Биомедицинская химия, 2003, том 49 №5, с.463-469

УДК 616-092:577.3

ОЦЕНКА ЭНЕРГОЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА Ca^{2+} В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ ПРИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ЖЕЛУДОЧКОВ: ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА

И.Р.Саакян[1], Л.Ф.Шердукалова[2], Г.Г. Саакян[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московской обл.; эл.почта: saakyan@mail.ru
[2]Институт хирургии Минздрава Армении, Ереван, Республика Армении;

Разработаны процедуры по измерению синтеза ATP из ADP и энергозависимого транспорта Ca^{2+} в митохондриях сердечной мышцы у животных (крысы, кролика). Обогащение среды гомогенизации глутаматом улучшает возможности этого измерения. Установлена для показателя транспорта Ca^{2+} высокая чувствительность, информативность и возможность тестирования энергетического состояния сердечной мышцы у пациентов.

Ключевые слова: биоптат сердца, митохондрии, транспорт Ca^{2+}, патология

ВВЕДЕНИЕ. Разработка процедур по исследованию энергетических процессов митохондрий на целостных препаратах (тканевых срезах, гомогенатах [1-3] или отдельных волокнах [4-6]) сердечной мышцы, вместо стандартных (выделенных и промытых в сахарозе) препаратов митохондрий, определяет преимущество работы с малыми количествами ткани (биоптатом). К тому же митохондрии в целостных препаратах лишены недостатков, связанных с процедурой выделения из ткани. Эти препараты, в том числе гомогенаты, не утрачивают и содержат всю популяцию митохондрий в клетке, сохраняют природные блоки митохондриальной сети и регуляторное взаимодействие цитоплазматических структур [7-10]. Это приближает условия функционирования митохондрий к условиям *in vivo* и повышает информативность в оценке состояния ткани [9-11]. Кроме того, процесс изготовления гомогената является менее сложным, трудоемким и длительным, в отличие от процедур, связанных с выделением митохондрий.

Показано [8-10], что в гомогенате печени более естественной средой служит КС1, а не сахароза. Присутствие цитозоля и малое разведение ткани обеспечивают большую нативность, стабильность и сохранение важных энергетических функций митохондрий. Однако этого не удается наблюдать на гомогенатах сердечной мышцы. Не удается воспроизвести традиционное окислительное фосфорилирование с образованием ATP из ADP. Не воспроизводится на воздействие ADP реакция обратимого окисления NAD, но в тоже время, это реакция индуцируется Ca^{2+} [2,12]. Если допустить, что в гомогенатах сердечной мышцы синтез ATP нарушен, то должны нарушаться и энергоемкие процессы транспорта Ca^{2+} и обратного переноса электронов. Однако этого не происходит. Следует полагать, что в гомогенатах сердечной мышцы имеются какие-то факторы, препятствующие проявлению основных энергетических процессов.

Цель работы - отработать условия для исследования процессов синтеза ATP из ADP и энергозависимого транспорта Ca^{2+} в гомогенатах сердечной мышцы животных (крысы, кролика). Сравнить данные полученные на гомогенатах сердечной мышцы с таковыми на выделенных из данной ткани митохондриях и гомогенатах печени. Исследовать энергетические реакции митохондрий гомогенатов сердечной мышцы до и после фибрилляции и остановки сердца у собак, а также у пациентов с тетрадой Фалло.

МЕТОДИКА. Отработка метода и подбор условий выполнены на сердцах экспериментальных животных (крыс, кроликов). Исследования проведены на гомогенатах операционных биоптатов (0,4 - 0,5 г) ушек правого предсердия у пациентов с тетрадой Фалло (n = 2) и беспородных собак (n = 5) до и после спонтанной фибрилляции (7-10 мин) и остановки сердца в процессе искусственного кровообращения. Фибрилляции сопутствовало развитие гипоксии, ацидоза (уменьшение pH артериальной и венозной крови, снижение емкости бикарбонатов), резкое падение (по данным зондирования) внутрижелудочкового систолического и диастолического давления. Биоптат тут же в ледяном буферном растворе доставляли из операционной в лабораторию, из него изготовляли гомогенаты (процедура описана ниже).

