

ДВОЙНАЯ РЕЦИПРОКНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СИСТЕМЫ ОКИСЛЕНИЯ СУКЦИНАТА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА И ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ПАТОЛОГИИ

И.Р.СААКЯН*, А.Г.СААКЯН

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино 142292.
Институт хирургии Минздрава Республики Армения, Ереван

Выявлен феномен реципрокной регуляции сукцинатзависимого $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в митохондриях сердца и печени в условиях патологии у экспериментальных животных (пересадка аллогенного сердца у крыс; инфаркт миокарда у кроликов; коарктация устья легочной артерии у собак), а также при язвенной болезни желудка у человека. В этих условиях в митохондриях сердца и печени происходят сопряженные, но разнонаправленные изменения сукцинатзависимого транспорта кальция: одновременно усиливаются его активация и торможение. Торможение транспорта кальция выявляется путем его снятия глутаматом, что наиболее отчетливо проявляется после цикла фосфорилирования добавленной к суспензии митохондрий АДФ. Лечение 2 α -кетоглутаратом нивелирует это торможение, которое не отмечается у интактных животных. По-видимому, показанный феномен представляет механизм предотвращения гиперактивации окисления сукцината при сильных патологических дистрессорных воздействиях.

Ключевые слова: патология, сердце, печень, окисление сукцината, транспорт кальция, митохондрии.

ВВЕДЕНИЕ. Адаптационно-регуляторные изменения в организме при неблагоприятных воздействиях формируются на всех уровнях, в том числе на уровне системы окисления сукцината в митохондриях [1-4]. Сукцинат по мощности накопления энергии превосходит другие субстраты трикарбонового цикла [1,5], что определяет его особую роль в регуляции энергетики клетки и выработке устойчивости организма к интенсивным нагрузкам [1-4].

В условиях стресса у животных усиливается сукцинатзависимое (СЗ) дыхание митохондрий [2-4,6,7]. Сопряженно с усилением дыхания развивается и обратный процесс - торможение, которое выявляется с помощью активаторов сукцинатдегидрогеназы [2-4,7]. Предполагается, что ее физиологическая роль заключается в недопущении гиперактивации окисления сукцината. Явление сопряженного усиления активации и торможения СЗ дыхания описаны для митохондрий различных органов, исключая сердечную мышцу. Мы предположили, что вышеуказанные регуляторные соотношения в митохондриях, по-видимому, могут иметь гораздо более широкое проявление, которое выявляется не только по показателям СЗ дыхания, но и другим СЗ процессам - ,например, транспорту кальция [8].

Настоящая работа посвящена проверке данного предположения: в ней исследовались показатели $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ обмена в митохондриях сердца и печени в условиях экспериментальных моделей патологий у нелеченых и леченых α -кетоглутаратом (КГ) животных, а также печени больных с язвенной болезнью желудка. КГ избран как средство, избирательно регулирующее окисление сукцината [9].

МЕТОДИКА. В работе использовались следующие модели патологий.

- 1) Пересадка сердца: крысам популяции Вистар (46 животных) подсаживали сердце от крыс популяции Август [10]. Из их числа 11 крыс лечили природным метаболитом - α -кетоглутаратом (КГ); который вводили ежедневно внутривентрально по 50 мг на кг веса животного. Срок наблюдений от 2 дней до 10. Объект исследования - печень реципиента. Ранее мы показали [11,12], что для данной модели патологии характерной является фазность изменения окисления сукцината митохондрий печени: начальная гиперактивация дыхания (2-4 сутки) сменяется его торможением (5-10 суток).
- 2) Ишемическое повреждение миокарда вызывали перевязкой коронарной артерии у 6 кроликов. Срок наблюдений 2 суток.
- 3) Функциональная перегрузка миокарда - коарктация устья легочной артерии у 7 собак, срок 11 месяцев. Объект исследования у кроликов и собак - сердечная мышца. Кроме того, исследовали митохондрии операционных биоптатов печени четырех больных с язвенной болезнью желудка.

В качестве контроля служили митохондрии печени и сердца интактных животных: крыс - 34, кроликов - и собак - по 2.

