печени. Обсуждаются механизмы, нарушающие координацию процессов репликации и экспрессии митохондриального генома.

Введение. Универсальной характеристикой процесса старения является снижение интенсивности энергетического обмена [1—3]. Основная роль в таком обмене в клетках эукариот принадлежит митохондриям — генетически полуавтономным органеллам, биогенез которых контролируется как ядерным, так и митохондриальным геномами. Митохондриальная ДНК (мтДНК) кодирует 13 полипептидов, синтезирующихся на миторибосомах и являющихся субъединицами дыхательной цепи и АТФазного комплекса внутренней мембраны митохондрий. Все остальные белки внутренней и наружной мембран, межмембранного пространства и матрикса митохондрий кодируются ядерной ДНК (яДНК), синтезируются на циторибосомах и транслируются в митохондрии [4]. Митохондрии в клетке не формируются *de novo*, а образуются за счет деления предсуществующих органелл [5]. Их количество и морфология зависят от функциональных особенностей клетки [6], причем количество органелл прямо пропорционально уровню ее энергетического обмена [7]. Величина популяции митохондрий в клетке является производной двух противоположно направленных и одновременно протекающих процессов — биогенеза и дегенерации органелл. Это обстоятельство обуславливает также гетерогенность популяции митохондрий по их структурным и функциональным характеристикам.

Предполагается, что митохондриям принадлежит триггерная роль в механизмах старения клеток эукариот [8], и эти механизмы в первую очередь реализуются в самих митохондриях. Было показано, что при старении снижаются энергетические потенциалы митохондрий [3], замедляется скорость синтеза и обновления митохондриальных белков и мтДНК [9—11], уменьшается количество митохондрий в клетке и увеличиваются их размеры [12]. Большинство подобных исследований выполнено на клетках печени, что облегчает сопоставление полученных результатов. Однако остается невыясненным, присущи ли возрастные сдвиги всем митохондриям в равной мере или с возрастом изменяется соотношение митохондрий, отличающихся по своим структурно-функциональным свойствам.

Большая часть количественных структурных и функциональных характеристик митохондрий представляет собой непрерывно распределенный признак в популяции этих органелл в клетке. Поэтому митохондрии можно разделить на условные фракции, ограниченные заданными величинами того или иного признака. Наиболее распространенным подходом в этом отношении является разделение популяции митохондрий на отдельные фракции по величине константы их седиментации. Показано, что разделенные по этому признаку фракции митохондрий отличаются активностью ряда ферментов, величиной мембранного потенциала, содержанием цитохромов, скоростью дыхания и окислительного фосфорилирования, содержанием ДНК и белка и т. д. [5, 13—15].

Вышеизложенное обусловило цель настоящей работы — изучить фракции митохондрий клеток печени крыс разного возраста в отношении содержания в них белков и мтДНК как показателей возрастных особенностей биогенеза этих органелл.

Материалы и методы. В работе использованы белые крысы-самки линии Вистар трех возрастных групп: 3—4 месяца (молодые), 6—8 месяцев (взрослые) и 24—26 месяцев (старые). Митохондрии из печени животных выделяли методом дифференциального центрифугирования. Все манипуляции проводили при 4 °С. Свежевыделенную печень продавливали через печеночный пресс и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттера в буфере, содержащем сахарозу (0,03 М трис-НСl, рН 8,0, 0,25 М сахароза, 0,001 М ЭДТА). Ядра и обломки клеток осаждали центрифугированием гомогената при 2000 g в течение 10 мин. Из супернатанта последовательно осаждали фракции тяжелых (4000 g, 10 мин), средних (7000 g, 10 мин) и легких (12 000 g, 10 мин) митохондрий. Из митохондрий выделяли белки, кодируемые мтДНК, по специально разработанному для этого методу [16] и определяли как их содержание, так и содержание тотальных митохондриальных белков по [17]. Содержание митохондриальных белков, кодируемых яДНК, вычисляли по разнице концентраций тотальных и кодируемых мтДНК белков; мтДНК — по [18].

