

УДК 577.112.612

И. Р. Саакян, Р. Г. Камалян, К. А. Гевондян

**Аспаргатаминотрансфераза - эффективный регулятор сукцинат -
зависимого поглощения Ca^{2+} в митохондриях сердца и печени
экспериментальных животных**

(Представлено академиком А. А. Галояном 28/1 2004)

Аспаргатаминотрансфераза (АСТ) играет важную роль в синхронизации энергетического и азотистого обмена, осуществляемого на уровне митохондрий (МХ). Функционирование фермента связано с механизмами обмена азотистыми и безазотистыми веществами между митохондриальным матриксом и цитоплазмой [1]. Конкурируя с цитратсинтазой за оксалоацетат (ОА), АСТ при обеспечении цикла Кребса ацетил-СоА генерирует ОА, а при дефиците замыкает цикл, генерируя кетоглутарат (КГЛ). Подобное шунтирование цикла переаминированием включает и выключает окисление сукцината, генерирующего восстановительные эквиваленты для синтеза глутамата (ГЛУ). Генерирование НАДН сукцинатом блокирует вход ацетил-СоА в цикл, способствуя трансаминированию ГЛУ.

Таким образом, осуществляется реципрокное окисление сукцината, что прослеживается по сукцинатзависимому (СЗ) поглощению Ca^{2+} МХ и гомогенатами тканей. Шунтирование цикла Кребса переаминированием повышает вклад в окисление янтарной кислоты [2,3], оказывает сильное регуляторное влияние на включение в цикл жирных кислот [4] и на использование углеводов в цитозоле. О. И. Писаренко [5-7] показана взаимосвязь между метаболизмом ГЛУ и аспартата, синтезом АТФ и стабилизацией работы сердца в условиях его гипоксической остановки и реперфузии. Снижение уровня ГЛУ сопряжено с образованием КГЛ и усилением субстратного фосфорилирования в МХ [8,9].

Сукцинат по интенсивности окисления превосходит НАД- зависимые субстраты. При его окислении МХ поглощают Ca^{2+} [10,11]. ГЛУ и КГЛ уступают ему в этом. Они разнонаправленно воздействуют на окисление сукцината: ГЛУ стимулирует процесс, по-видимому, за счет устранения ОА, а КГЛ тормозит [12-15]. Тормозящее действие КГЛ сопряжено с повышением эффективности фосфорилирования, дыхательного контроля и АДФ/О. Это явление воспроизводится на МХ и гомогенатах сердца и печени разных животных, прослеживается по СЗ дыханию, восстановлению НАД и поглощению Ca^{2+} . По-видимому, ограничение КГЛ окисления сукцината, подобно его активации ГЛУ, может реализоваться через ОА. Такой подход позволяет по влиянию на окисление сукцината субстратов переаминирования наблюдать за обратимостью реакции. В качестве чувствительного теста удобен захват Ca^{2+} МХ.

В работе исследовали влияние ГЛУ и КГЛ на СЗ поглощение Ca^{2+} в МХ сердца голубя и гомогенатах сердца и печени крысы.

В работе использовали 20 сизых голубей, из сердец которых выделяли МХ, а также 30 крыс линии Вистар массой 200 г. Из органов крыс получали солевые гомогенаты. Для выделения МХ из сердечной мышцы использовали общепринятую среду (сахароза 300 мкМ, Нерес 10 мМ, ЭДТА 0.5 мМ, рН 7.4) в соотношении ткань: среда 1 : 10 [16]. Среду суспендирования (без ЭДТА) использовали в соотношении ткань: среда равном 10 : 1.

