

УДК 577.352.4

©Коллектив авторов

## **ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СУКЦИНАТЗАВИСИМЫМ ПОГЛОЩЕНИЕМ $\text{Ca}^{2+}$ И ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕМ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА И ПЕЧЕНИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ**

*И.Р. Саакян, Г.Г. Саакян*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино  
Московской обл.; эл. почта: saakyan@mail.ru

Выявлена реципрокность действия глутамата (ГЛУ) и  $\alpha$ -кетоглутарата (КГЛ) - субстратов, участвующих в переаминировании, - на сукцинат-зависимые процессы дыхания, восстановления NADH, накопления и стабильного удержания  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях и гомогенатах сердца и печени экспериментальных животных. Показана высокая чувствительность к изменению концентрационных соотношений ГЛУ и КГЛ в пределах  $1 \div 10$  мМ сукцинат-зависимого поглощения  $\text{Ca}^{2+}$ . ГЛУ активирует процесс путем переаминирования оксалоацетата (ОАА) до аспартата. Преобладание КГЛ блокирует активирующее действие ГЛУ. Преобладание ГЛУ устраняет блок, вызванный КГЛ или фосфоенолпируватом (источниками ОАА и GTP), но не аминоксалоацетатом, ингибитором трансаминаз. Выявлена функциональная взаимосвязь между сукцинат-зависимым транспортом  $\text{Ca}^{2+}$  и переаминированием.

**Ключевые слова:** переаминирование, цикл Кребса, митохондрии, поглощение  $\text{Ca}^{2+}$ , окисление сукцината.

**ВВЕДЕНИЕ.** Хорошо известно, что трансаминазные реакции активно восполняют пул метаболитов цикла Кребса и, в свою очередь, им контролируются [1-6]. Активация трансаминаз и стимуляция цикла Кребса ведет к усилению энергопродукции и физиологической адаптации органов и тканей в аэробных и анаэробных условиях [3,5-8]. Среди стимуляторов указанных процессов известна роль  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{H}^+$  [2, 8-10]. Ингибитор трансаминаз, аминоксалоацетат, подавляет обмен между глутаматом и  $\alpha$ -кетоглутаратом (субстратами, участвующими в переаминировании), уменьшает поступление в цикл Кребса и сопряженное с синтезом сукцината окисление  $\alpha$ -кетоглутарата [2, 5, 6], а потому - продукцию и обеспечение АТФ и GTP эндергонических реакций [2, 7-11].

Нами выявлено [11-13] реципрокное регуляторное влияние глутамата и  $\alpha$ -кетоглутарата - субстратов участвующих в переаминировании, на поддерживаемое окислением сукцината поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях: глутамат стимулирует данный процесс, по-видимому, путем устранения оксалоацетата, а  $\alpha$ -кетоглутарат, напротив, тормозит. Ограничение  $\alpha$ -кетоглутаратом окисления сукцината, по-видимому, может реализоваться через оксалоацетат. В таком рассмотрении переаминирование можно представить в качестве легко обратимого метаболического звена в цикле Кребса, могущего обеспечивать реципрокную регуляцию окисления сукцината и зависящего от этого окисления транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ .

В настоящей работе мы исследовали влияние экзогенных глутамата и  $\alpha$ -кетоглутарата на поддерживаемые окислением сукцината дыхание,

восстановление NAD, поглощение и освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий сердца собаки, кролика, быка, крысы и голубя и гомогенатов сердца и печени крыс. Использовали оригинальный прием изменения концентрационного соотношения в диапазоне 1:10 mM указанных субстратов на сукцинатзависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ . Сравнивали действие  $\alpha$ -кетоглутарата с таковым фосфоенолпирувата, известных источников оксалоацетата и GTP. Исследовали действие на процесс ингибитора аминотрансфераз, аминooksацетата.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали интактные сердца собаки, кролика, быка и голубя, из которых выделяли митохондрии, а также сердце и печень крыс линии Вистар массой 200-250 г. Из сердца и печени крыс получали солевые гомогенаты, соотношение ткань: среда составило для печени 1:1 [14], для сердца - 1:3 [15].

Митохондрии из сердечной мышцы выделяли стандартным методом дифференциального центрифугирования, используя для этого среду, содержащую 300 mM сахарозу, Hepes 10 mM, ЭДТА 0,5 mM, pH 7,4 в соотношении ткань: среда равной 1:10. Среду суспендирования (без ЭДТА), модифицированную глутаматом, использовали в соотношении ткань: среда 10:1 [15]. Осадок митохондрий не промывали.

*Приготовление, хранение и отбор гомогената из сердечной ткани.* Процедуры подробно описаны ранее [15]. Сердце сразу же после забоя животного извлекали и опускали в ледяной раствор следующего состава: 125 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM ЭДТА, pH 7,6 до полной остановки сокращений. В ряде случаев ЭДТА из среды гомогенизации изымали. Желудочки, после иссечения хирургическими ножницами предсердий, трижды, для отмывания крови, промывали вышеуказанной средой, взвешивали и переносили на часовое стекло, поставленное на лед. Ввели следующие модификации: 1) среду гомогенизации обогащали глутаматом 5 mM с целью предохранения митохондрий от повреждающего влияния продуктов перекисного окисления; 2) 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 тefлонового пестика. Гомогенат фильтровали через слой капрона, его конечный объем не превышал 2,5 мл. Препарат готов к измерению через 10 мин после забора сердца. 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.