Животных забивали под эфирным наркозом. Митохондрии из ткани печени и сердца выделяли модифицированным способом, предусматривающим сохранность нативных свойств митохондрий в ткани [2]. Выход протона в суспензию митохондрий в обмен на добавленный CaCl_2 измеряли с помощью стеклянного электрода на рН-метре 540 с регистрацией на самописце EZ-5. CaCl_2 вносили к суспензии митохондрий дробно до полного насыщения и последующего спонтанного выброса из митохондрий. Эти измерения соответствуют измерению Ca^{2+} емкости митохондрий. Их проводили в следующих метаболических состояниях: в присутствии сукцинат-+глутамата до и после цикла фосфорилирования АДФ. Учитывали показатели Ca^{2+} емкости и скорость синтеза АТФ из АДФ. Концентрацию белка определяли методом Лоури [13]. Результаты обрабатывали методом парных сравнений и вариационной статистики [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Из данных рис 1. видно, что в динамике иммунного конфликта (при пересадке сердца) в митохондриях печени на фоне окисления сукцината происходят параллельные изменения транспорта кальция: с одной стороны, величина накопленного кальция возрастает, с другой - нарастает также торможение этого процесса, которое проявляется, как правило, в условиях дополнительно внесенного к суспензии митохондрий глутамата.

Увеличение накопления кальция в митохондриях печени отмечается уже на 2-4 сутки после пересадки сердца (рис. 1, столбик 2). С удлинением периода после пересадки сердца с 2-4 суток до 5-10 суток Ca^{2+} - емкость продолжает оставаться увеличенной, но это увеличение проявляется только при дополнительном внесении глутамата (рис.1, столбики 3-5). Глутамат практически не изменяет величину накопленного кальция в митохондриях печени у интактных животных и животных с начальной патологией (рис.1, столбики 1 и 2 соответственно), но в более поздние сроки стимулирует это накопление (рис.1, столбики 3-5). Доля стимулированного глутаматом транспорта кальция на 5-10 сутки патологии составляет значительную часть его величины без глутамата (условно принятого за исходный уровень) и превышает этот уровень (+ 67,5%, $p < 0,01$ - см. табл. 1).

Стимулирующее действие глутамата на Ca^{2+} емкость митохондрий на 5-10 сутки патологии проявлялось в гораздо большей степени, если ее величину измеряли после цикла фосфорилирования АДФ и увеличения фонда АТФ, необходимого для поддержания ионного транспорта (рис. 2). На рис. 2 сравниваются показатели Ca^{2+} емкости митохондрий после цикла фосфорилирования АДФ без глутамата и с глутаматом (заштрихованные столбики, левый и правый, соответственно)

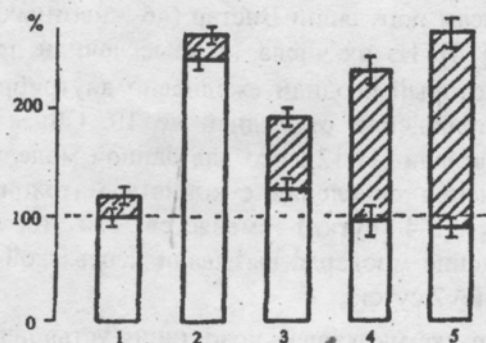


Рисунок 1.

Активация и торможение сукцинатзависимого транспорта кальция в митохондриях печени при пересадке аллогенного сердца у крыс. Интактные животные - 1; животные после пересадки сердца: через 2-4 суток - 2 и 5-10 суток - 3-5. Светлые столбики - величина Ca^{2+} - емкости при окислении сукцината, заштрихованные столбики (весь столбик) - сукцинат+ глутамата.

Заштрихованные части столбиков - доля стимулированной глутаматом Ca^{2+} емкости.

Среда инкубации общим объемом в 2 мл содержит в (мМ): сахарозу 100, KCl 60, трис 1,5, KH_2PO_4 1,5, pH 7.4. Субстрат окисления: сукцинат 8 мМ, глутамат 2 мМ. CaCl_2 добавляли дробно по 100 мкМ. По оси ординат за 100% принята величина Ca^{2+} емкости на сукцинате у интактных животных, n - по 3-4 крысы в каждой группе, $p < 0,01$.