Приготовление гомогената сердечной ткани. Сердце после забоя животного помещали в ледяной раствор следующего состава: 125 мМ КСl, 10 мМ Нерес, 1 мМ ЭДТА, рН 7.65. Желудочки после иссечения предсердий трижды промывали вышеуказанной средой, взвешивали и переносили на охлаждаемое льдом часовое стекло. Среду гомогенизации обогащали ГЛУ 5 мМ с целью предохранения МХ от повреждающего влияния продуктов перекисного окисления [13]. Среду добавляли к сердечной мышце в соотношении 3:1. Тщательно размельченную мышцу растирали (60 с) в неплотном стеклянном гомогенизаторе с помощью тefлонового пестика. Гомогенат фильтровали через слой капрона, отмечали его конечный объем. Препарат готов к измерению через 10 мин после забора сердца. Гомогенат (30-40 мг белка/мл) хранили на льду не более 30 мин. Образцы препарата вносили в среду инкубации по 25 мкл на 1 мл среды.

Приготовление гомогената печени. Процедуры подробно описаны в [14,17]. После декапитации печень быстро извлекали и помещали в ледяную среду гомогенизации: 120 мМ КСl, 10 мМ Нерес, рН 7.5. ЭДТА и ГЛУ не добавляли. Гомогенат фильтровали через двойной слой капрона. Для измерения H^+/Ca^{2+} обмена использовали 200 мкл гомогената с содержанием белка в 60-70 мг/мл.

Поглощение ионов Ca^{2+} в митохондриях регистрировали по противофазному изменению H^+ в среде инкубации с помощью водородного электрода. $CaCl_2$ добавляли порциями по 200 нмоль до спонтанного выброса [14,15]. Сумма поглощенных катионов характеризует Ca^{2+} - емкость. По достижении определенного предела возникает спонтанный выброс накопленного Ca^{2+} . Показано [16,17], что интенсивности входа и выхода Ca^{2+} в пробах с и без АДФ различаются. Измерение Ca^{2+} -емкости проводили при окислении субстратов с АДФ и без нее [13,15,16]. Оценивали Ca^{2+} -емкость до и после синтеза АТФ.

Определение скорости синтеза АТФ из АДФ. Измерение проводили по скорости убыли H^+ (защелачиванию среды) после добавления АДФ.

Инкубационная среда для выделенных МХ сердца голубя содержала 100 мМ сахарозы, 60 мМ КСl, 1.5 мМ KH_2PO_4 , 1.5 мМ Tris-буфер, рН 7.4; для тканевых гомогенатов сердца и печени крысы - 120 мМ КСl, 1 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ Нерес, рН 7.4, $t=25^\circ C$. Субстраты окисления с концентрациями указаны в подписях к рисункам. Везде АДФ добавляли по 200 мкМ, $CaCl_2$ - по 200 мкМ. МХ и гомогенат вносили в исследуемую среду (объемом в 2 мл) с заранее добавленным субстратом окисления. Измерения на тканевых препаратах проводили в течение не более 30-45 мин после их получения. Во всех исследованиях уровень Ca^{2+} -емкости и скорость синтеза АТФ при окислении на сукцинате приняты за 100%.

Белок измеряли методом Лоури [18]. Результаты обрабатывали по критерию Стюдента и

методом парных сравнений (критерий Вилконсона U) [19].

На рис. 1,2 и в табл.1,2 представлены результаты исследования действия ГЛУ и КГЛ на СЗ накопление Ca^{2+} выделенными МХ сердца голубя, а также гомогенатами сердца и печени крысы. Показана разнонаправленность действия исследованных субстратов: ГЛУ активирует, а КГЛ тормозит процесс. Выявлено, что КГЛ устраняет вызванную ГЛУ активацию процесса. С другой стороны, ГЛУ в превышающих концентрациях препятствует этому блокированию.

