ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

LXX 1980 2

УДК 576.311.347—575.100.8 (611.12+611.33)

БИОХИМИЯ

И. Р. Саакян

Ограничение α-кетоглутаратом скорости окисления сукцината в митохондриях сердца и печени

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Буниятяном 31/X 1979)

Митохондриальная система окисления сукцината (СУК) как наиболее интенсивного поставщика богатых энергией соединений в дыхательную цепь, а также протонов в фонд пиридиннуклеотидов занимает центральное место в регуляции энергетики клетки и функциональном состоянии организма ([1,2]). Среди факторов, регулирующих интенсивность окисления СУК в сукциндегидрогеназной (СДГ) реакции, в основном указываются или уровень восстановленного никотинамиддинуклеотида (НАДН) и связанного с ним восстановленного убихинона ([3-5]) или уровень эндогенной щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) ([1,6]). Принято считать, что действие на активность СДГ других субстратов: глутамата (ГЛ), пирувата (ПИР) или α-кетоглутарата (КГ) — источников образования ЩУК, реализуется через ЩУК.

В настоящей работе описано двукратное снижение КГ скорости окисления СУК в метаболическом состоянии 4 дыхания митохондрий (МХ) сердца кролика, собаки и крысы, а также печени кролика и крысы. Этот эффект, названный ограничивающим окисление СУК, связан с умеренным окислением НАДН в зоне исходно высокой их восстановленности. Он дифференцируется от действия ЩУК и, по-видимому, связан с индукцией КГ синтеза глутамата, приводящего к уменьшению восстановленности дыхательной цепи и к снижению активности СДГ. Работа подчеркивает взаимосвязь работы цикла Кребса и дыхательной цепи МХ с реакциями биосинтеза.

Материал и методы. Ткань сердца (кролик, собака и крыса) и печени (кролик и крыса) измельчали ножницами, а затем гомогенизировали в обоих случаях в стеклянном гомогенизаторе с пестиком из фторопласта. МХ осаждали методом дифференциального центрифугирования по 10 *мин* при 760 и 5000 *g* для печени и 1000 и 9000 *g* для сердца. Среда гомогенизации и среда суспендирования МХ печени содержала 0,3 М сахарозу, 0,003 М трис-HCl (pH 7,5), среда гомогенизации МХ сердца содержала 0,3 М сахарозу, 0,008 М ЭДТА (pH 7,5) и среда

суспендирования — 0,3 М сахарозу, 0,01 М трис-HCl (pH 7,5). Температура выделения МХ 2—4°С.

Потребление кислорода измеряли полярографическим методом, уровень НАДН — флуоресцентным методом, транспорт водорода — потенциометрическим методом. Белок МХ определяли методом Лоури

Результаты и обсуждение. При добавлении КГ к МХ сердца кролика, собаки и крысы или печени кролика и крысы наблюдали снижение скорости окисления СУК. Этот эффект показан на примере дыхания МХ сердца крысы (рис. 1) (результаты изображены в форме диаграмм дыхания, построенных на основе полярографического измерения). Показано, что внесение КГ в пробу и проведение цикла фосфорилирования АДФ до добавления СУК приводит к уменьшению ско-