Важно заметить, что прием раннего (до измельчения) добавления к сердечной мышце солевой среды в соотношении равной 1:3 способствует быстрому и равномерному охлаждению ткани, упрощает 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, поддерживает в среде физиологические значения pH,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ .

*Приготовление, хранение и отбор гомогената из печени.* Процедуры подробно описаны ранее [14]. После декапитации печень быстро извлекали и помещали в ледяную среду гомогенизации: 120 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7,5. ЭДТА и глутамат не добавляли. Орган взвешивали, промывали для избавления от крови ледяной средой гомогенизации. Затем ткань продавливали через пресс из нержавеющей стали с отверстиями 1 мм, полученную массу гомогенизировали в неплотном гомогенизаторе Поттера–Элвехейма с зазором 0,2 мм, вращающимся со скоростью 200 об/мин, используя 3-4 вертикальных прохода пестика при соотношении ткань-среда 1:1. Гомогенат фильтровали через двойной слой капрона. Препарат готов для измерений через 7-10 мин после декапитации и дает стабильные ответы фосфорилирующего окисления в течение 1 часа хранения на льду. Образцы препарата вносили в среду инкубации по 100 мкл (содержание белка 7-8 мг) на 2 мл среды.

*Измерение фосфорилирующего окисления.* Измерения проводили с помощью платинового электрода полярографическим методом.

*Измерение окислительно-восстановительного превращения NAD.* Измерения проводили флуорометрическим методом (366 - 450 нм).

*Поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях.* Измерение проводили по противофазному изменению  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмена с помощью водородного электрода.  $\text{CaCl}_2$  добавляли порциями до спонтанного выброса из митохондрий [13,14]. Сумма поглощенных катионов характеризует  $\text{Ca}^{2+}$ -емкость. В качестве субстрата окисления использовали: сукцинат; сукцинат и глутамат; сукцинат и  $\alpha$ -кетоглутарат; сукцинат, глутамат и  $\alpha$ -кетоглутарат; сукцинат, глутамат и фосфоенолпируват; сукцинат, глутамат и аминоксиацетат; сукцинат, глутамат и малонат.  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкость измеряли на фоне предварительного синтеза АТФ из внесенной в пробу АДФ и без такового.

*Определение скорости синтеза АТФ из АДФ.* Измерение проводили по скорости убыли  $\text{H}^+$  (защелачиванию среды) после добавления по 200 мкМ АДФ.

*Инкубационная среда* для выделенных митохондрий сердца содержала 100 мМ сахарозу, 60 мМ КСl, 1,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 мМ трис-буфер, pH 7,4; для тканевых гомогенатов сердца и печени - 125 мМ КСl, 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ Нерес, pH 7,4,  $t = 25^\circ\text{C}$ . Субстраты окисления и их концентрации указаны в подписях к рисункам. Митохондрии и гомогенат вносили в исследуемую среду с заранее добавленным субстратом окисления. Измерения проводили в течение не более 30-45 мин с момента получения препаратов. Белок измеряли методом Лоури. Во всех исследованиях уровень  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости и скорость синтеза АТФ при моноокислении сукцината приняты за 100%. Результаты обрабатывали по критерию Стьюдента и методом парных сравнений – критерий Вилкоксона U.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** *Ограничивающее дыхание действие  $\alpha$ -кетоглутарата при окислении сукцината.* Внесение  $\alpha$ -кетоглутарата или глутамата к митохондриям сердца собаки, кролика, быка, крысы и голубя вызывает их разнонаправленное действие на последующее окисление сукцината. На примере дыхания митохондрий сердца собаки показано (рис. 1), что  $\alpha$ -кетоглутарат тормозит окисление сукцината (уменьшает дыхание состояния 4, дыхание, стимулированное АДФ и ДНФ), одновременно повышает параметры эффективности фосфорилирования: дыхательный контроль (ДК) = 4,1, АДФ/О = 3,3 против, соответственно, 3,1 и 2,8 на одном сукцинате. Глутамат активирует дыхание на сукцинате, ДК = 3,57, АДФ/О = 2,9.