Для выделения митохондрий из сердечной мышцы использовали общепринятую среду, содержащую 300 мкМ сахарозу, 10 мМ Hepes, 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,4 в соотношении ткань: среда 1 : 10 [8]. Среду суспендирования (без ЭДТА) дополнительно обогащали глутаматом 5 мМ с целью предохранения митохондрий от повреждающего влияния продуктов перекисного окисления [13].

Для приготовления гомогенатов печени соотношение ткань: среда составляло 1 : 1 [8-10,16], глутамат не добавляли.

Приготовление, хранение и отбор гомогената из сердечной ткани. Сердце сразу же после забоя животного извлекали и опускали в ледяной раствор (основной) следующего состава: 125 мМ KCl, 10 мМ Hepes, 1 мМ ЭДТА, pH 7,65. Желудочки, после иссечения хирургическими ножницами предсердий, трижды, для отмывания крови, промывали вышеуказанной средой, взвешивали и переносили на часовое стекло, поставленное на лед. Среду гомогенизации обогащали глутаматом 5 мМ с целью предохранения митохондрий от повреждающего влияния продуктов перекисного окисления [13]. Данную среду добавляли к сердечной мышце сразу, до ее измельчения ножницами, в соотношении ткань:среда - 1:3. Тщательно размельченную (до вязкого состояния) мышечную массу переносили и растирали (60 с) в неплотном стеклянном гомогенизаторе с помощью тефлонового пестика. Гомогенат фильтровали через два слоя капрона, отмечали его конечный объем. Препарат готов к измерению через 10 мин после забора сердца (или биоптата). Густой гомогенат (30 - 40 мг белка на мл) хранили на льду не более 30 мин. Образцы препарата отбирали охлажденной пипеткой с широким кососрезанным кончиком и вносили в среду инкубации по 25 мкл на 1 мл среды. Концентрацию белка измеряли по биуретовой реакции.

Важно заметить, что раннее (до измельчения) добавление к сердечной мышце солевой среды в соотношении 1 : 3 упрощает все технические процедуры по изготовлению гомогената, сводит к минимуму потерю ткани (кусочки лучше измельчаются ножницами, быстрее растираются и полнее извлекаются из гомогенизатора), упрощает фильтрацию, увеличивает выход белка, подерживает pH и концентрацию Ca^{2+} и Mg^{2+} в среде на физиологическом уровне. Внесение глутамата в среду гомогенизации улучшает измерение фосфорилирующего окисления и транспорта Ca^{2+}.

Поглощение Ca^{2+}. Измерение проводили по противофазному изменению H^+ в среде инкубации с помощью водородного электрода. $CaCl_2$ добавляли порциями по 200 мкмоль до его спонтанного выброса из матрикса митохондрий в среду [14, 15]. Максимальное количество накопленного Ca^{2+} соответствует Ca^{2+}-емкости.

Гомогенат добавляли в исследуемую ячейку по 50 мкл на 2 мл среды (25° С) следующего состава: 125 мМ KCl, 1 мМ Hepes, 1,5 мМ KH_2PO_4, pH 7,4 и субстрат окисления: 4 мМ, сукцинат и 1 мМ глутамат. В качестве ингибиторов использовали 1мМ рутениевый красный или малонат. Указанная среда инкубации использовалась во всех других измерениях.

Определение скорости фосфорилирования ADP. Измерение проводили по скорости убыли H^+ (защелачиванию среды) после добавления ADP.

Измерение дыхания. Дыхание измеряли с помощью платинового электрода полярографическим способом.

Измерение флуоресценции NADH. Измерение проводили с помощью флуоресцентного метода при длине волны 366-450 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Показано, что в гомогенатах сердечной мышцы и печени накопление Ca^{2+} подавляется рутениевым красным - ингибитором транспорта Ca^{2+} в митохондриях и малонатом - конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. Это указывает, что энергозависимое накопление Ca^{2+} обеспечивается митохондриями, а не другими внутриклеточными структурами.

Из данных рис. 1 видно, что добавленная к гомогенатам сердечной мышцы ADP приводит к импульсному (1-5 с) защелачиванию среды, которое сменяется закислением. С последующей добавкой ADP цикл повторяется. Скорость закисления среды удается компенсировать путем повышения концентрации ADP с 200 до 400 мкМ, но лишь на короткий отрезок времени: 20-30 с. В гомогенатах печени, в отличие от гомогенатов сердечной мышцы, индуцируемое ADP защелачивание среды, отчетливо, как на выделенных митохондриях [14], переходит на стационарный уровень, продолжительность которого измеряется минутами. Ответы на последовательно добавленный Ca^{2+} в гомогенатах сердечной мышцы лучше выражены, чем в гомогенатах печени (см. табл.).