Таблица 1. Изменение Ca^{2+} емкости митохондрий печени при пересадке сердца у крыс

Вид опыта, (количество животных)	Ca^{2+} емкости на субстратах ($\text{M} \pm \text{m}$), в нг [H+] на мг белка:		Прирост Ca^{2+} емкости, в %:
	СУКЦ	СУКЦ+ГЛУТ	СУКЦ+ГЛУТ/СУКЦ
Контроль (26)	240, 17 \pm 11,2	254,04 \pm 11,48	105,8 (+5,78)
Пересадка сердца:			
2-4 сутки (12)	615,2 \pm 83,4	617,2 \pm 45,6	100,3 (+0,3)
5-10 суток (19)	204,7 \pm 24,5	*342,9 \pm 19,7	167,5 (+67,5)

* $p < 0,01$ от уровня на СУКЦ в соответств. Группе животных

относительно таковых, измеренных в отсутствии добавленных АДФ и глутамата (светлые столбики). Видно, что у всех животных Ca^{2+} - емкость после цикла фосфорилирования АДФ увеличивается ($p < 0,01$), причем ее прирост с глутаматом выше, чем без глутамата. Однако различия между последними достоверны только для групп животных с продолжительным сроком патологии.

Из данных таблицы 2 следует, что на 5-10 сутки патологии под влиянием глутамата прирост Ca^{2+} - емкости после цикла фосфорилирования АДФ составляет у нелеченых животных 108%, против 25,9% в отсутствии глутамата. Введение α -кетоглутарата нивелирует это различие: соответствующие показатели составляют 66,4% и 77,9%. (Контроль: 76% и 80,7%; начальная стадия патологии 29,6% и 24,4%). Показано (табл. 3), что различие в способности митохондрий к накоплению кальция в сравниваемых группах животных коррелирует с неодинаковой скоростью синтеза АТФ. Она на 2-4 сутки патологии превышает (+53%, $p < 0,01$) уровень контроля, но через 5-10 суток снижается. Соответственно, способность митохондрий к поглощению кальция в указанные сроки патологии измеряется 5 или 2 дробными добавками CaCl_2 . Каждая из последующих его добавок, (6 или 3) вызывает спонтанный выброс катиона из митохондрий, что свидетельствует о разной степени устойчивости митохондрий к нагрузкам кальция.

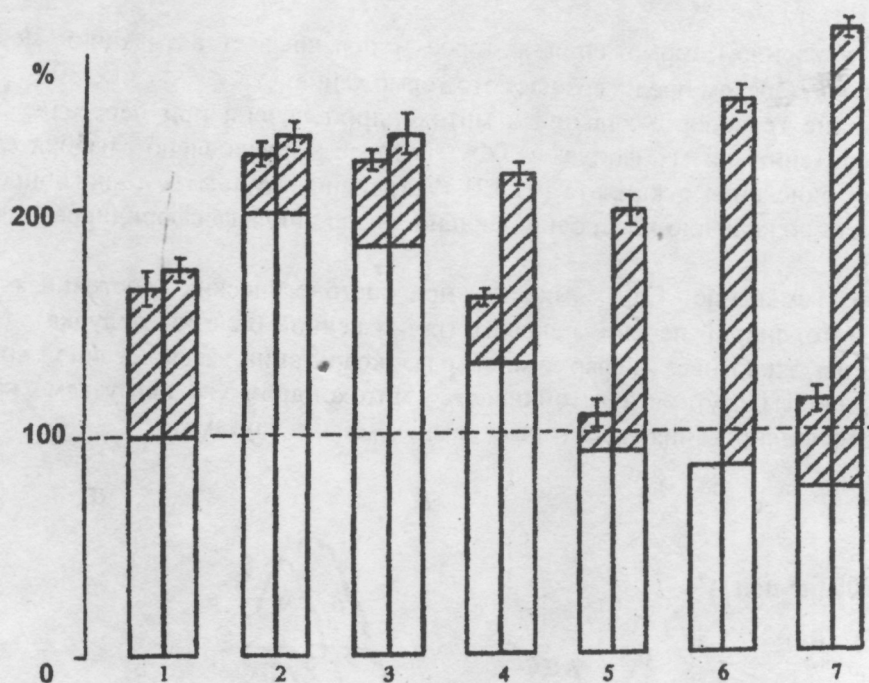


Рисунок 2.