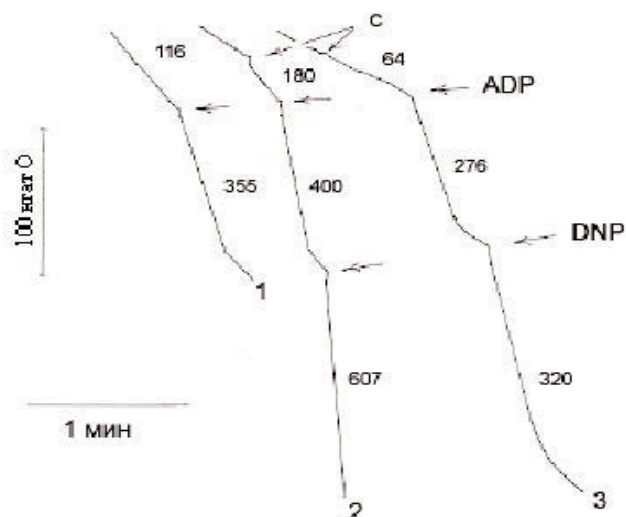
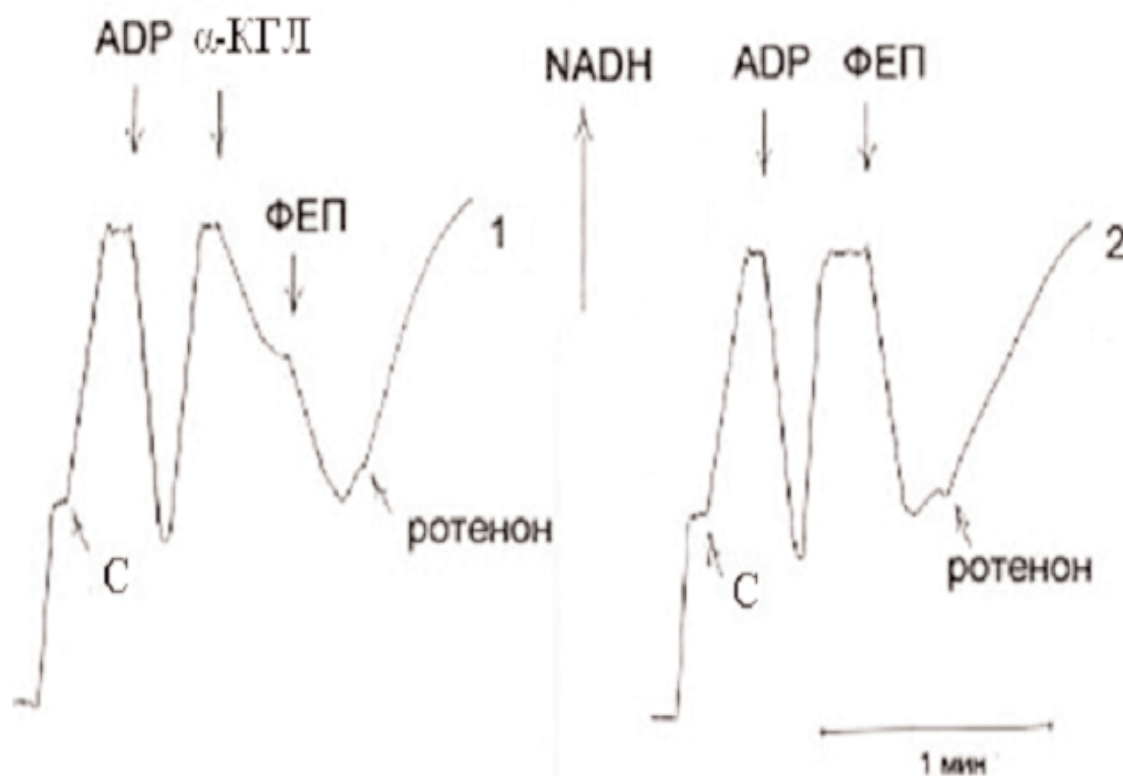


Рисунок 1.

Ограничение  $\alpha$ -кетоглутаратом скорости дыхания при окислении сукцината в различных метаболических состояниях в митохондриях сердца собаки. Среда инкубации общим объёмом в 1 мл содержит: сахарозы 250 мМ, КСl 30 мМ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 мМ, pH 7,5. Субстраты: сукцинат 4 мМ - 1, глутамат 6 мМ - 2,  $\alpha$ -кетоглутарат 6 мМ - 3. Везде АДФ добавлен по 200 мкМ, 2, 4 – динитрофенол 30 мкМ. Субстраты добавлены до внесения в среду митохондрий по 1,5 мг.

## ПОГЛОЩЕНИЕ $\text{Ca}^{2+}$ И ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ

*Влияние  $\alpha$ -кетоглутарата и фосфоенолпирувата на флуоресценцию поддерживаемого окислением сукцината NADH.* Из данных рисунка 2 видно, что в митохондриях сердца кролика  $\alpha$ -кетоглутарат и, гораздо больше, фосфоенолпируват уменьшают исходно высокий уровень восстановленности NAD, поддерживаемый окислением сукцината. Ротенон устраняет окисляющее действие  $\alpha$ -кетоглутарата и фосфоенолпирувата.



**Рисунок 2.**

Уменьшение уровня NADH при ограничивающем окисление сукцината действии  $\alpha$ -кетоглутарата (1) и фосфоенолпирувата (2) в митохондриях интактного сердца кролика. Устранение этого действия ротеноном. Условия инкубации те же, что на рис. 1. Последовательно добавлены: 1. сукцинат 4 мМ, ADP 200 мкМ,  $\alpha$ -кетоглутарат 10 мМ, фосфоенолпируват 2 мМ и ротенон 2 мкМ; 2. то же, что и 1 без  $\alpha$ -кетоглутарата.

*Реципрокность влияния  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата на поддерживаемый окислением сукцината транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ . Влияние фосфоенолпирувата на процесс.* Выявлена (табл. 1 и 2, рис. 3 а-в) высокая чувствительность сукцинатзависимого поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  к изменению концентрационного соотношения глутамата и  $\alpha$ -кетоглутарата в пределах 1÷10 мМ.  $\alpha$ -Кетоглутарат при концентрационном преобладании (10:1) над глутаматом подавляет процесс в сердце голубя на 67%, в сердце и печени крысы на 41% и 48% соответственно и сокращает вдвое (с 3 мин. до 1,5 мин.) продолжительность стабильного удержания катиона. При обратном концентрационном соотношении глутамата к  $\alpha$ -кетоглутарату, равном 10:1, подавляющее действие  $\alpha$ -кетоглутарата не проявляется (рис. 3 б). Следует заметить, что с высокими (10:10) концентрациями сравниваемых субстратов тормозящий эффект  $\alpha$ -кетоглутарата ослабевает и может варьировать между 7-30%.