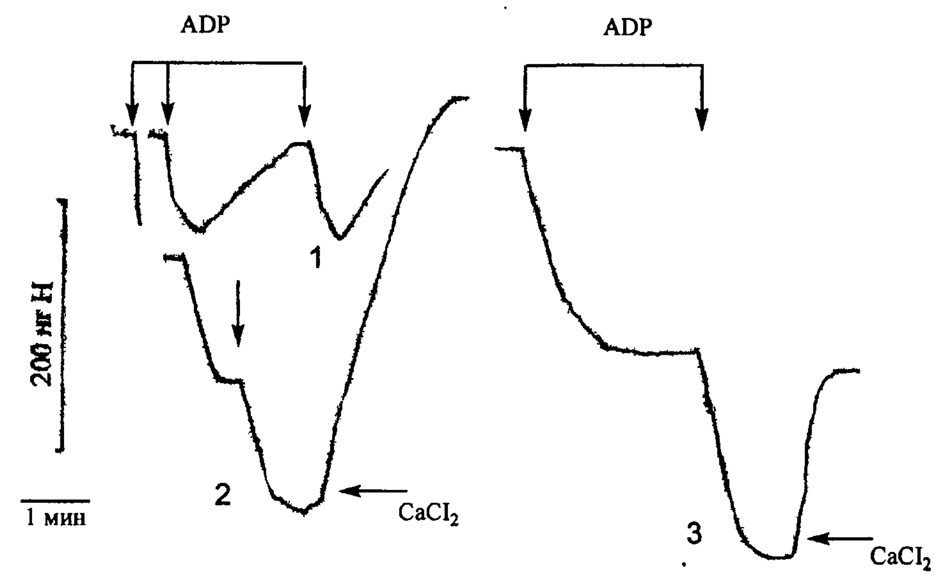

Рисунок 1.
Кинетика синтеза ATP из ADP в гомогенатах сердечной мышцы и печени у крыс.
Гомогенаты: сердечной мышцы - 1 и 2 и печени - 3. Субстрат окисления: 4 мМ сукцинат для 1 и 3, сукцинат + 1 мМ глутамат для 2. ADP добавляли по: 200 мкмоль для 1 и 3 и 400 мкмоль для 2.

В гомогенатах сердечной мышцы, в отличие от выделенных из данной мышцы митохондрий, фосфорилирующее дыхание, индуцированное ADP (активное состояние 3) низкое по амплитуде и растянутое по времени (рис.2), *Таблица.* Энергозвисимый транспорт Ca^{2+} в гомогенатах сердечной мышцы и печени у крыс.

Вид ткани	Ca^{2+} - Емкость, нмоль H^+ на 1 мг белка; % стимуляции ADP.		
	Сукцинат	Сукцинат+ADP	Сукцинат + глутамат+AD
Сердце, (n = 2)	100 (100%)	216 (+116%)	290 (+190%)
Печень, (n = 5)	62 (100%)	112 (+81%)	127 (+105%)

Примечание: В скобках приведён % стимуляции поглощения Ca^{2+}. За 100% принята Ca^{2+} ёмкость в присутствии сукцината.

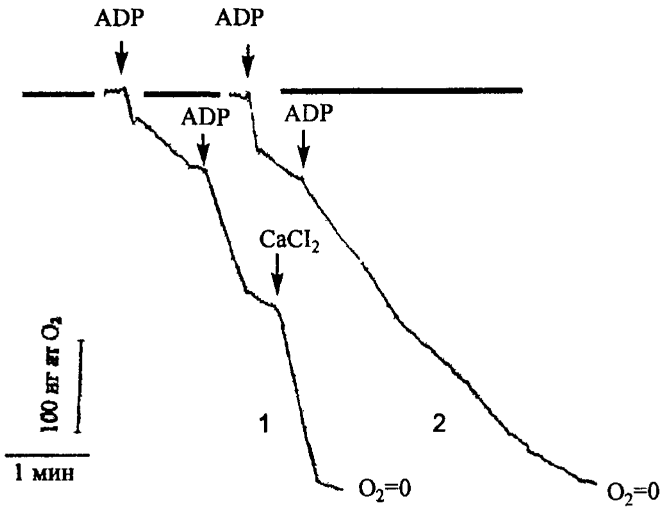

Рисунок 2.
Кинетика дыхания выделенных МХ (1) и гомогенатов (2) сердечной мышцы у кроликов. Субстрат окисления: 4 мМ сукцинат для 1 и 4 мМ сукцинат + 1мМ глутамат для 2. ADP и $CaCl_2$ добавляли по 200 мкмоль.