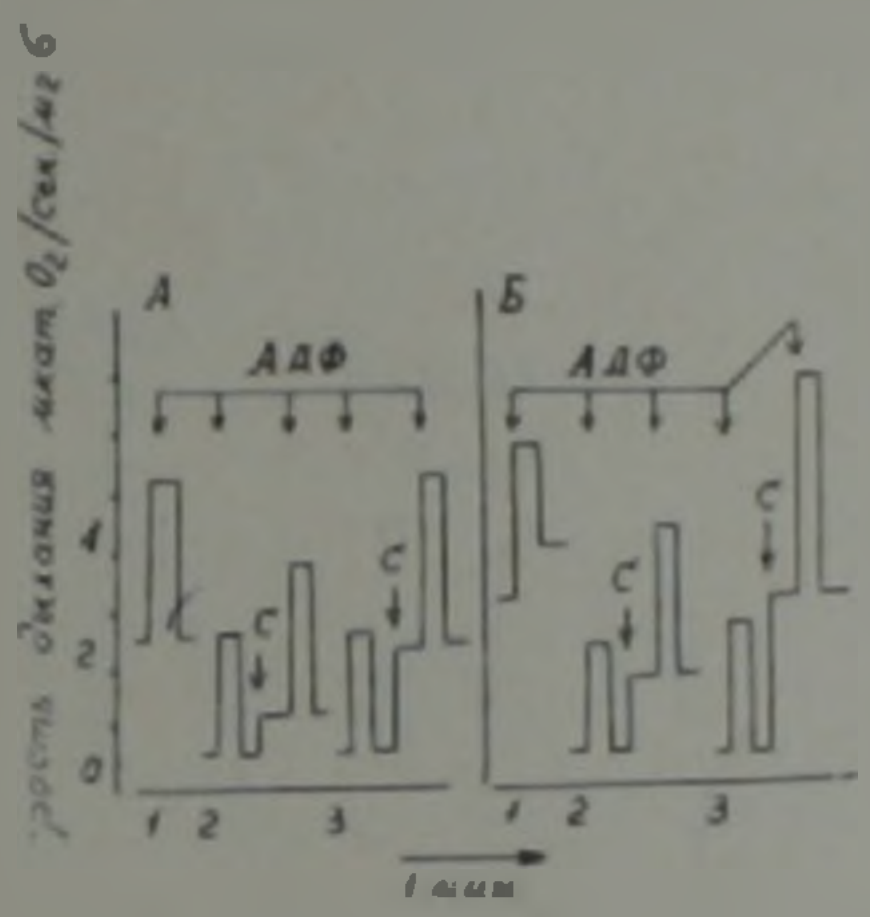

Рис. 1. Ограничение α-кетоглутаратом скорости окисления сукцината в метаболическом состоянии 4. *А*—свежевыделенные МХ сердца крысы; *Б*—через 2 ч хранения на льду. Среда инкубации общим объемом 1 мл содержит 0,25 М сахарозу, 0,03 М KCl, 0,015 М KH_2PO_4 (pH 7,5) Добавки 4 мМ сукцината, 6 мМ α-кетоглутарата, глутамата и пирувата. АДФ 200 мкМ До добавления в среду инкубации МХ внесены *1*— сукцинат; *2*— α-кетоглутарат, *3*—глутамат или пируват

рости последующего дыхания на СУК. Оно происходит преимущественно за счет уменьшения скорости дыхания в состоянии 4, что составляет 50—60% на свежевыделенных МХ (рис. 1, *А*) и 40% на МХ с ускоренным дыханием состояния 4 и со сниженными параметрами сопряжения (уменьшением дыхательного контроля по Чансу, удлинением времени фосфорилирования АДФ) в результате 2-часового хранения на льду (рис. 1, *Б*). Как показано на рисунке, другие НАДзависимые субстраты (НАДЗС), такие как ГЛ или ПИР, не обладают действием, подобным влиянию КГ: их внесение не меняет последующей скорости

дыхания МХ на СУК. Показано, что СУК окисляется интенсивнее, чем НАДЗС. Скорость дыхания на СУК превышает таковую на НАДЗС в состоянии 4 в 5—6 раз, а в состоянии 3 — в 1,5—2 раза. После 2-часового хранения МХ разница между скоростями дыхания на СУК и на НАДЗС увеличивается, так как дыхание на СУК возрастает, а на НАДЗС не меняется. Внесение КГ ограничивает скорость окисления СУК, одновременно повышая параметры сопряжения. Поэтому эффект КГ на окисление СУК обозначаем как ограничивающий, а не как тормозящий.