Из рис.1,а видно, что МХ сердца голубя при дыхании на сукцинате поглощают гораздо больше Ca^{2+} , чем на ГЛУ или КГЛ. СЗ поглощение Ca^{2+} усиливается ГЛУ и тормозится КГЛ (см. табл.1). Примечателен сам характер действия субстратов: ГЛУ (0.6-1мМ) вызывает активацию окисления во много раз больших количеств сукцината (2.5-5мМ) [11]. Прирост поглощения Ca^{2+} варьирует от 96 до 425%, составляя в среднем 294%. Торможение процесса КГЛ инициируется его относительно большими (5-10 мМ) к сукцинату концентрациями. При соотношении субстратов 1:2 процесс активируется незначительно или не изменяется. Активирующее действие ГЛУ в МХ сердца голубя наблюдается и в условиях их энергизации, т.е. после синтеза АТФ из добавленной АДФ (рис.1,б). Примечательно, что КГЛ устраняет действие ГЛУ.

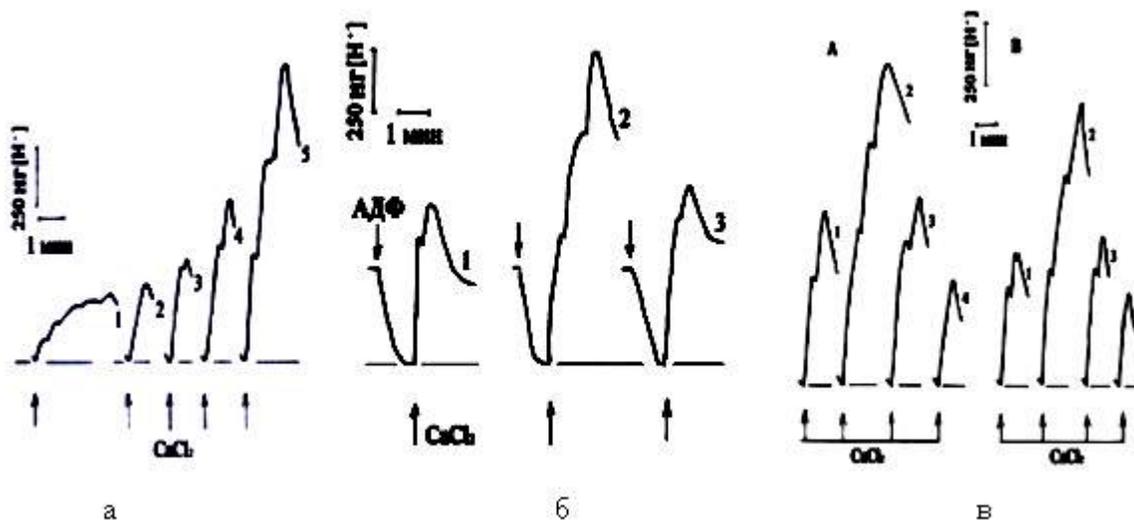


Рис.1. Влияние инкубационной среды на поглощение Ca^{2+} митохондриями сердца голубя: а) поглощение Ca^{2+} (100 мкМ) при окислении различных субстратов в МХ сердца голубя. Субстраты: КГЛ 5 мМ(1); ГЛУ 1 мМ(2); сукцинат 2.5 мМ+ КГЛ 5 мМ(3); сукцинат (4); сукцинат + ГЛУ1 (5). б) Влияние ГЛУ и КГЛ на СЗ синтез АТФ и поглощение Ca^{2+} в МХ сердца голубя. Субстраты:сукцинат 2.5 мМ(1); сукцинат+ГЛУ 1 мМ(2); сукцинат+КГЛ 5 мМ (3). АДФ по 200 мкМ, Ca^{2+} -100 мкМ. в) стимуляция ГЛУ (А) или протимозином (Б) СЗ поглощения Ca^{2+} . Устранение этой стимуляции КГЛ в МХ сердца голубя. Субстраты: сукцинат 2.5 мМ (1), сукцинат + ГЛУ 10 мМ + КГЛ 1 мМ (2), сукцинат + ГЛУ 10 мМ + КГЛ 10 мМ (3), сукцинат + ГЛУ 1 мМ+ КГЛ 10 мМ(4).