плавно переходит в контролируемое (состояние 4). Относительно высокому состоянию 4 соответствуют низкие значения (в условных единицах) дыхательного контроля (ДК) по Чансу (1,5 против 3,5), ДК по Ларди (2,1 против 3,0), ADP/O (3,3 против 6,7), ADP/t (1,0 против 1,6). Эти различия, по-видимому, связаны с высокой активностью АТРазы, быстрым и непрерывным АТР-Pi оборотом [17-19].

Из данных таблицы видно, что митохондрии в гомогенатах сердечной мышцы и печени способны накапливать при окислении сукцината (без ADP) из среды инкубации, соответственно, по 100 и 62 нмоль H^+ на 1 мг белка. На фоне синтеза АТР величина накопленного Ca^{2+} увеличивается: в сердце на 116%, в печени на 81%. Глутамат дополнительно увеличивает накопление Ca^{2+} еще на 74% и 24% соответственно. Примечательно, что стимуляция АТР транспорта Ca^{2+} в гомогенатах сердечной мышцы выше, чем в гомогенатах печени.

На рис. 4 приведены кривые, характеризующие кинетику индуцированного Ca^{2+} окислительно-восстановительного превращения NAD в митохондриях гомогенатов сердечной мышцы до и после фибрилляции и остановки сердца у собаки, а также у пациента с тетрадой Фалло. У пациента сравниваются также кривые поглощения Ca^{2+} в указанных условиях. Фибрилляция ведет к снижению исходного (до перфузии) уровня NAD, уменьшению амплитуды и продолжительности обратимого окисления NAD, а также Ca^{2+} емкости, наблюдаемых в условиях патологии сердца [2,12,14]. Глутамат устраняет эти изменения, что указывает на их обратимый характер [2,12, 14-16].

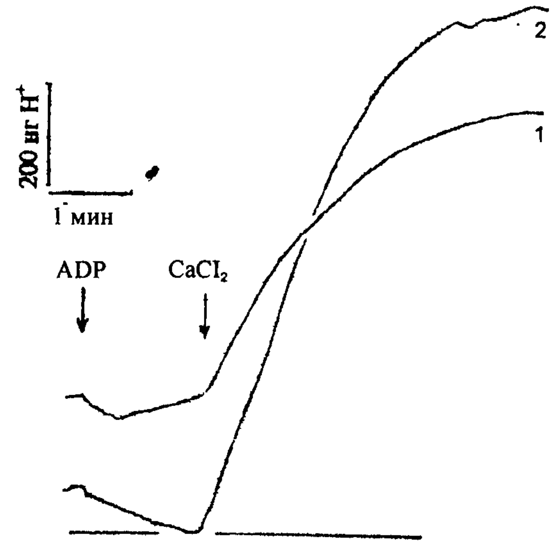

Рисунок 3.
Изменение синтеза ATP и поглощения Ca^{2+} в гомогенатах сердечной мышцы крысы, приготовленных на среде без ЭДТА. Влияние глутамата на эти процессы.
Субстрат окисления: 4 мМ сукцинат для 1, 4 мМ сукцинат + 1 мМ глутамат для 2. ADP добавляли по 400 мкмоль, $CaCl_2$ - 200 мкмоль.