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики с применением критерия Стьюдента. Каждая числовая величина представляет собой среднюю арифметическую ± квадратическую ошибку средней, полученную в 8—22 независимых экспериментах. Различия рассматривались как статистически значимые, если их вероятность была более 95 % ($p < 0,05$); вероятность 90—95 % ($p < 0,1$) принималась за статистическую тенденцию к различиям.

Результаты и обсуждение. Об обеспеченности тканей и клеток митохондриями принято судить по содержанию тотальных митохондриальных белков. Из данных табл. I видно, что в печени молодых и взрослых крыс суммарное содержание тотальных митохондриальных белков одинаково, тогда как у старых крыс этот показатель статистически значимо ниже, чем у молодых, и проявляет тенденцию к снижению по сравнению со взрослыми. Однако во фракциях митохондрий содержание тотальных белков, которое может рассматриваться как содержание самих фракций, характеризуется возрастной динамикой, отличающейся от таковой суммарной популяции митохондрий. У взрослых животных почти вдвое по сравнению с молодыми уменьшается содержание фракции легких митохондрий, тогда как содержание фракций тяжелых и средних митохондрий достоверно не изменяется. У старых крыс достоверно уменьшается содержание тяжелой и средней фракций и обнаруживается тенденция к увеличению легкой фракции при сравнении со взрослыми животными; однако эта тенденция не ведет к нивелированию различий в содержании легкой фракции между старыми и молодыми крысами.

Таким образом, содержание (масса) митохондрий в клетках печени уменьшается лишь при старении, что соответствует результатам цитоморфологических исследований [12]. В основе этого явления лежит не монотонное возрастное снижение содержания всех митохондриальных фракций в одинаковой мере, а изменения носят более сложный характер, что проявляется в неравномерности возрастных сдвигов и относительного содержания фракций митохондрий (рис. 1). Видно, что вся популяция митохондрий печени молодых крыс распределена почти равномерно между тремя фракциями. В печени взрослых животных это соотношение резко меняется: достоверно увеличивается доля тяжелых митохондрий и уменьшается — легких. В связи с тем, что количество легких митохондрий служит показателем скорости роста популяции этих органелл [5, 13], уменьшение этой фракции в клетках печени взрослых крыс может рассматриваться как свидетельство снижения скорости образования митохондрий. Действительно, у взрослых крыс

3—4	9,08±0,75	7,86±0,59	6,26±0,47	22,89±1,10	2,28±0,25	1,38±0,16	0,49±0,09	4,35±0,37	6,88±0,90	6,30±0,52	5,99±0,59	19,20±1,29
6—8	10,56±0,76	8,34±0,70	3,77±0,42	22,72±1,38	2,37±0,21	0,78±0,08	0,57±0,06	3,78±0,28	8,37±0,66	8,78±0,37	3,38±0,49	19,82±1,68
p ₂₋₁	—	—	<0,001	—	—	<0,01	—	—	—	<0,001	<0,01	—
24—26	8,02±0,50	6,41±0,54	4,73±0,33	19,42±1,01	1,73±0,19	0,44±0,06	0,59±0,11	2,76±0,26	6,26±0,59	5,95±0,50	4,23±0,35	16,58±1,09
p ₃₋₁	—	<0,1	<0,05	<0,05	<0,1	<0,001	—	<0,01	—	—	<0,02	—
p ₃₋₂	<0,01	<0,05	<0,1	<0,1	<0,05	<0,01	—	<0,02	<0,05	<0,001	—	—

Примечание. Здесь и далее — Т, С и Л обозначают соответственно тяжелую, среднюю и легкую фракции митохондрий; цифры в подстрочном индексе при р отвечают значениям вероятности различий для молодых (1), взрослых (2) и старых (3) животных.