Измерение степени восстановленности НАД в МХ сердца кролика (рис. 2) и печени крысы (рис. 3) показало, что описанный эффект связан с 15—30%-ным окислением НАДН, наблюдаемым только в зоне высокого его восстановления, обеспечиваемого внесением СУК или ротенона (рис. 3). Добавление КГ к МХ с низким (менее 50%) исходным

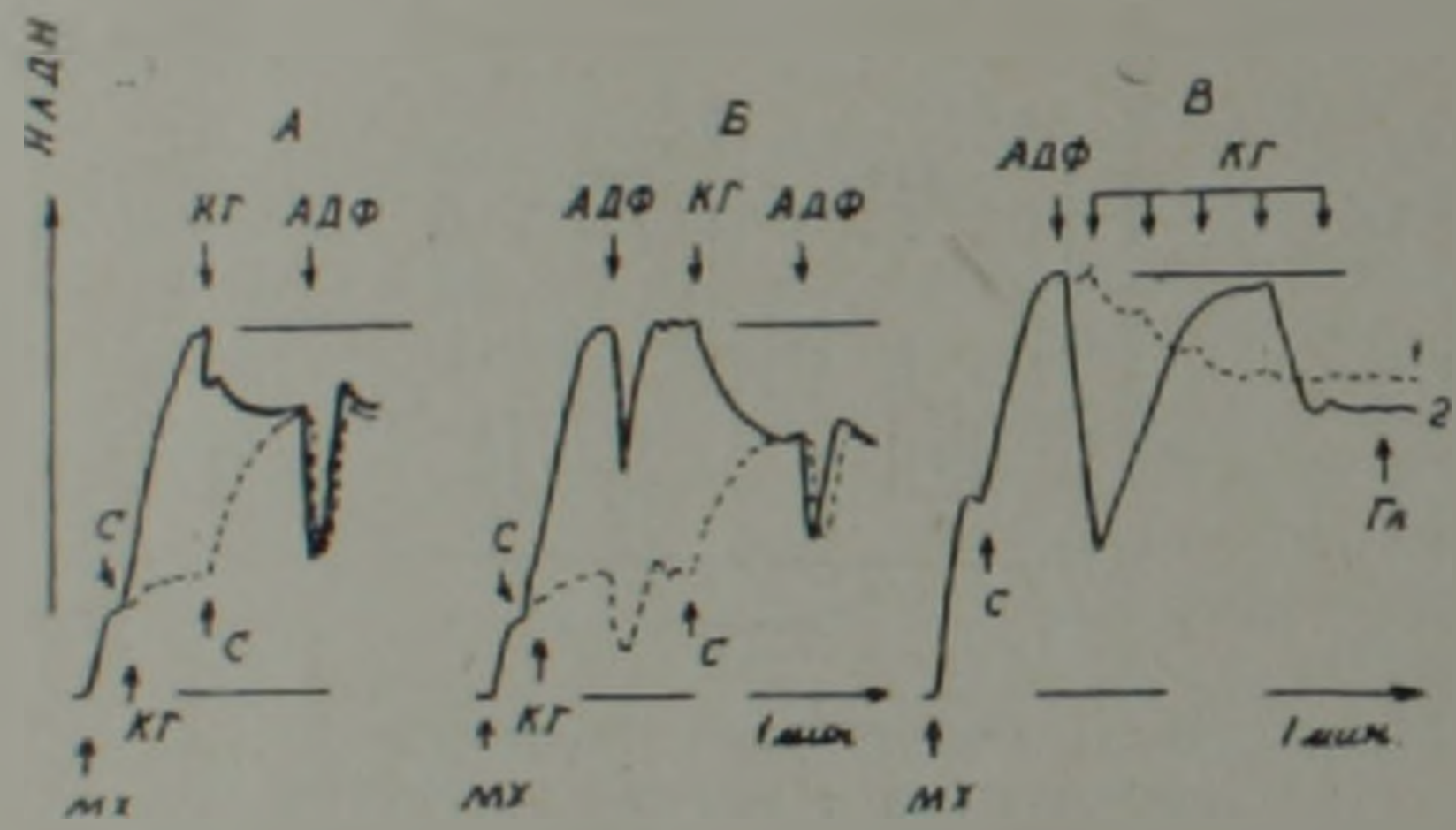

Рис. 2. Умеренное окисление НАДН при ограничивающем окисление сукцината действии α-кетоглутарата на МХ сердца кролика (*А*, *Б*) и крысы (*В*). Усиление окисляющего НАДН действия α-кетоглутарата после цикла фосфорилирования АДФ. *А*, *В*, *1* и *Б*, *В*, *2*—до и после фосфорилирования АДФ. Условия инкубации как в подписи к рис. 1, кроме концентрации *В*, *1*—α-кетоглутарата—добавки последовательно до 3, 6, 9 и 12 мМ и *В*, *2*—АДФ — 150 мкМ

уровнем НАДН приводит к противоположному эффекту: восстановлению НАДН примерно на 10—15%. Последующее внесение СУК обеспечивает дополнительно восстановление НАД, однако оно (как и дыхание в состоянии 4) оказывается ограниченным и достигает того же уровня, что и при добавлении КГ после СУК (рис. 2, 3). Показано, что реакции при внесении АДФ, так же, как и при измерении дыхания, не подвержены влиянию КГ. Однако степень окисляющего действия НАДН КГ усиливается после цикла фосфорилирования АДФ и накопления в МХ АТФ (рис. 2, 3). На рис. 2, *В* показано, что и при дробном добавлении КГ каждая добавка по 3 мМ до цикла фосфорилирования вызывает окисление НАД примерно на 10%. После цикла фосфорилирования уже одна добавка КГ вызывает окисление СУК более чем на

30%, что превышает суммарный эффект от трех добавок до фосфорилирования. ГЛ на этом фоне не обращает окисления НАДН КГ.

Предполагаем, что одним из вероятных объяснений действия КГ, вызывающего окисление СУК и связанное с ним окисление НАДН на высокоэнергизованных МХ, представляется следующее включение реакции восстановительного аминирования КГ, в процессе которого НАДН расходуется на синтез глутамата. Действительно, аммиак как непосредственный субстрат реакции синтеза глутамата усиливает окисление НАДН КГ как в МХ печени (рис. 3), так и в МХ сердца

Возможность же ограничивающего действия КГ на окисление СУК под влиянием образованной из нее ЩУК исключается следующими доводами:

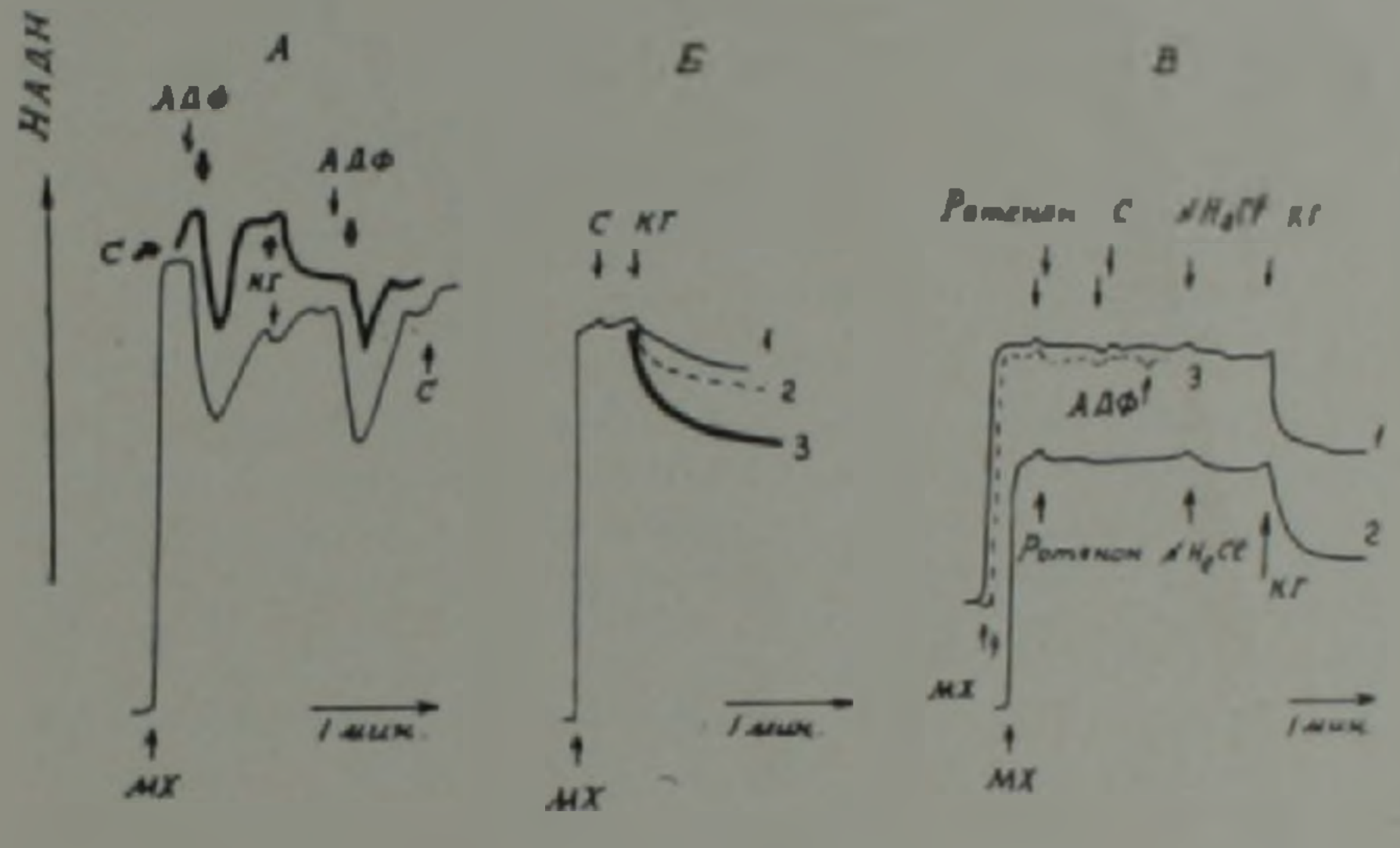

Рис 3. Умеренное окисление НАДН при ограничивающем окисление сукцината действии α-кетоглутарата на МХ печени крысы (*А, Б, В*) Усиление окисляющего действия α-кетоглутарата ротеноном и хлористым аммонием (*Б, В*). Среда инкубации общим объемом 1 мл содержит: 0,1 М сахарозу, 0,06 М KCl, 0,0015 М трис-HCl, 0,0015 М KH_2PO_4. Добавки 4 мМ сукцината, 6 мМ α кетоглутарата, 150 мкМ АДФ 2 мкМ ротенона и 10 мМ NH_4Cl. *Б: 1*— α-кетоглутарат, *2*—α-кетоглутарат + NH_4Cl, *3*— α-кетоглутарат + NH_4Cl + ротенон *В* последовательно добавлены *1* — ротенон, сукцинат, NH_4Cl и α-кетоглутарат, *2*—ротенон, NH_4Cl и α —кетоглутарат (без сукцината), *3*—ротенон, сукцинат и АДФ

1 Как было показано выше, ГЛ и ПНР, которые так же как и КГ могут служить источниками образования ЩУК, не обладают действием, подобным КГ.