Стимуляция глутаматом сукцинатзависимого транспорта кальция после цикла фосфорилирования АДФ в митохондриях печени при пересадке аллогенного сердца у крыс. Интактные животные - 1; животные после пересадки сердца: через 2-4 суток - 2-3 и через 5-10 суток - 4-7. Везде светлые столбики величина Ca^{2+} емкости при окислении сукцината, заштрихованные столбики - то же при окислении сукцината после синтеза АДФ: без глутамата (левый столбик) и в присутствии глутамата (правый столбик).

Заштрихованные части столбиков, соответственно, - доля стимулированной АДФ Ca^{2+} емкости. Условия опыта те же, что и на рис.1. АДФ везде добавляли по 200 мкМ. п - 2-5 в каждой группе животных. $P = 0,01$.

Таблица 2. Стимуляция транспорта Ca^{2+} после цикла фосфорилирования АДФ в митохондриях печени при пересадке сердца у крыс.

Вид опыта, (количество животных)	Са ²⁺ емкости до и после цикла фосфорилирования АДФ на субстратах в [Н+] на мг белка:			Прирост Са ²⁺ емкости, (в %)	
	СУКЦ	СУКЦ+АДФ	СУКЦ+ГЛУ Т+АДФ	СУКЦ+АДФ/ СУКЦ	СУКЦ+ГЛУТ+ АДФ/СУКЦ
Контроль (17)	234,9±16,9	413,4±36,5*	425,0±26,5*	176,0(76)	180,7(+80,7)
Пересадка сердца:					
2-4 сут. (7)	493,25±80,8•	609,25±32,0•	639,25±24,6•	124,4(+24,5)	129,6(+29,6)
5-10 сут. (9)	176,5±24,5	222,1±30,0•	367,2±20,1*	125,85(+25,85)	208,0(+108)
7 сут.+лечение (11)	196,8±14	367,5±16,5*	350±27*	166,4(+66,4)	177,85(+77,85)

• $p=0,01$ от контроля; * $p<0,01$ от Са²⁺ емкости с сукцинатом в соответствующей группе животных.

Из полученных данных следует, что усиление СЗ транспорта кальция в митохондрии печени в процессе иммунного конфликта в организме у крыс происходит, на самом деле, на протяжении всего периода, однако его проявление маскируется

сопряженным усилением торможения, которое и перекрывает активацию. Лечение животных α -кетоглутаратом предотвращает это торможение.

Торможение транспорта кальция в митохондриях печени при пересадке сердца коррелирует со снижением фонда АТФ, которое обусловлено избирательным ингибированием окисления сукцината [11,12]. Устранение глутаматом ингибирования повышает емкость по кальцию и, особенно сильно, после цикла фосфорилирования АДФ (рис. 2; табл. 2).

Сходное изменение Ca^{2+} емкости при патологических состояниях было обнаружено в митохондриях печени человека (при язвенной болезни желудка), а также сердечной мышцы животных (инфаркт миокарда, коарктация устья легочной артерии) (рис.3). Под влиянием глутамата устойчивость митохондрий к нагрузкам кальция после цикла фосфорилирования АДФ гораздо выше, чем без глутамата.

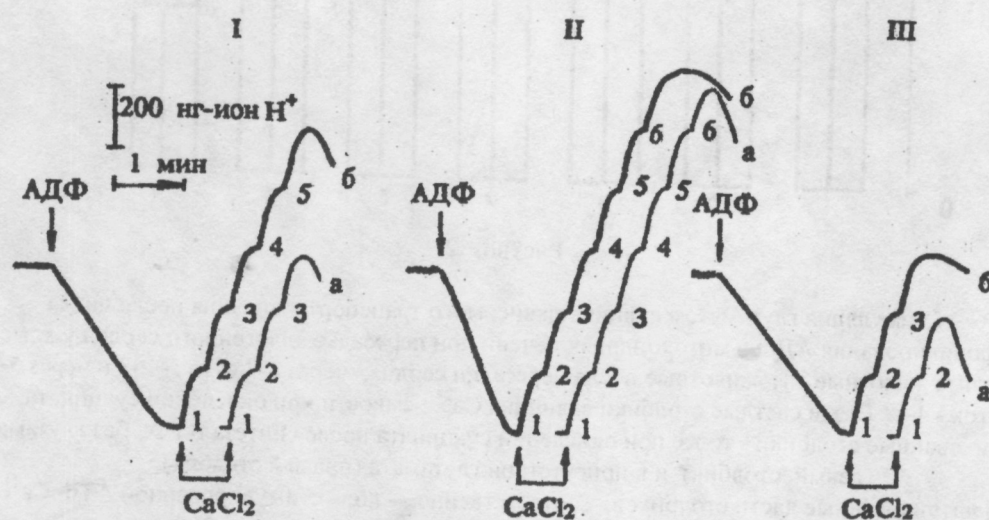


Рисунок 3.