Таблица 2
Содержание мтДНК во фракциях митохондрий печени крыс разного возраста

Возраст (месяцы) и показатель вероятности различий (р)	мтДНК							
	мкг/г ткани				мкг/мг totalных белков митохондрий			
	Т	С	Л	Сумма	Т	С	Л	Сумма
3—4	6,86±0,46	2,99±0,24	2,46±0,22	12,20±0,57	0,93±0,18	0,38±0,06	0,44±0,06	0,57±0,04
6—8	6,12±0,44	3,77±0,38	1,71±0,12	11,21±0,68	0,63±0,06	0,61±0,11	0,59±0,09	0,57±0,06
p ₂₋₁	—	<0,1	<0,01	—	—	<0,1	—	—
24—26	8,25±0,61	3,18±0,19	3,06±0,33	14,69±0,79	1,05±0,11	0,61±0,06	0,69±0,16	0,78±0,04
p ₃₋₁	<0,1	—	—	<0,02	—	<0,02	—	<0,01
p ₃₋₂	<0,01	—	<0,001	<0,01	<0,01	—	—	<0,01

скорость увеличения массы печени ниже, чем у молодых [19], и поэтому скорость образования митохондрий, обеспечивающего их количество, прямо пропорциональное размеру клеток [20], должна снижаться. При этом необходимая для энергообеспечения функций клетки митохондриальная масса может поддерживаться на соответствующем уровне не столько за счет возрастания числа, сколько благодаря увеличению размеров имеющихся органелл, чем, по-видимому, и объясняется рост относительного содержания фракции тяжелых митохондрий. В печени старых крыс на фоне уменьшения содержания тотальных митохондриальных белков во всей популяции и неоднозначных изменений

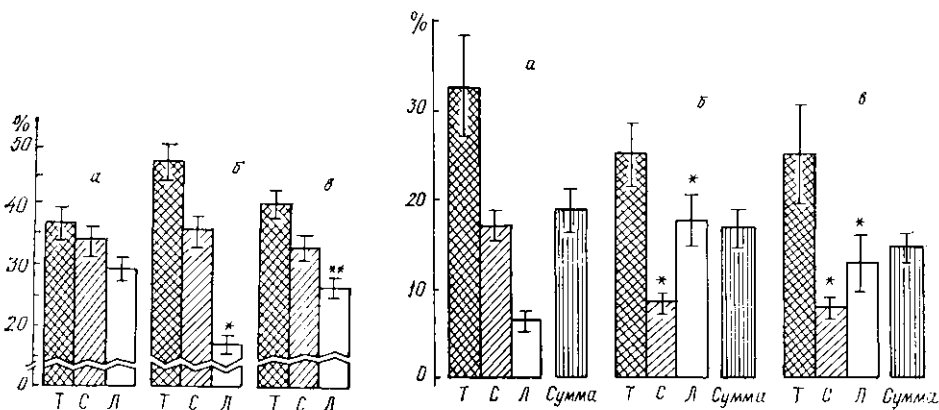


Рис. 1. Относительное (%) содержание тяжелой (Т), средней (С) и легкой (Л) фракций митохондрий в печени крыс разного возраста: а — молодые (3—4 месяца); б — взрослые (6—8 месяцев); в — старые (24—26 месяцев) крысы; *—*** — статистически значимые различия по сравнению с молодыми и взрослыми крысами соответственно

Рис. 2. Доля (%) кодируемых мтДНК белков в тотальных белках суммарной популяции митохондрий и их тяжелой (Т), средней (С) и легкой (Л) фракций печени крыс разного возраста: а — в — см. рис. 1; * — статистически значимые различия по сравнению с молодыми крысами

во фракциях митохондрий распределение фракций, т. е. относительное их содержание, приближается к таковому у молодых крыс, вследствие чего различия этого параметра между молодыми и старыми крысами нивелируются (см. рис. 1). Однако это не значит, что рост и воспроизведение митохондрий в печени старых крыс характеризуются теми же особенностями, что и у молодых животных. Об этом свидетельствуют возрастные изменения содержания содержания в митохондриях белков, кодируемых мтДНК и яДНК, и мтДНК.

Из данных табл. 1 видно, что уже ко взрослому возрасту изменения содержания кодируемых мтДНК и яДНК белков обнаруживаются во фракциях средних и легких митохондрий. Во фракции средних митохондрий содержание кодируемых мтДНК белков снижается, тогда как содержание белков, кодируемых яДНК, повышается, хотя ни абсолютное, ни относительное (см. рис. 1) содержание этой фракции в единице массы печени не изменяется по сравнению с молодыми крысами. Кроме того, у взрослых животных во фракции легких митохондрий снижается содержание белков, кодируемых ядерным геномом, что, по-видимому, лежит в основе резкого абсолютного и относительного уменьшения содержания этой фракции (см. табл. 1 и рис. 1).