Сходные ответы наблюдали на гомогенатах тканей (см.рис.2,а,б). Торможение реализуется при высоком концентрационном соотношении КГЛ:ГЛУ, равном 2.5:1 для сердца голубя и 10:1 для сердца и печени крысы. Торможение в сердце голубя инициируется меньшими дозами КГЛ и в большей степени, чем в сердце или печени крыс, составляя соответственно 64, 41 и 47% от исходного (табл.1). Различия во влиянии ГЛУ и КГЛ показаны и на других

примерах. Выявлено, что процедура ресуспендирования осадка МХ сердца голубя средой, обогащенной ГЛУ, приводит к гораздо большему увеличению поглощения Ca^{2+} , чем при стандартном методе. Ресуспендирование средой, обогащенной КГЛ, уменьшает уровень поглощенного Ca^{2+} . В МХ сердца голубя не только ГЛУ, но и включающий его синтетический пептид активирует СЗ поглощение Ca^{2+} (рис.1,в). Действие обоих веществ устраняется КГЛ. Показана высокая чувствительность СЗ поглощения Ca^{2+} к изменениям соотношения ГЛУ/КГЛ в гомогенатах печени крысы (рис.2,а,б; табл.2). КГЛ при количественном преобладании над ГЛУ подавляет процесс. Примечательно, что показатели синтеза АТФ в сравниваемых пробах практически не изменяются (рис.2,а).