2 Ограничивающее действие КГ выражено как на МХ печени (кролик, крыса), так и на МХ сердца (кролик, собака и крыса). Однако известно, что торможение ЩУК дыхания характерно для МХ печени ([1,2,7—9]), а для МХ сердца ЩУК благодаря ее интенсивному окислению не вызывает торможения дыхания ([2,5]).

3 Ограничивающее окисление СУК действие КГ проявляется лишь в отношении дыхания в состоянии 4 и при высоком уровне восстанов-

ленности и высокой энергизованности МХ. Ингибирующее же действие ЩУК лучше проявляется при ослаблении энергизации МХ. На рис. 4, *А, Б* продемонстрирована разнонаправленность ответов МХ сердца под влиянием КГ и ЩУК при окислении СУК в зависимости от степени энергизованности МХ. Показано, что интактные МХ сердца в присутствии СУК осуществляют накопление ионов кальция при его последовательных добавках по 25 мкМ с выбросом на 7 добавке. Добавление

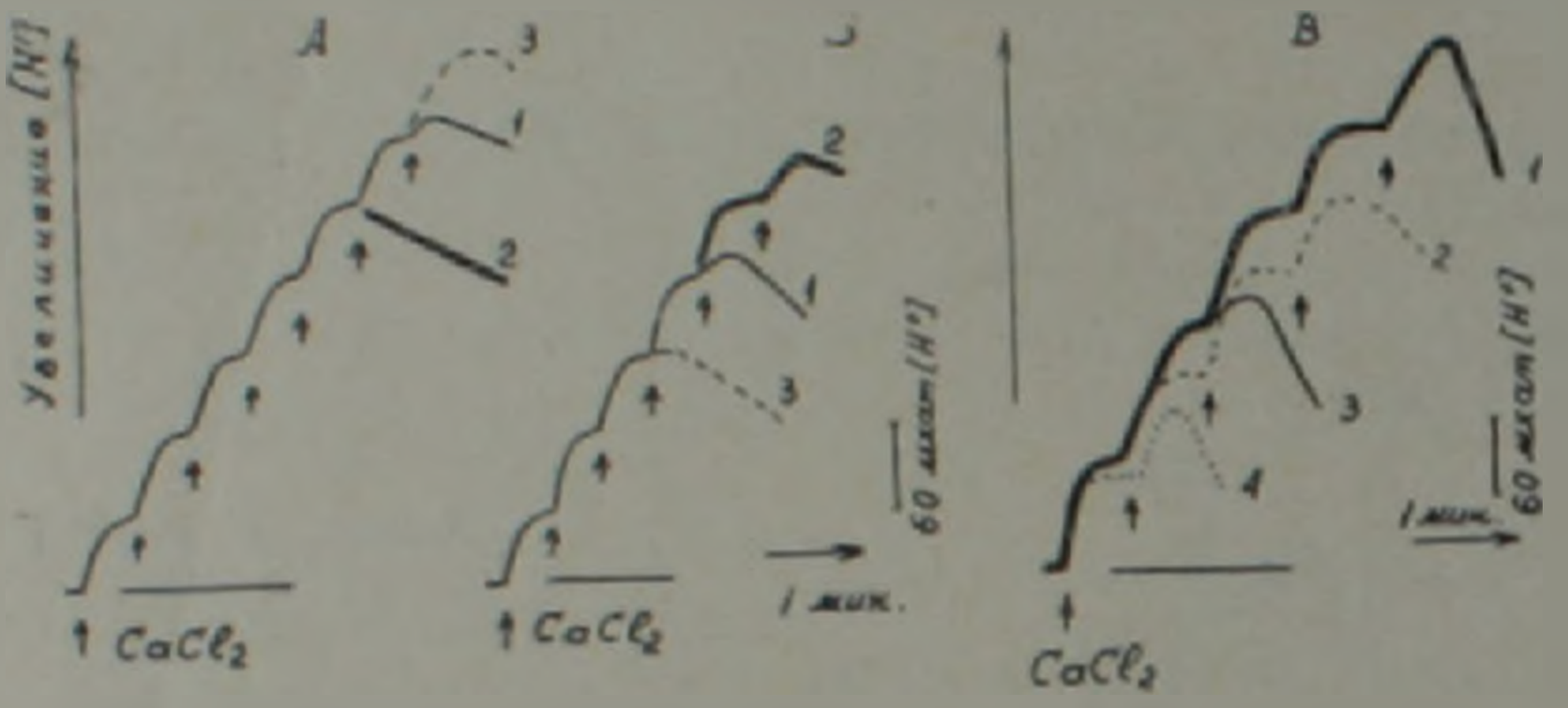

Рис 4 Уменьшение кальциевой емкости при ограничивающем окисление сукцината действии α-кетоглутарата на МХ сердца кролика (*А*) Инверсия ответов МХ под влиянием КГ и ЩУК (*А, Б*) Уменьшение α-кетоглутаратом тормозящего действия ЩУК на поглощение кальция в МХ печени кролика в присутствии сукцината и ротенона (*В*) *А*—МХ свежевыделенные *Б*—через 2 ч хранения на льду Условия инкубации *А* и *Б* как в подписи к рис. 1, *В* как в подписи к рис 3, кроме $CaCl_2$, вносимого порциями по 25 мкМ. Добавки *А* и *Б* *1*—сукцинат; *2*—сукцинат + α-кетоглутарат, *3*—сукцинат + ЩУК. *В* *1*—сукцинат, *2*—сукцинат, глутамат и ЩУК *3*—сукцинат, α-кетоглутарат и ЩУК. *4*—сукцинат и ЩУК