Еще более выраженные изменения отмечаются во всех фракциях и в суммарной популяции митохондрий печени старых крыс. Содержание кодируемых мтДНК белков уменьшается в суммарной популяции митохондрий и во фракции средних митохондрий по сравнению как с молодыми, так и взрослыми крысами; во фракции тяжелых митохондрий содержание этих белков достоверно ниже, чем у взрослых, и проявляет тенденцию к снижению по сравнению с молодыми. При этом

содержание белков, кодируемых яДНК, во фракциях тяжелых и средних митохондрий у старых крыс снижено по сравнению со взрослыми, а во фракции легких митохондрий — по сравнению с молодыми крысами (см. табл. 1).

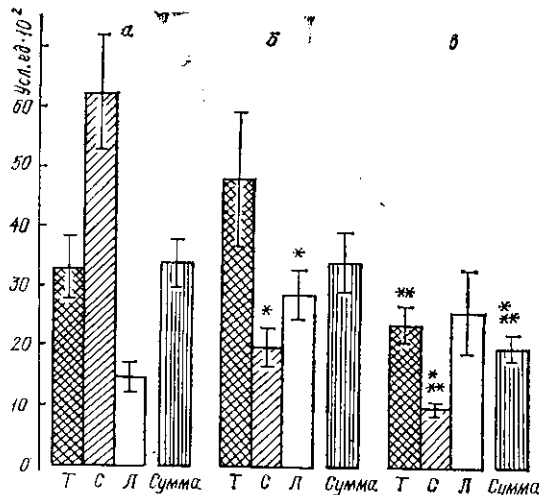
Эти неоднозначные, а в некоторых случаях и разнонаправленные возрастные изменения содержания митохондриальных белков, кодируемых ядерным и митохондриальным геномами, ведут не только к сдвигам абсолютного и относительного содержания митохондриальных фракций, но и к качественным изменениям. Так, из данных, приведенных на рис. 2, видно, что в суммарной популяции митохондрий доля кодируемых мтДНК белков в тотальных митохондриальных белках практически одинакова во всех исследованных возрастных группах крыс и соответствует по величине данным других исследователей [13, 21]. Однако в отдельных митохондриальных фракциях величина этого показателя существенно различается. Эти отличия в наибольшей степени выражены у молодых животных, у которых доля кодируемых мтДНК белков в тотальных белках митохондрий максимальна в органеллах тяжелой фракции и минимальна — в митохондриях легкой фракции. С возрастом величина этого параметра во фракции тяжелых митохондрий практически не меняется, во фракции средних митохондрий существенно снижается, а во фракции легких — повышается ко взрослому возрасту и сохраняется на уровне взрослых крыс в старости. Таким образом, в печени взрослых и старых крыс среднюю и легкую фракции составляют митохондрии, качественно отличающиеся от органелл этих же фракций в печени молодых крыс. Эти данные свидетельствуют о том, что в процессе постнатального онтогенеза крыс происходят изменения соотношения не только фракций митохондрий печени, но и белкового состава самих фракций и, следовательно, функций составляющих их митохондрий. Изменения белкового состава фракций завершаются ко взрослому возрасту и сохраняются в старости (см. рис. 2). Однако по соотношению этих измененных фракций старые крысы отличаются от взрослых и, что самое главное, при старении в единице массы печени уменьшается как вся митохондриальная популяция, так и содержание белков, кодируемых мтДНК (см. табл. 1). В связи с тем, что эти белки в составе комплексов внутренней митохондриальной мембраны осуществляют не только реакции окислительного фосфорилирования, но и функции «якорей» при сборке этих комплексов из пептидных субъединиц митохондриального и ядерно-цитоплазматического генома [22], можно полагать, что снижение энергетического обеспечения функций клеток при старении детерминировано дефицитом белков, кодируемых мтДНК.