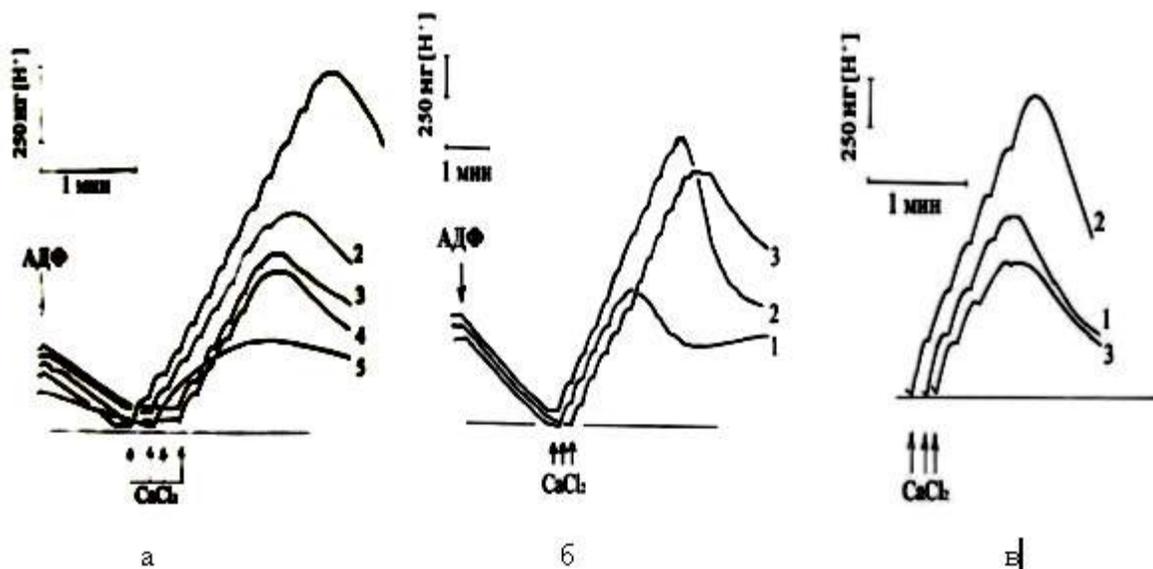


Рис.2. Влияние дыхательных субстратов на СЗ синтез АТФ и поглощение Ca^{2+} в гомогенатах печени крыс: а) Влияние ГЛУ и КГЛ на процессы СЗ синтеза АТФ и поглощения Ca^{2+} . Субстраты: сукцинат 4мМ+ГЛУ 1мМ(1); сукцинат (2); сукцинат+ГЛУ 1мМ+КГЛ 10 мМ (3); сукцинат + ГЛУ 1 мМ + АОА 2 мМ (4); сукцинат + ГЛУ 1 мМ + малонат 2 мМ (5). б) Реципрокность действия ГЛУ и КГЛ на СЗ поглощение Ca^{2+} . Субстраты: сукцинат 2.5 мМ + ГЛУ 1 мМ+КГЛ 10 мМ (1); сукцинат+ГЛУ10мМ+КГЛ1мМ-2; сукцинат+ГЛУ10мМ+КГЛ 10мМ- 3. в) Стимуляция ГЛУ СЗ поглощения Ca^{2+} . Субстраты: сукцинат 4мМ+ГЛУ 1 мМ (1); сукцинат + ГЛУ 10 мМ + КГЛ 1 мМ (2); сукцинат + ГЛУ 10 мМ + КГЛ 10 мМ (3).

По-видимому, действие КГЛ и ГЛУ связано единым реципрокным механизмом. Взаимодействие между ними осуществляется через реакцию переаминирования с участием ОА и аспарагиновой кислоты. Действительно, выявлена высокая чувствительность действия КГЛ и ГЛУ к ингибитору трансаминаз, АОА (рис.2,а, табл.2). АОА снижает активированное ГЛУ поглощение Ca^{2+} на 59%. При этом показатели синтеза АТФ изменяются лишь незначительно (8-10%). По сравнению с АОА конкурентный ингибитор активности СДГ - малонат угнетает и синтез АТФ, и поглощение Ca^{2+} .

Выявлено различие в скорости синтеза АТФ в солевых гомогенатах сердца крысы, полученных с ЭДТА и без нее. В отсутствие ЭДТА она уменьшается в ряду субстратов: сукцинат и ГЛУ, сукцинат, ГЛУ и КГЛ, наконец, сукцинат, ГЛУ и АОА. Добавление АОА

приводит не к обычному защелачиванию среды, а ее закислению. В указанном ряду наблюдаем соответствующее изменение интенсивности накопления Ca^{2+} . Полученные результаты указывают на связь переаминирования с фосфорилирующим окислением, которая в определенных условиях опыта может быть замаскирована.

Таким образом, в настоящей работе показана (рис.1,2; табл.1,2) взаимосвязь между процессами окисления сукцината, СЗ накопления Ca^{2+} и переаминированием ГЛУ. Направление реакции переаминирования регулируется изменением концентрационных соотношений участвующих в ней субстратов. Реакция меняет направление под влиянием возрастающей концентрации какого-либо из названных субстратов, что сказывается на активации окисления сукцината.

Накопление Ca^{2+} более эффективно с сукцинатом, чем с ГЛУ и КГЛ (рис. 1,а, табл.1). ГЛУ усиливает эффект сукцината в очень низких (0,6 мМ) концентрациях, которые не могут внести вклад в накопление Ca^{2+} , но достаточны для вовлечения ОА в трансминазную реакцию, активации СДГ, что и способствует усилению транспорта Ca^{2+} . Прирост ГЛУ Ca^{2+} -емкости МХ сердца голубя, отличающихся высокой чувствительностью к ингибированию ОА, достигает высоких значений (табл.1). Сходное с ГЛУ действие оказывает ГЛУ-содержащий пептид (рис.1,в).