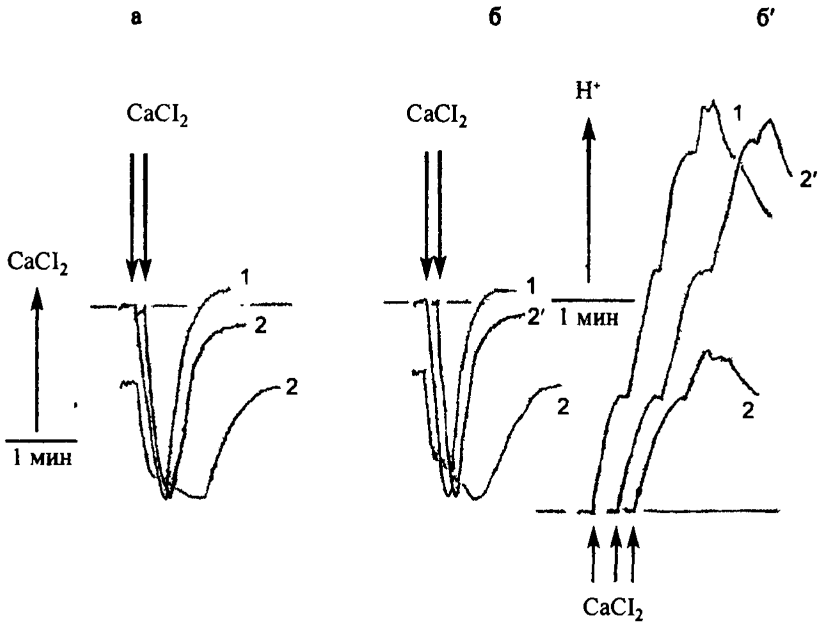

Рисунок 4.
Изменения окислительно-восстановительного превращения NADH (а и б) и транспорта Ca^{2+} (б') в гомогенатах операционных биоптатов сердечной мышцы до и после фибрилляции и остановки сердца у собаки (а) и пациента (б, б') с тетрадой Фалло.
Субстрат окисления: 4 мМ сукцинат и 4 мМ сукцинат + 1 мМ глутамат для 2'. $CaCl_2$ добавляли по 200 мкмоль.

Итак, разработаны условия для исследования в гомогенатах сердечной мышцы процессов синтеза ATP и энергозависимого транспорта Ca^{2+}. Показано, что синтез ATP в гомогенатах сердечной мышцы сам по себе не четко выражен.

Это, по всей видимости, определяется не нарушением энергообразования, а трудностями его экспериментального обнаружения. Основным препятствием для обнаружения в сердечной ткани синтеза ATP, по-видимому, является сравнительно высокая активность АТРазы, цикличность ATP-P_i реакций [17-19], благодаря чему синтез маскируется гидролизом и ускользает от исследователя (рис. 1, 2). Ограничение активности АТРазы повышенной концентрацией ADP демаскирует этот синтез (рис. 1). Внесение экзогенных АТРаз оказывает обратный эффект [17, 20]. Известно, что низкие значения фосфорилирующего дыхания и ДК для целостных препаратов (сердечной [18, 19] или скелетной [21] мышцы и печени [22, 23]) сменяются после выделения митохондрий на типично высокие для этих препаратов ДК и P/O, что авторы объясняют разной активностью АТРаз в сравниваемых препаратах.

В гомогенатах сердечной мышцы, индуцированные Ca^{2+} ответы, в отличие от ответов на ADP, хорошо выражены, более того, позволяют оценить эффект предварительно добавленной ADP, сопряженный с синтезом ATP (табл.). Поглощение Ca^{2+} в гомогенатах сердечной мышцы после реализации синтеза и накопления ATP увеличивается в большей степени, чем в гомогенатах печени. Ответы на Ca^{2+}, как показано (рис. 3) на примере развития острой прогрессирующей сердечной недостаточности у животных и у пациентов, чувствительно выявляют функциональные особенности митохондрий в критических ситуациях. Использование глутамата повышает чувствительность измерения. Глутамат приводит к значительному повышению Ca^{2+}-емкости, выявляя величину и обратимый характер ингибирования окисления сукцината оксалоацетатом в условиях патологии [2,12,14-16].