Таблица 1. Устранение  $\alpha$ -кетоглутаратом активирующего действия глутамата на сукцинатзависимое накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в выделенных митохондриях сердца голубя и гомогенатах сердца и печени у крыс.

Препарат	$\text{Ca}^{2+}$ -ёмкость, нмоль $\text{H}^+$ на мг белка. Прирост ёмкости, %.				
	Субстрат окисления, мМ				
	1. С 2,5	2. С + ГЛУ1	3. С + КГЛ 5	4. С + ГЛУ1 + КГЛ 5	5. С + ГЛУ 10 + КГЛ 5
МХ сердца голубя, (n = 11)	51,4 ± 5 100%	137 ± 9* + 171 100%	47,6 ± 3 - 7,4	42 ± 3* - 19 - 67	-
	1. С 4	2. С + ГЛУ1	2. С + КГЛ 5	4. С + ГЛУ 1 + КГЛ 5	5. С + ГЛУ10 + КГЛ5
Гомогенат сердца крысы, (n = 7)	280 ± 15 100%	548 ± 20* + 96 100%	288 ± 7 + 3	323 ± 17 + 16 - 41**	399 ± 33* + 72* - 14**
	1. С4	2. С + ГЛУ1	2. С + КГЛ10	4. С + ГЛУ 1 + КГЛ 10	5. С + ГЛУ 10 + КГЛ 10
Гомогенат печени крысы, (n = 10)	210 ± 12 100%	399 ± 21* + 90 100%	209 ± 12 - 1	217 ± 17 + 3 - 46	341 ± 37* + 62 - 15

Примечание. % Соотнесён к величине  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости: на сукцинате (С) для 2, 3 и 4 (вторые строчки); на сукцинате и глутамате (С+ГЛУ) для 4 (третьи строчки). \*p=0,01 к величине  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости с добавленным сукцинатом; \*\*p=0,01 к величине  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости с добавленным сукцинатом и глутаматом.

Таблица 2. Устранение  $\alpha$ -кетоглутаратом, фосфоенолпируватом и аминоксиацетатом активирующего действия глутамата на сукцинатзависимое накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в гомогенатах сердца и печени у крыс.

Препарат	$\text{Ca}^{2+}$ -ёмкость, нмоль $\text{H}^+$ на мг белка. Прирост ёмкости, %					
	Субстрат окисления, мМ					
	1. С4	2. С + ГЛУ1	3. С + ГЛУ1 + КГЛ10	4. С + ГЛУ1 + ФЕП1	5. С + ГЛУ10 + АОА 2	6. С+ГЛУ1+ малонат2
Гомогенат сердца n = 3	205 ± 25 100%	*382 ± 15 + 86 100%	*250 ± 24 + 22 - 32	*248 ± 28 + 21 - 35	220 ± 20 + 7 - 48	*85 ± 7 - 59 - 78
Гомогенат печени n = 15	197 ± 20 100%	*422 ± 32 + 114 100%	*276 ± 29 + 40 - 45	*239 ± 28 + 21 - 43	187 ± 9* - 0,5 - 56	*80 ± 7 - 59 - 81

Примечание. % соотнесен к величине  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости: на сукцинате (С) для 2, 3, 4 и 5 (вторые строчки) и на сукцинате и глутамате (С+ГЛУ) для 3, 4, 5 и 6 (третьи строчки). \*p = 0,01 к величине  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости с добавленным сукцинатом.