Одной из причин снижения при старении содержания кодируемых мтДНК белков может быть уменьшение содержания самой мтДНК. Это предположение носит не только умозрительный характер, но и основывается на результатах экспериментов, в которых показано падение концентрации мтДНК при старении в клетках дрозофилы [23], в мозге мышей [24], в печени крыс [25, 26]. Однако данные, полученные в настоящем исследовании, не подтверждают этого предположения и не соответствуют результатам вышеназванных работ. Содержание мтДНК во всей популяции митохондрий, рассчитанное как на единицу массы печени, так и на единицу массы органелл, у взрослых животных не отличается от молодых, а у старых достоверно увеличивается (табл. 2). При этом в отдельных митохондриальных фракциях происходящие и у взрослых, и у старых крыс изменения носят разнонаправленный характер, отмечавшийся и при определении содержания митохондриальных белков.

Выраженное несоответствие возрастной динамики содержания кодируемых мтДНК белков и мтДНК в печени крыс явилось предпосылкой для оценки возрастных особенностей экспрессии митохондриального генома. Критерием здесь может служить величина отношения содержания кодируемых мтДНК белков к содержанию мтДНК (коэффи-

циент экспрессии мтДНК). Эта величина прямо пропорциональна функциональной активности органелл, т. е. генерированию энергии, и обратно пропорциональна репликативной активности митохондрий. Полиплотность митохондрий (6—10 молекул мтДНК на органеллу) позволяет большинству из них реализовать одновременно обе активности. Поэтому величина коэффициента экспрессии как на уровне отдельной митохондрии, так и на уровне фракции или всей популяции органелл отражает соотношение экспрессирующихся и реплицирующихся в данный момент молекул мтДНК.

Из данных рис. 3 видно, что, во-первых, внутри каждой из возрастных групп животных фракции митохондрий существенно отличаются по



этому коэффициенту и, во-вторых, коэффициент экспрессии с возрастом значительно изменяется как во всей популяции митохондрий, так и в отдельных их фракциях. У молодых животных наиболее высокий уровень экспрессии мито-

Рис. 3. Коэффициент экспрессии мтДНК, рассчитанный как отношение содержания кодируемых мтДНК белков к содержанию мтДНК в суммарной популяции митохондрий и их тяжелой (Т), средней (С) и легкой (Л) фракциях печени крыс разного возраста: а—в и др. обозначения см. рис. 1

хондриального генома отмечается во фракции средних митохондрий. По-видимому, в печени молодых крыс органеллы этой фракции выполняют преимущественно энергетическую функцию, тогда как основная функция легких и тяжелых митохондрий — рост и воспроизведение. Из сопоставления этих данных с результатами определения содержания мтДНК в митохондриях (см. табл. 2) следует, что органеллы легкой фракции лишь начинают амплифицировать мтДНК, тогда как митохондрии тяжелой фракции готовы к делению.

В печени взрослых крыс различия величины коэффициента экспрессии во фракциях митохондрий выражены в меньшей степени, чем у молодых. Вероятно, у взрослых животных в связи с замедлением роста печени фракции митохондрий становятся менее специализированными в функциональном отношении. Наибольшей величиной коэффициента экспрессии характеризуется у них фракция тяжелых митохондрий, т. е. функция энергетического обеспечения клеток печени у взрослых крыс ложится главным образом на эту фракцию, составляющую около половины всей митохондриальной массы (см. рис. 1). При этом величина коэффициента экспрессии во фракции средних митохондрий снижается, а во фракции легких — увеличивается по сравнению с молодыми крысами. Эти сдвиги, однако, не ведут к изменению величины коэффициента экспрессии на уровне всей митохондриальной популяции. Отсюда следует, что в печени взрослых крыс, несмотря на сдвиги в распределении между фракциями митохондрий экспрессионной и репликативной активностей, на уровне всей популяции митохондрий экспрессия мтДНК и, очевидно, функция генерирования энергии не изменяются.