Показатели транспорта Ca^{2+}, как более чувствительные и информативные, по сравнению с показателями фосфорилирующего окисления, могут успешно использоваться в качестве критериев оценки энергетического состояния митохондрий сердечной мышцы (биоптата) в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Карапетян Т.Д., Шердукалова Л.Ф.* (1990) Кардиология, **4**, 91-94.
2. *Саакян И.Р., Карапетян Т.Д., Аглинцян Т.С., Шердукалова Л.Ф.* (2001) Митохондрии в патологии, Пущино, с. 79-82.
3. *Vasuhara, S., Takaki, M., Kikuta, A., Ito, H. and Suga, H.* (1996) Am.J.Physiol., **270**, H1063-H1070.
4. *Veksler V.I., Kuznetsov A.Y., Sharov V.G., Kapelko V.I. and Saks V.A.* (1987) Biochim. Biophys. Acta, **892**, 191-196.
5. *Meyer M., Keweioh B., Guth K.* (1998) J. Mol. Cell. Cardiol., **30**, 1459-1470.
6. *Stumpe T. and Schrader J.* (1997) Am.J.Physiol., **42**, H756-H766.
7. *Сударикова Ю.В., Бакеева Л.Е., Цыпленкова В.Г.* (1997) Биохимия, **62**, 1155 - 1170.
8. *Кондрашова М.Н., Сирота Т.В., Темнов А.В., Белоусова Ж.В., Петруняка В.В.* (1997) Биохимия, **62**, 154-163.
9. *Kondrashova, M.N., Fedotcheva, N.I., Saakyan, I.R., Sirota, T.V., Lamasiev, K.G., Kulicova, M.V., Temnov, A.V.* (2001) Mitochondrion, **1/3**, 249-267.
10. *Temnov, A.V., Popov, V.I., Sirota, T.V., Saakyan, I.R., Stavrovskaya, I.G., Fedotcheva, N.I., Kondrashova, M.N.* (2000) Biophotonics and Coherent Systems. Proceedings of the 2-nd Alecsander Gurwiitsch Conferences, Moscow University Press, pp. 101-116.
11. *Davies, K.J.A., Packer, L. and Brooks, G.A.* (1981) Arch. Biochem. Biophys, **209**, 539 - 554.

12. *Саакян И.Р., Шердукалова Л.Ф., Асланян А.Р., Саркисян М.А., Бабаян Г.В., Карапетян Т.Д., Маркарян Э.В.* (1974) Актуальные проблемы диагностики и терапии недостаточного сердца. Ереван, Айастан, с. 49-55.
13. *Chance B.* (1971) FEBS Letters, **81**, 261-264.
14. *Саакян И.Р., Саакян С.Г.* (1996) Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, с. 57-65.
15. *Саакян И.Р., Саакян А.Г.* (1998) Вопр. мед. химии, **6**, 755-759.
16. *Саакян И.Р., Саакян С.Г., Кондрашова М.Н.* (2001) Биохимия, **66**, 976-984.
17. *Beeler T.J., WangT., GableK. and Lee S.* (1985) Arch.Biochem.Phys, **243**, 644-654.
18. *Chidsey, Ch. A., Weinbach, E.C., Pool, P.E., Morrow, A.G.* (1966) J. Clin. Inwest, **45**, 40-50.
19. *Kindsley-Hiockman, Sako, E.Y., Mohanakrshnan, P., Pobitaille, M.L., From, A.H.L., Forer, J.E., and Ugurbil, K.* (1987) Biochemistry, **26**, 7501-7510.
20. *Маевский Е.И., Розенфельд А.С., Гришина Е.В., Кондрашова М.Н.* (2001) Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий, Пущино, с.155.
21. *Guilllory, R.J., Mommaerts, W.F.H.M. and Uchida, K.* (1962) Biochim. Biophys. Acta, **62**, 525-533.
22. *Ishiara, A., Tonioka, H., Takeda, I.* (1965) Biochim. Biophys. Acta, **97**, 1-9.
23. *Brand, M.D., Harper, M-E., and Taylor, H.C.* (1993) Biochem. J., **291**, 739-748.

Поступила 20.12.2001

THE ASSESSMENT OF ENERGY DEPENDENT CA^{2+} TRANSPORT IN MYOCARDIAL MITOCHONDRIA AT THE VENTRICLE FIBRILLATION: POTENTIAL DIAGNOSTIC IMPLICATION.

I.R. Saakyan[1], L.F. Scherducalova[2], H.G. Saakyan[1]

[1]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Puchchino, 14290,
e-mail: saakyan@mail.ru
[2]Institute of Surgey, Ministry of Health of Armenia, Erevan, Respublic of Armenia;

The method of evaluation of ATP synthesis from ADP and Ca^{2+} transport in myocardial mitochondria has been developed. The addition of glutamate to the homogenisation media improved the parameters studied. It was shown that the Ca^{2+} transport test is highly informative and sensitive for the estimation of heart muscle energetic state.

Key words: mitochondria, bioptat, Ca^{2+} transport, pathology