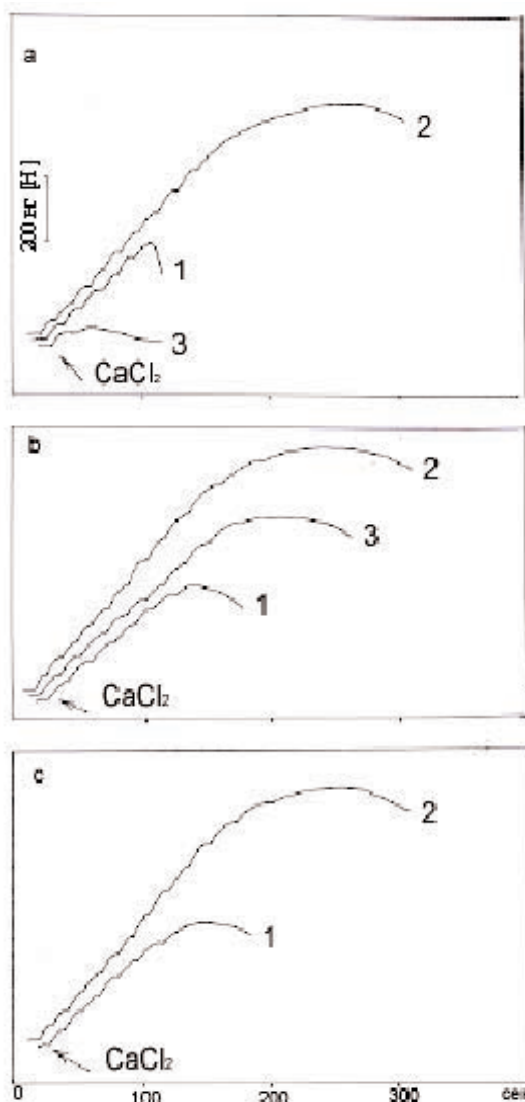


Рисунок 3

Реципрокность действия глутамата и  $\alpha$ -кетоглутарата на зависимое от окисления сукцината поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  в гомогенатах печени у крыс. Устранение  $\alpha$ -кетоглутаратом и фосфоенолпируватом активирующего действия глутамата. Угнетение процесса малонатом. Среда инкубации с общим объемом в 2 мл содержит: KCl 125 мМ, Нерес 1 мМ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 мМ, pH 7,5. Показатели при окислении: **а.** сукцината 4мМ – 1, сукцината и глутамата 1 мМ – 2, сукцината, глутамата и малоната 2 мМ – 3; **б.** сукцината, глутамата 1 мМ и  $\alpha$ -кетоглутарата 10 мМ – 1, сукцината, глутамата 10 мМ и  $\alpha$ -кетоглутарата 1 мМ – 2, сукцината, глутамата 10 мМ и  $\alpha$ -кетоглутарата 10 мМ – 3; **с.** сукцината, глутамата 1 мМ и фосфоенолпирувата 1 мМ – 1, сукцината, глутамата 10 мМ и фосфоенолпирувата 1 мМ – 2.  $\text{CaCl}_2$  добавляли по 100 нмоль.

Следовательно, реализация активации или торможения процесса зависит от соотношения концентраций исследованных субстратов: при превалировании  $\alpha$ -кетоглутарата над глутаматом реализуется тормозящее действие, а при превалировании глутамата над  $\alpha$ -кетоглутаратом, наоборот, активирующее.

Действие  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата, по-видимому, связано единым реципрокным механизмом. Взаимодействие между ними осуществляется через реакцию переаминирования с участием оксалоацетата и аспарагиновой кислоты. Действительно, подавляющее поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  действие 10 мМ  $\alpha$ -кетоглутарата сравнимо с таковым другого источника оксалоацетата - фосфоенолпирувата 1 мМ (табл. 2), которое глутаматом устраняется полностью (рис. 3 б).

Выявлена высокая чувствительность к действию глутамата ингибитора трансаминаз - аминоксиацетата (табл. 2 и 3). Данный ингибитор снижает стимулированное глутаматом поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  и сокращает время стабильного удержания катиона. Доля ингибирующего действия аминоксиацетата превышает таковую на  $\alpha$ -кетоглутарате и/или фосфоенолпирувате и, в среднем составляет 59% от исходного уровня, но уступает действию малоната, ингибитора активности сукцинатдегидрогеназы. Примечательно, что 10 мМ глутаматом ингибирующее действие аминоксиацетата не устраняется.

Таблица 3. Угнетающее действие  $\alpha$ -кетоглутарата, фосфоенолпирувата, аминоксиацетата и малоната на сукцинатзависимое накопление  $\text{Ca}^{2+}$  и скорость синтеза АТР в гомогенатах сердца и печени у крыс.

Препарат	Прирост параметров при фосфорилирующем окислении, %.				
	Параметры	Субстраты окисления, мМ			
		1. $\text{C4} +$ $\text{ГЛУ1}$ $+ \text{КГЛ10}$	2. $\text{C} + \text{ГЛУ1}$ $+ \text{ФЕП1}$	3 $\text{C} + \text{ГЛУ10}$ $+ \text{АОА2}$	4. $\text{C} + \text{ГЛУ1}$ $+ \text{малонат2}$
Гомогенат сердца, (n = 6)	$\text{Ca}^{2+}$ - ёмкость	- 34	- 41	- 52	- 77
	Скорость синтеза АТР	- 4	- 4	- 17	- 90
Гомогенат печени, (n = 9)	$\text{Ca}^{2+}$ - ёмкость	- 39	- 45	- 59	- 86
	Скорость синтеза АТР	- 5	- 3	- 11	- 87

Примечание: % соотношен к величине  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости или скорости синтеза АТР на сукцинате, глутамате и ADP ( $\text{C} + \text{ГЛУ} + \text{ADP}$ ).  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкость составляет для сердца 379, печени 530 нмоль  $\text{H}^+$  на 1 мг белка; скорость синтеза АТР - 28 и 49 нмоль  $\text{H}^+$ /мин на 1 мг белка соответственно.