При старении величина коэффициента экспрессии снижается во фракции тяжелых митохондрий по сравнению со взрослыми крысами, а во фракции средних — по сравнению как со взрослыми, так и с молодыми; во фракции легких митохондрий значимых возрастных изменений не отмечается. Вследствие того, что тяжелая и средняя фракции в пе-

чени старых крыс составляют три четверти митохондриальной массы, значительно снижается и величина коэффициента экспрессии на уровне всей популяции митохондрий.

Таким образом, несмотря на увеличение содержания мтДНК в печени старых крыс, ее экспрессия резко снижена. Причин этого несоответствия может быть несколько, но наиболее вероятными, на наш взгляд, являются две из них. Первая состоит в том, что с возрастом в популяции молекул мтДНК увеличивается доля делетированных молекул [27—29], которые из-за уменьшенных размеров реплицируются быстрее, чем полноразмерные, так как скорость репликации молекул мтДНК прямо пропорциональна их длине. Чем больше в популяции делетированных молекул мтДНК, тем значительно снижен синтез белков, кодируемых делетированными последовательностями, тем меньше формируется функционально полноценных комплексов окислительного фосфорилирования и тем ниже уровень синтеза АТФ, что и наблюдается в печени старых крыс [3]. Падение концентрации АТФ по принципу обратной связи стимулирует гликолитическое фосфорилирование и, если его уровень не компенсирует потребностей клетки в энергии, активизирует амплификацию и экспрессию мтДНК [30]. Таким образом, у старых животных может возникать порочный круг, ведущий к увеличению содержания мтДНК за счет мультипликации дефектных молекул.

Вторая причина — образование поперечных сшивок между молекулами мтДНК и белков или/и липидов [31, 32] в результате свободно-радикальных реакций [33]. Эти сшивки могут служить препятствием для процесса транскрипции и таким образом стимулировать вышеописанный механизм обратной связи, направленный на амплификацию молекул мтДНК. Амплификация путем репликации «несшитых» молекул приведет к повышению содержания мтДНК, однако представленная «сшитыми» молекулами часть мтДНК останется балластной, неэкспрессируемой.

В печени старых крыс, вероятно, накапливаются как делетированные, так и «сшитые» молекулы мтДНК, но первые, по-видимому, преобладают, подтверждением чему служит уменьшение содержания продуктов экспрессии митохондриального генома (см. табл. 1).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что фракции митохондрий печени крыс, различающиеся по константе седиментации органелл, отличаются также по содержанию и соотношению в них мтДНК и белков, кодируемых мтДНК и яДНК. С возрастом происходят неравномерные изменения как абсолютного, так и относительного содержания фракций в единице массы печени. При этом в каждой из фракций изменяются количество и соотношение мтДНК и белков. У старых крыс такие изменения выражены в большей степени, чем у взрослых. В основе возрастных изменений могут лежать механизмы, нарушающие биогенез митохондрий, т. е. координацию процессов репликации и экспрессии митохондриального генома, что характеризуется несоответствием содержания мтДНК и кодируемых ею белков.

Резюме. У фракціях мітохондрій печінки щурів різного віку (молоді — 3—4 місяці, дорослі — 6—8 місяців, старі — 24—26 місяців) визначали кількість мтДНК і білків, що кодуються мтДНК і яДНК. Три різні за константою седиментації фракції мітохондрій відрізняються вмістом і співвідношенням мтДНК і білків. Такі самі зміни спостерігаються з віком у кожній фракції мітохондрій. У старих щурів вони виражені більше, ніж у дорослих. З віком також нерівномірно змінюється абсолютний та відносний вміст фракцій в одиниці маси печінки. Обговорюються механізми, що порушують координацію процесів реплікації та експресії митохондріального геному.