КГ приводит к снижению кальциевой емкости до 5 добавок Добавление ЩУК не изменяет или, наоборот, увеличивает кальциевую емкость МХ в присутствии СУК. При 2-часовом хранении МХ на льду отмечалось наряду со снижением параметров сопряжения и уровня восстановленности НАД (рис. 1, 2) снижение кальциевой емкости до 4 добавок. Добавка КГ приводит к увеличению, а ЩУК, напротив, к снижению кальциевой емкости соответственно до 5 и 3 добавок.

4 Ограничивающее окисление СУК действие КГ в отличие от торможения его ЩУК не снимается ГЛ и ротеноном, как показано выше. Ротенон, напротив, усиливает действие КГ, что соответствует данным [10–12].

5. Наблюдается прямой антагонизм между ограничивающим окисление СУК действием КГ и тормозящим действием ЩУК (рис. 4, *В*) Показано, что в то время как добавление ЩУК приводит к значительному снижению кальциевой емкости при окислении СУК, КГ увеличивает указанную емкость При совместном присутствии СУК, ЩУК и КГ емкость по кальцию возрастает более чем вдвое, по сравнению с пробой, содержащей СУК и ЩУК.

Анализ полученных данных позволяет считать, что наиболее вероятным объяснением ограничивающего действия КГ на окисление СУК является включение реакции восстановительного аминирования КГ, в процессе которого синтезируется глутамат и расходуется НАДН. В пользу этого говорит факт регистрации эффекта именно в области высокой восстановленности НАД и высокой энергизации МХ, усиливающегося наличием АТФ, ионами аммония и ротеноном. Это согласуется с данными ([11,12]), показавшими, что под воздействием КГ, ионов аммония и ротенона имеет место увеличение концентрации глутамата в МХ мозга и печени крыс. Причем способность к образованию глутамата оказалась выше у годовалых крыс, по сравнению со старыми животными, что, как нам кажется, связано с различной степенью энергизации МХ.