Изменение интенсивности, синтеза АТФ из АДФ при окислении сукцината и последующего накопления кальция в митохондриях печени крыс с пересаженным сердцем. I - интактные животные; II - животные через 2 сут и III - через 5 сут после пересадки сердца. Условия инкубации - как на рис. 1. Везде субстрат окисления - сукцинат: а - без АДФ, б - после цикла фосфорилирования АДФ. Везде добавляли CaCl_2 дробно по 200 нмоль

Таблица 3. Изменение интенсивности фосфорилирования АДФ в митохондриях печени при пересадке сердца у крыс ($\text{M} \pm \text{m}$).

Вид опыта, (количество животных)	Скорость синтеза АТФ, нг $[\text{H}^+]/\text{мин}$ на мг	в: %
Контроль (34)	$107,6 \pm 7,9$	100
Пересадка сердца:		
2-4 сутки (16)	$*164,7 \pm 18,8$	153(+53)
5-10 суток (19)	$*75,3 \pm 7,5$	70,3 (-29,7)
7 сут.+лечение КГ (11)	$*124,65 \pm 6,6$	115,8 (+15,8)

* $p < 0,01$ от контроля

Выявленный феномен сопряженного усиления двух противоположных процессов: активации и торможения СЗ транспорта кальция в митохондриях сердца и печени (рис.1- 3), по-видимому, представляет регуляторные изменения окисления сукцината в условиях патологий. У получивших α -кетоглутарат животных этот феномен не выражен.

Изменения окисления сукцината примечательны своими защитными эффектами: активация усиливает образование энергии и транспорт кальция; торможение защищает митохондрии от возможного повреждения, сдерживает тенденцию к избыточному выходу и отложению в мембранах кальция [11,12,15-17]. Однако чрезмерное развитие любого из

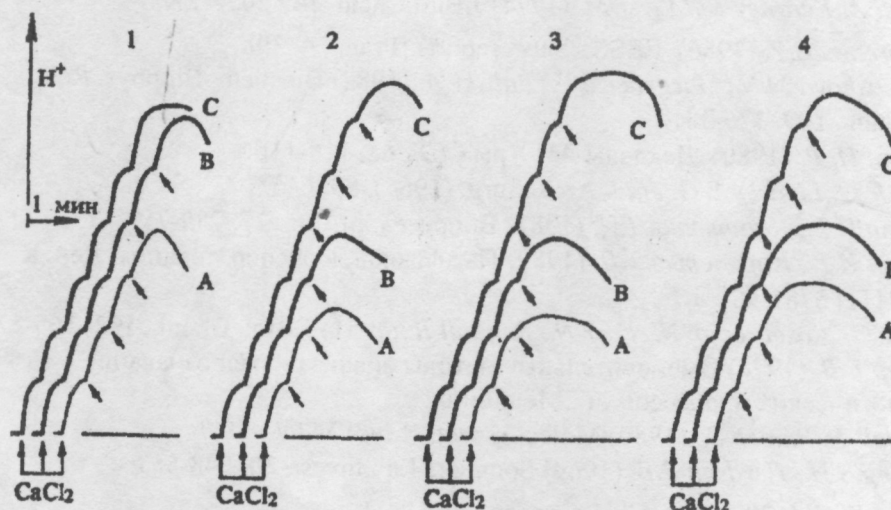


Рисунок 4

Стимуляция глутаматом сукцинатзависимого транспорта кальция после цикла фосфорилирования АДФ в митохондриях сердечной мышцы у экспериментальных животных и в митохондриях печени человека в условиях патологий

1) Интактные животные (кролик или собака, n=2); 2) животные после перевязки коронарной артерии, 2 суток (кролик, n=6) 3) после коарктации легочной артерии, 11 месяцев (собака, n=7); 4) митохондрии печени человека (операционный биоптат) при язвенной болезни желудка (n=4)

Везде: А - Ca^{2+} емкость при окислении сукцината; при окислении сукцината+АДФ - В и сукцинат+глутамата+АДФ - С. Условия инкубации как на рис. 1 и рис. 2.