Summary. The contents of mtDNA and proteins encoded by mtDNA and nDNA were determined in liver mitochondrial fractions of rats of different ages (young — 3—4, adult — 6—8, old — 24—26 mo). Three mitochondrial fractions with different sedimenta-

tion constants have been varied by content and ratio of mtDNA and proteins as well. The absolute and relative content of the fractions were changed irregularly in liver mass unit with age. Furthermore, it was observed that the content and ratio of mtDNA and proteins changed in each mitochondrial fraction with age. These changes were more pronounced in the old rats as compared with adult ones. The mechanisms of coordination alterations of mitochondrial genome replication and expression are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фролькис В. В. Старение и биологические возможности организма.— Л.: Наука, 1975.—272 с.
2. Hansford R. G. Bioenergetic in aging // *Biochim. et biophys. acta.*—1983.—726, N 1.—P. 41—80.
3. Литошенко А. Я. Старение митохондрий — триггерный механизм старения клеток // Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов.— Киев: Наук. думка, 1986.— С. 150—160.
4. Roodyn D. B., Wilkie D. The biogenesis of mitochondria.— London: Methuen, 1968.— 123 p.
5. Озернюк Н. Д. Рост и воспроизведение митохондрий.— М.: Наука, 1973.—263 с.
6. Tomura H., Endo H., Kagawa Y. et al. Novel regulatory enhancer in the nuclear gene of the human mitochondrial ATP synthase β -subunit // *J. Biol. Chem.*—1990.—265, N 12.—P. 6525—6527.
7. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке.— М.: Наука, 1969.—440 с.
8. Литошенко А. Я. Триггер процесса старения — в ядре или митохондриях? // Изв. АН СССР. Сер. биол.—1992.—№ 4.— С. 645—648.
9. Литошенко А. Я. Синтез митохондриальных белков ядерного и митохондриального кодирования в интактной и регенерирующей печени крыс разного возраста // *Вопр. мед. химии.*—1985.—31, № 2.— С. 105—110.
10. Литошенко А. Я. Обновление митохондриальных белков в печени крыс разного возраста // *Бюлл. эксперим. биологии.*—1982.—94, № 12.— С. 49—51.
11. Литошенко А. Я. Обновление митохондриальной ДНК в печени крыс разного возраста // Там же.—1984.—97, № 3.— С. 299—301.
12. Tauchi H., Sato T. Hepatic cells of the aged // *Liver and Ageng.*— Amsterdam; New York, Oxford: Elsevier, 1978.— P. 3—20.
13. Beattie D. S. Studies on the biogenesis of mitochondrial protein components in rat liver slices // *J. Biol. Chem.*—1968.—243, N 15.—P. 4027—4033.
14. Андрианов Н. В., Бледнов Ю. А., Шуппе Н. Г. К вопросу о биохимической гетерогенности митохондрий // *Молекуляр. биология.*—1976.—10, № 5.— С. 1042—1049.
15. Petit P. X., O'Connor J. E., Grunwald D. et al. Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications // *Eur. J. Biochem.*—1990.—194, N 2.— P. 389—397.
16. Kitagawa Y., Sugimoto E. Estimation of the in vivo translational activity of rat liver mitochondria without of an antibiotic // *J. Biochem.*—1980.—88, N 3.—P. 689—693.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—193, N 1.—P. 265—275.
18. Скворская Э. Б., Чепинова О. П. Практикум по нуклеопротеидам и нуклеиновым кислотам.— М.: Высш. шк., 1964.—214 с.
19. Рябинина З. А., Бенюш В. А. Полиплоидия и гипертрофия клеток в процессах роста и восстановления.— М.: Медицина, 1973.—208 с.
20. Posakony J. W., England J. M., Attardi G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells // *J. Cell. Biol.*—1977.—74, N 2.—P. 468—491.
21. Hare J. F., Crane F. L. Proteins of mitochondrial cristae // *Subcell. Biochem.*—1974.—3, N 1.—P. 1—25.
22. Azzi A. Mitochondria: the utilization of oxygen for cell life // *Experientia.*—1984.—40, N 9.—P. 901—906.
23. Massie H. R., Colacicco J. R., Williams T. R. Loss of mitochondrial DNA with aging in the Swedish *c* strain of *Drosophila melanogaster* // *Age.*—181.—9, N 1.—P. 42—47.
24. Huemer R. P., Lee K.-D., Reeves A. E. et al. Mitochondrial studies in senescent mice. II. Specific activity buoyant density, and turnover of mitochondrial DNA // *Exp. Gerontol.*—1971.—6, N 5.—P. 327—334.
25. Новикова Н. М., Бондаренко Ю. В. Влияние возраста на количественные изменения ДНК митохондрий печени крыс // *Молекуляр. и физиол. механизмы возрастного развития.*— Киев: Наук. думка, 1975.— С. 148—153.
26. Stocco D. M., Hutson J. C. Quantitation of mitochondrial DNA and protein in the liver of Fisher 344 rats during aging // *J. Gerontol.*—1978.—33, N 6.—P. 802—809.
27. Cortopassi G., Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18, N 23.—P. 6927—6933.
28. Linnane A. W., Baumer A., Maxwell R. J. et al. Mitochondrial gene mutation: the ageing process and degenerative diseases // *Biochem. Int.*—1990.—22, N 6.—P. 1067—1076.
29. Wallace D. C. Diseases of the mitochondrial DNA // *Annu. Rev. Biochem.*—1992.—61.—P. 1175—1212.