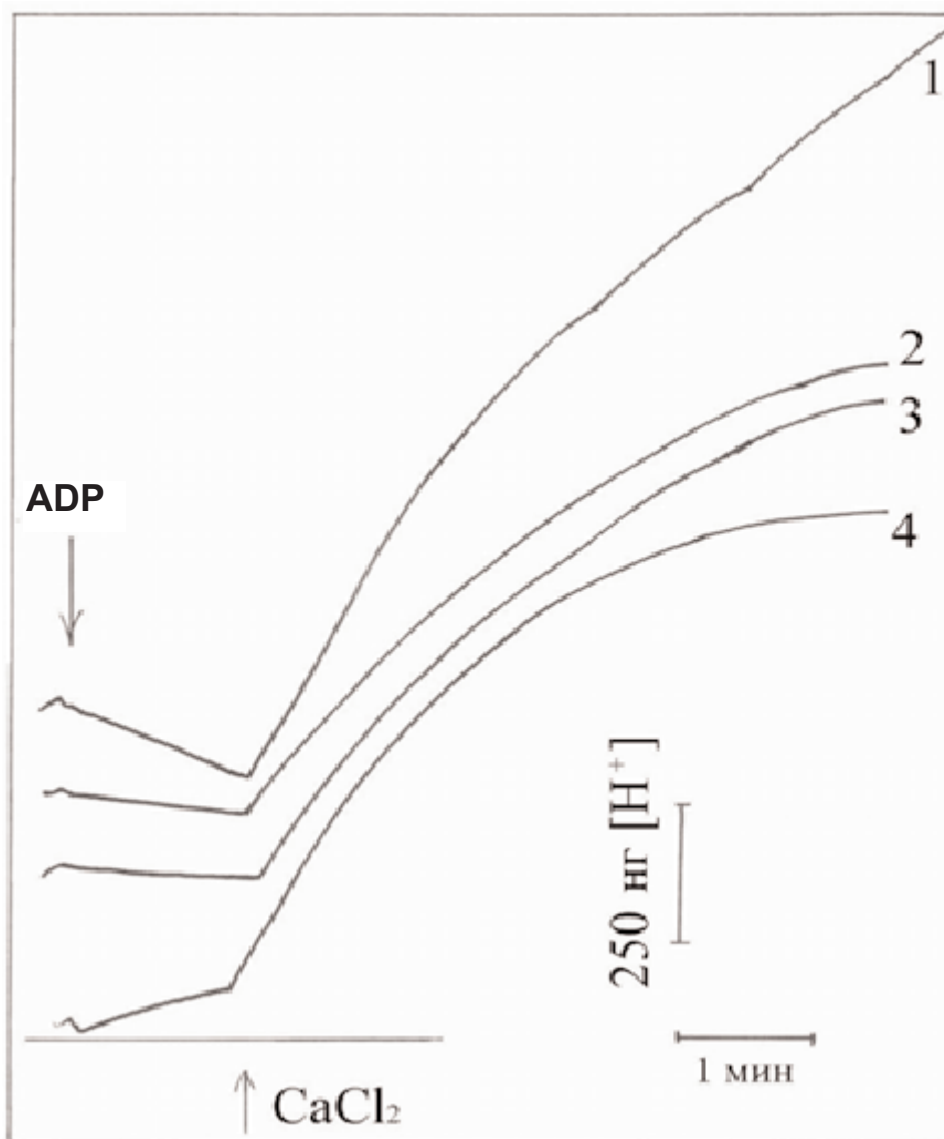
Действие аминоксиацетата на скорость синтеза АТР. Из данных таблицы 3 явствует, что проявление подавляющего влияния аминоксиацетата на гомогенатах сердца и печени существенно слабее по параметру синтеза АТР (11-17%), чем по  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости (52-59%).

В отдельной серии экспериментов (рис. 4) ЭДТА из среды изготовления гомогената сердца изымали. При этом отмечали ослабление ответов митохондрий на добавленные ADP и  $\text{Ca}^{2+}$  в следующем ряду субстратов: сукцинат и глутамат, сукцинат, глутамат и  $\alpha$ -кетоглутарат, наконец, сукцинат, глутамат и аминоксиацетат. Примечательно, что в присутствии аминоксиацетата на внесение ADP взамен защелачивания среды наблюдается закисление, то есть, виден ответ. Сходный ответ отмечали на внесение малоната и арсенита (данные не приведены). Следовательно, в заданных условиях эксперимента ингибитор трансаминаз подавляет продукцию и обеспечение АТР поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  (табл. 3).

Полученные результаты (рис. 1-4, табл. 1-3) подтверждают наши предыдущие данные [11-13] о реципрокности действия  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата, субстратов участвующих в переаминировании, на поддерживаемые окислением сукцината процессы дыхания, восстановления NAD и поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях и гомогенатах сердца и печени экспериментальных животных: кролика, собаки, быка, крысы и голубя. Показано, что глутамат

## ПОГЛОЩЕНИЕ $\text{Ca}^{2+}$ И ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ

активирует дыхание на сукцинате.  $\alpha$ -Кетоглутарат ограничивает это дыхание и одновременно повышает степень сопряженности (рис. 1). Его NADH окисляющее действие усиливается фосфоенолпируватом и снимается ротеноном (рис. 2).  $\alpha$ -Кетоглутарат устраняет активированное глутаматом сукцинат-зависимое поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 3 б). Сходное влияние оказывает и фосфоенолпируват (рис. 3 в).



**Рисунок 4.**

Изменение скорости синтеза АТФ и накопления  $\text{Ca}^{2+}$  при изъятии ЭДТА из среды изготовления гомогената сердца крысы. Условия инкубации те же, что на рис. 3. Среда с ЭДТА - 1, без неё 2–4. Субстрат окисления: сукцинат 4 мМ и глутамат 1 мМ – 1 и 2; сукцинат, глутамат и  $\alpha$ -кетоглутарат 10 мМ – 3; сукцинат, глутамат и аминоксиацетат 2 мМ – 4.