этих стратегий, по-видимому, может выступить в качестве основного звена патогенеза, в то время как их сопряженное развитие - "дуалистический контроль" - фактором сохранения равновесия или "естественной профилактики" повреждений [18-20].

Выявленные нами биохимические изменения в митохондриях в условиях патологий очень сходны с аналогичными в физиологических системах, где сопряженно с возбуждением усиливаются тормозные механизмы: стресс-лимитирующие системы противостоят стресс-реализующим [20] и направлены на ограничение потенциально опасного возбуждения. Полагаем, что изучение механизма регуляции митохондриальных процессов в условиях патологии может способствовать поиску новых путей и средств их целенаправленной коррекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондрашова М.Н. (1972). Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций М.: Наука, 151-170.
2. Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В. (1985) Ж. общей биологии. 4.517- 524.
3. Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В., Бабский А.М., В.А. Хазанов (1987) Молекулярные механизмы клеточного гомеостазирования. Новосибирск: Наука, 40-63.

4. Кондрашова М.Н. Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена. Пушино, (1987) 140-155.
5. Chance B., Hollunger G. (1961) J. Biol. Chem., **230**, 1534-1543.
6. Ackrell A., Kearney E., Mayer M. (1974) J. Biol. Chem. **249** 2021-27.
7. Grigorenko E. V. (1986) EBSS, Short reports. [Praga] **4**. 398.
8. Kondrashova M.N., Gorgvacize V., Babsky A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun., **109**, 376-381.
9. Саакян И. Р. (1980) Доклады АН Арм.ССР, **65**, 110-116.
10. Abbot C., Lindsey E.G. et.al. Arch. Surg. (1964), **89**, 645.
11. Саакян И.Р., Каранетян Т.Д. (1981) Вопр. мед. химии, **27**, 755-759.
12. Саакян И.Р., Каранетян Т.Д. (1989) Пат. физиол. и экспер. терапия. Деп. в ВИНТИ **5781-B**.
13. Lowry O., Rosebrough N., Farr N., Randall R. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 165-175
14. Гублер Е.В. (1978) Вычислительные методы анализа и распознавание патологических процессов. Л.: Медицина.
15. Carafoli E., Roman S. (1980) Molec Aspects. Med. **3**. 297-429.
16. Jennings S.H., Herdson P.B. (1969) Sommers Lab. Invest. **20**. 548-557.
17. Nayler W.G. (1987) Ann. Chir. Gynecol. **75**. 13-11.
18. Саркисов Д. С. (1977) Очерки по структурным основам гомеостаза. М: Медицина.
19. Кулинский В. И. (1980) Успехи совр. биол. **90**, 382-393.
20. Меерсон Ф.З. (1984) Патогенез и предупреждение стрессовых и ишемических повреждений сердца. М: Медицина.

THE DUAL RECIPROCAL REGULATION OF SUCCINATE OXIDATION IN HEART AND LIVER MITOCHONDRIA UNDER PATHOLOGY

I.R. SAAKYAN, H.G. SAHAKYAN.

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences, 142292, Pushchino, Moscow region, Russia ; Surgery Institute of Armenian Ministry of Health, Republic of Armenia.

The phenomenon of the dual reciprocal regulation of succinate dependent $2H^+/Ca^{2+}$ exchange was studied in heart and liver mitochondria of experimental animals (allogenic heart transplantation in rat; myocardium infarction in rabbits; pulmonary arteria coarction in dogs) and in liver bioplates from patients with stomach ulcer.

Under pathology two coupled but opposite changes (simultaneous activation and inhibition) in succinate dependent Ca^{2+} transport occur. The inhibition of Ca^{2+} transport was detected by its elimination with glutamate, being mostly pronounced after cycle of ADP phosphorylation added to suspension of mitochondria. The treatment of animal with 2-oxoglutarate abolished this inhibition. This was not observed in healthy animals.

The described phenomenon can prevent hyperactivation of succinate oxidation under strong pathological (distress) influences.

Key words: pathology, heart, liver, succinate oxidation, Ca^{2+} transport, mitochondria