30. Нейфах С. А. Роль митохондрий в клеточной наследственности // Молекуляр. генетика митохондрий.—Л.: Наука, 1977.—С. 8—18.
31. Asano K., Amagase S., Matsuura E. T. et al. Changes in the rat liver mitochondrial DNA upon aging // Mech. Ageing and Develop.—1991.—60, N 3.—P. 275—284.
32. Asano K., Nakamura M., Asano A. et al. Quantitation of changes in mitochondrial DNA during aging and regeneration of the rat liver using non-radioactive DNA probes // Ibid.—1992.—62, N 1, 2.—P. 85—98.
33. Saul R. L., Gee P., Ames B. N. Free radical, DNA damage, and aging // Modern Biol. Theor. of Aging.—New York: Raven press, 1987.—P. 113—129.

Ин-т геронтологии АМН Украины, Киев
НИЦ «Сонар» АН Украины, Киев

Получено 26.03.93

УДК 547.163.4

С. В. Коношенко

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНОВ ДВУХ ВИДОВ ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ: ЧЕРЕПАХИ TESTUDO HORESFIELDI И УЖА ВОДЯНОГО NATRIX TESSELATA

Методом ЯМР-релаксации изучена внутримолекулярная подвижность электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов водяного ужа и черепахи. Установлены различия и взаимосвязь уровня внутримолекулярной подвижности со средством фракций гемоглобинов к кислороду.

Введение. Развитие физико-химических методов исследования и теории биополимеров, а также накопление экспериментальных данных по этой проблеме показали, что для выяснения механизма функционирования гемоглобина недостаточно знания его статистической структуры. Методом РСА доказано [1], что функционирование гемоглобина сопровождается изменением его конформации. Очевидно, что конформационные перестройки происходят за счет внутримолекулярных движений атомов и атомных группировок, и от динамических характеристик равновесных и неравновесных процессов зависит функциональная активность белка. Однако вышеуказанные изменения происходят очень быстро и изучать динамику столь быстрых перемещений полипептидных цепей и отдельных групп белка в пространстве очень сложно. Проще исследовать внутримолекулярную динамику одной из форм гемоглобина в состоянии равновесия, допуская, что интенсивности как равновесной, так и неравновесной динамики должны находиться в коррелятивных соотношениях.

В настоящей работе методом ЯМР-релаксации проведен сравнительный анализ внутримолекулярной подвижности электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов двух представителей класса пресмыкающихся и связи динамической структуры белка с его функциональной активностью.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили гемоглобины двух представителей класса пресмыкающихся — черепахи (*T. horesfieldi*) и водяного ужа (*N. tessellata*). Кровь брали от пяти и семи особей каждого вида соответственно. Гемоглобин выделяли изпод стромы по [2], гемолизируя эритроциты в присутствии дистиллированной воды и толуола. Фракционный состав гемоглобина изучали с помощью диск-электрофореза в 7 %-м ПААГ [3]. Фракции гемоглобина выделяли препаративным электрофорезом в блоках 7 %-го ПААГ [4]. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (рН 8,3) при напряжении 50 В и силе тока 10—20 мА на белок геля.

© С. В. Коношенко, 1993