Проведенные исследования подтверждают, что процесс накопления  $\text{Ca}^{2+}$  преимущественно поддерживается окислением сукцината (рис. 3) [13, 16-18]. Стимуляция глутаматом этого окисления обеспечивает повышение  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости в сердце голубя на 171%, в сердце и печени крысы на 96% и 90% соответственно (рис. 3, табл. 1 и 2). Малонатом она полностью устраняется. По-видимому, использованная нами концентрация глутамата 1 мМ не может внести вклад в



накопление  $\text{Ca}^{2+}$ , но оказывается вполне достаточной для запуска реакции переаминирования и устранения оксалоацетата, сильного естественного ингибитора активности сукцинатдегидрогеназы.

В условиях концентрационного преобладания (10 : 1)  $\alpha$ -кетоглутарата над глутаматом реализуется тормозящее накопление  $\text{Ca}^{2+}$  действие (рис. 3 а-в, табл. 1 и 2), которое сменяется противоположным в условиях преобладания глутамата в пределах 1:5 мМ для сердца голубя и крысы и 1:10 мМ для печени крысы. В присутствии высоких (10:10) концентраций названных субстратов их действие перекрывается, ослабевает, приводит к вариациям ответов.

Рассмотренные данные дают основание утверждать, что, по-видимому, добавленный  $\alpha$ -кетоглутарат, в отличие от глутамата, который устраняет путем переаминирования оксалоацетат, обращает процесс, восполняет пул истраченного оксалоацетата.  $\alpha$ -Кетоглутарат, наряду с обеспечением притока, уменьшает расходование оксалоацетата (путем конкурентного ингибирования активности метаболизирующих его ферментов - аспартаттрансаминазы [3], фосфоенолпируваткарбоксикиназы [19]), что может усиливать торможение активности сукцинатдегидрогеназы.

Закключение, что взаимоотношение  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата осуществляется через реакцию переаминирования с участием оксалоацетата и аспартата сделано на основании исследования чувствительности этого процесса к ингибитору аминотрансаминаз, аминоксиацетату. Аминоксиацетат тормозит (табл. 2 и 3) в среднем на 59% накопление  $\text{Ca}^{2+}$ , инициирует срочное освобождение катиона, снижает синтез АТФ (рис. 4). Полученные данные указывают на высокую функциональную чувствительность параметра  $\text{Ca}^{2+}$ -ёмкости к влиянию ингибитора переаминирования.

Можно предположить, что между глутаматом и  $\alpha$ -кетоглутаратом реализуются обратимые превращения по принципу пинг-понг, индуцируемые изменением концентрационных соотношений указанных метаболитов и обеспечивающие попеременную доставку оксалоацетата [3, 20, 21]. В зависимости от доступности оксалоацетата активность сукцинатдегидрогеназы варьирует в широких пределах. Усиление окисления сукцината перемежается с торможением.

Влияние  $\alpha$ -кетоглутарата на окисление сукцината также может обеспечиваться его включением в синтез GTP в субстратном фосфорилировании [22]. Сходство в действии  $\alpha$ -кетоглутарата и фосфоенолпирувата (рис. 3) - поставщиков GTP [22], - это подтверждает. GTP провоцирует ограничение сукцинат-зависимого дыхания [22, 23], поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  [11-13], а также освобождение и переход катиона из одного внутриклеточного депо в другое [24].

Таким образом, рассматривается значение переаминирования, как легко обратимого, подвижно регулируемого метаболического звена в цикле Кребса, посредством которого он осуществляет реципрокную активацию окисления сукцината в митохондриях и гомогенатах сердца и печени у экспериментальных животных: кролика, собаки, быка, голубя и крысы. Переаминирование выступает для цикла Кребса в роли биохимического “сердца”, работа которого регулируется многими естественными метаболитами, инициирующими череду активности - “систола” с отдыхом - “диастолой”, а вариации “пульса” точно отслеживаются изменением сукцинатзависимого поглощения  $\text{Ca}^{2+}$ .

Известно, что аспартаттрансаминаза, с одной стороны, “делит” цикл Кребса на две отдельные части [10, 25], с другой, замыкая на себя, сопрягает (связующая нить) эти части. Высокое содержание аспартаттрансаминазы, ее преимущественная локализация в митохондриях, прочность связи с внутренней мембраной [2, 8], ассоциация в мультиферментный комплекс и работа в “ансамбле” с  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназой [2, 9, 20, 21] обеспечивают высокую динамичность и взаимосогласованность превращения субстратов в системе в целом. Регуляция этого процесса в печени, почке [8], сердце [9, 10] реализуется с участием  $\text{Ca}^{2+}$  [2, 8-10].  $\text{Ca}^{2+}$  преимущественно активирует окисление

образованного из глутамата в аспартаттрансаминазной реакции пула  $\alpha$ -кетоглутарата до сукцината и малата за счет увеличения сродства  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы к собственному субстрату. Данный пул высоко чувствителен и к изменению pH [3, 8-10, 26]. Все сказанное подчеркивает ключевую роль вышеуказанного мультиферментного комплекса в регуляции и координации потоков субстратов между отдельными частями цикла Кребса, а также митохондриями и цитозолем.

Окисление сукцината обеспечивает АТФ накопление  $\text{Ca}^{2+}$  и опосредованные данным катионом интенсивные функции (сокращение, секрецию) [2, 17, 18, 26-28]. Ограничение окисления сукцината  $\alpha$ -кетоглутаратом и продуктами его превращения предупреждает чрезмерное поступление  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 1-3, табл. 1-3), перегрузку  $\text{Ca}^{2+}$ -выводящих каналов и инициацию избыточного образования свободных радикалов в митохондриях. Этим достигается стабильность энергообразовательной функции митохондрий, восполнение фонда АТФ и GTP в тканях, поддержание работы органов в условиях различных физиологических и патологических состояний [2, 7-11].