Таким образом, регуляторное действие КГ на активность СДГ может быть сведено к одному механизму — снижению уровня НАДН. Поскольку КГ избирательно ограничивает окисление СУК, его действие можно использовать для снижения гиперактивного состояния СДГ, характерного для ряда патологических состояний ([13–17]). Известно также, что с торможением СДГ связано защитное действие ряда биологически активных препаратов ([18]). На основании этих данных предполагаем, что торможение дыхательной цепи имеет защитное для организма значение в патологических ситуациях. Следовательно, избирательное ограничение окисления СУК и физиологическое регуляторное действие КГ на активность СДГ заслуживает внимания в плане его фармакологического использования.

Филиал Всесоюзного
научного центра хирургии
МЗ СССР (Ереван)

Ի. Ա. ՍԱՀԱԿՅԱՆ

Սուկցինատի օքսիդացման արագության ամիմանափակումը α-կետոգլուտարատով սրտի և լյարդի միտոքոնդրիաներում

Յույց է տրված սուկցինատի օքսիդացման արագության կրկնակի իջեցում α-կետոգլուտարատով մետաբոլիկ 4 դրության սրտի և լյարդի (ձագար, չուն, առնետ) միտոքոնդրիումների շնչառության ժամանակ։ Դա կապված է NADH-ի չափավոր օքսիդացման հետ, վերջիններիս բարձր վերականգնման գոնայում։ Այս էֆեկտը դիֆերենցվում է օքսալացետատի ազդեցությունից։ Ըստ երեվույթի, NADH-ի մակարդակի իջեցումը կապված է α-կետոգլուտարատով գլուտամատի սինթեզի ինդուկցիայի հետ։ NADH-ի չափավոր իջեցումը կարող է բերել սուկցինատդեհիդրոգենազայի ակտիվության ամիմանափակման։ Կարելի է ենթադրել, որ հնարավոր է օգտագործել α-կետոգլուտարատի վերը նշված ազդեցությունը՝ ամիմանափակելու ախտաբանական վիճակներին բնորոշ սուկցինատդեհիդրոգենազի «հիպերակտիվացիան» օրգանիզմում։

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *М. Н. Кондрашова*, Автореф. докт. дис., Пущино, 1973 [2] *М. Н. Кондрашова*, Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма, «Наука», М., 1978. [3] *M. Guiman, E. B. Kearney, T. P. Singer*, Biochemistry, v. 10, 2726 (1971) [4] *Они же*, там же, v. 10, 4763 (1971) [5] *E. S. Davis, D. M. Gibson*, J. Biol. Chem., 244, 1, 161—170(1969) [6] *L. F. Rasmussen*, FEBB Letters, v. 19, 239(1971). [7] *A. B. Wojtzak* Biochem et Biophys acta, v. 172 (1969) [8] *Р. Н. Акмаров, Н. Р. Савкин*, Биофизика живой клетки, Пущино 1973 [9] *А. Д. Виноградов*, Автореф. канд. дис., М., 1967 [10] *Е. Г. Окон* в сб. «Терапевтическое действие янтарной кислоты», Пущино, 1976 [11] *Г. В. Аврекян, В. А. Шагинян, Г. Г. Бунатян*, Всесоюз. съезд геронтологов и гериатров, Киев, 1976 [12] *Г. Г. Бунатян*, Автореф. канд. дис., Ереван, 1977 [13] *Е. И. Болотовская, И. А. Комиссарова*, Клиническая медицина, т. 8 (1975). [14] *З. Н. Дедухова, И. А. Комиссарова, В. С. Моисеев*, Кардиология, 1975 [15] *И. А. Комиссарова, Р. П. Нарцисов*, в сб. «Терапевтическое действие янтарной кислоты», Пущино, 1976 [16] *И. Г. Саакян, Т. Д. Карапетян* с соавт., в сб. «Кровоснабжение метаболизм и функция органов при реконструктивных операциях», Ереван, 1979 [17] *А. С. Янопская*, в сб. «Терапевтическое действие янтарной кислоты», Пущино, 1976 [18] *Г. Д. Миронова* с соавт. Биофизика сложных систем и радиац. нарушений, «Наука», М., 1977.