Результаты работы указывают, что реципрокная регуляция глутаматом и  $\alpha$ -кетоглутаратом сукцинат-зависимого поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  основывается на взаимодействии между легко подвижными трансаминазными реакциями, работой цикла Кребса и электронотранспортной системой митохондрий и, по-видимому, может влиять на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию и формирование  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов в митохондриях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Passarella S., Atlante A., Valenti D., de Ban L. (2003) Mitochondrion, **2**, 319-343.
2. LaNoue K.F., and Tischler M.E. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 23, 7522-7528.
3. Strzelecki T. Strzelecka D., Koch C.D., et. al. (1988) Arch. Biochem. Biophys., **264**(1), 310-320.
4. Sherry A.D., Zhao P., Wiethoff A.J., et. al. (1998) Am. J. Physiol., **274**, H591-H599.
5. Sanborn T., Gavin W., Berkowitz S., Perille T. et al. (1979) Am. J. Physiol., **237**, H535-H541.
6. Snaith Ch.D., Wright G., and Lofkin M. (1992) J. Mol. Cell. Cardiol., **24**, 305-315.
7. Писаренко О.И., Шульженко В.С., Студнева И.М. и др. (2004) Кардиология, **4**, 65-70.
8. Smith B.C., Clotfelter L.A., Cheung J.Y., and LaNoue K.F. (1992) Biochem. J., **284**, 819-826.
9. Wan P., LaNoue K.F., Cheung J.Y. et al (1989) J. Biol. Chem., **264**, 13430-13439.
10. O'Donnell J.M., Doumen Ch., LaNoue K.F., et. al. (1998) Am. J. Physiol., **274**(43), H467-H476.
11. Саакян И.Р. (2003) В кн. Рецепция и внутриклеточная сигнализация, Пушино, с. 270-272.
12. Саакян И.Р. (1976) В сб. Терапевтическое действие янтарной кислоты, Пушино, с. 201-203.
13. Саакян И.Р. (1980) Доклады Академии Наук Арм. ССР, **80**, 110-116.
14. Саакян И.Р., Саакян С.Г., Кондрашова М.Н. (2001) Биохимия, **66**, 976-984.
15. Саакян И.Р., Шердукалова Л.Ф., Саакян Г.Г. (2003) Биомед. химия, **49**, 463-469.
16. Kondrashova M.N., Gogvadze V.G., Medvedev B.I., and Babsky A.M. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun., **109**, 376-381.
17. Maechler P., Wollheim C. (1999) Nature, **402**/9, 685-689.
18. He W., Miao F J.-P., Lin D. C.-H., Schwandner R.T., et. al. (2004) Nature, **429**, 188-193.
19. Titheradge M.A., Picking R.A., and Haynes R.C. (1992) Biochem. J., **285**, 767-771.
20. Fahien L.A., MacDonald M.J., Kmiotek E.H., et. al. (1988) J. Biol. Chem., **263**, 13610-13614.

21. *Teller J.K., Fahien L.A., Valivia E.* (1990) J. Biol. Chem., **265**, 19486-19494.
22. *Olson M.S., Allgyer T.T.* (1973) J. Biol. Chem., **248**, 1582-1589.
23. *Kondrashova M.N., Doliba N.M.* (1989) FEBS Lett., **243**, 153-155.
24. *Tomas A.P.* (1988) Exp. Med. Biol., **232**, 197-201.
25. *Кондрашова М.Н.* (1991) Биохимия, **56**, 388-406.
26. *Duchen, M.* (1999) J. Physiol., **516**(1), 1-17.
27. *Rizuto R., Pinton P., Brini M., Chiesa A., et al.* (1999) Cell Calcium, **26**(5), 193-199.
28. *Lui P.Y., Chan F.L., Suen Y.R., et al.* (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun., **308**, 826-833.

Поступила: 22. 02. 2005

**CORRELATION BETWEEN SUCCINATE-DEPENDENT  $\text{Ca}^{2+}$  ACCUMULATION  
AND TRANSAMINATION IN HEART AND LIVER MITOCHONDRIA  
OF EXPERIMENTAL ANIMALS**

***I.R. Saakyan, G.G. Saakyan***

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow Region,  
42290 Russia; e-mail: saakyan@mail.ru

Glutamate (GLU) and  $\alpha$ -ketoglutarate (KGL), the substrates involved in transamination, have reciprocal effects on succinate-dependent respiration, NADH reduction, as well as on the accumulation and stable retention of  $\text{Ca}^{2+}$  in heart and liver mitochondria and homogenates from experimental animals. The succinate-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation was shown to be highly sensitive to changes of the concentration ratios of GLU and KGL within the range 1:10 mM. GLU activated this process by transamination of oxalacetate (OAA) to aspartate. The predomination of KGL blocked the activating effect of GLU. The predomination of GLU eliminated the block produced by KGL or phosphoenolpyruvate (sources of OAA and GTP) but did not eliminate the  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation-suppressing effect of aminoacetate, inhibitor of transaminases.

**Key words:** transamination, Krebs cycle, mitochondria,  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation, succinate oxidation.