Таблица 1

| Действие ГЛУ и КГЛ СЗ на накопление Ca^{2+} в тканевых препаратах | | | | |
|--|---|------------------|-------------------------|---------------------------|
| Препарат | Са –емкость, нмоль H^+ на 100 мг влажной ткани | | | |
| | Субстрат окисления, мМ | | | |
| | 1. С 2,5 | 2. С+КГЛ 5 | 3. С+ГЛУ 2 | 4. С+ГЛУ 2+КГЛ 5 |
| МХ сердца голубя (n = 11) 300 мг ткани | 91±7.5 100% | 85.7±8.1 94.4 | 246±15.2 271 100% | 63±5.4 69 26 |
| Препарат | 1. С 4 | 2. С + КГЛ 10 | 3. С+ГЛУ 1 | 4. С + ГЛУ 1+ + КГЛ 10 |
| Гомогенат сердца крысы (n = 5) 100 мг ткани | 280±19.2 100% | 288±17.4 103 | 548±24.5 196 100% | 323±28.4 116 59 |
| Гомогенат печени крысы (n = 10) 100 мг ткани | 421±32.2 100% | 417±25.7 99 | 798±43.4 190 100% | 419±28.8 99.5 53 |

Примечание. Везде % (2, 3, 4 - вторые строчки) соотношен к величине Ca^{2+} –емкости на сукцинате (С-1) и (4 – третьи строчки) к величине Ca^{2+} –емкости на С+ГЛУ 3)

Примечательно, что активируемое ГЛУ накопление Ca^{2+} устраняется превышающими (10:1) концентрациями КГЛ (рис.1,а). С другой стороны, в присутствии высоких концентраций ГЛУ тормозящее действие КГЛ не проявляется. Мы полагаем, что тормозящее действие КГЛ на

окисление сукцината происходит посредством генерации ОА и торможением СДГ. В зависимости от направления реакции трансаминирования активность СДГ варьирует от очень высоких до очень низких величин. Накопленный в МХ КГЛ может включаться в синтез ГТФ в субстратном фосфорилировании, что может привести к замедлению окисления сукцината. Следовательно, изменение концентрационного соотношения КГЛ и ГЛУ приводит к активации или торможению окисления сукцината. Это чувствительно прослеживается по изменению поддерживаемого окислением сукцината накопления Ca^{2+} в МХ сердца и печени у различных экспериментальных животных. Ингибитор трансаминаз АОА предотвращает накопление Ca^{2+} , но на синтез АТФ не влияет. Малонат тормозит оба исследованных процесса. Торможение усиливается при совместном применении малоната с арсенитом.

Таким образом, пераминирование ГЛУ и КГЛ может действовать в качестве реле: включать-выключать поток субстратов в цикл Кребса, регулировать их пополнение и окисление, обеспечивать адаптационную пластичность и оптимизировать работу системы в целом. Рассмотренный механизм может участвовать в осуществлении реципрокной активации окисления сукцината в МХ. Следовательно, процесс переаминирования может рассматриваться как плавный переключатель потока субстратов (ди- и трикарбоновых кислот) в цикле Кребса.

Таблица 2

Действие ГЛУ и КГЛ на СЗ накопление Ca^{2+} в гомогенатах печени у крыс

| Препарат | Ca –емкость, нмоль H^+ на 1 мг влажной ткани | | | | | |
|----------|--|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
| | Субстрат окисления, мМ | | | | | |
| | С4 | С+ГЛУ1 | С+ГЛУ1 КГЛ10 | С+ГЛУ10 +КГЛ1 | С+ГЛУ10+ КГЛ10 | С+ГЛУ1+АОА2 |
| n = 15 | 375± 100% | 862± 230 100% | 4.32± 115 50 | 906± 241 105 | 692± 184 80 | 350± 93 41 |

Примечание. Везде % (2, 3, 4, 5, 6 вторые строчки) соотнесен к величине Ca^{2+} –емкости на сукцинате (С-1) и (3, 4, 5, 6 – третьи строчки) к величине Ca^{2+} –емкости на С+ГЛУ 2)

Институт хирургии МЗ РА

Институт биохимии им Г. Х. БунятыяНАН РА

Литература

1. *Passarella S., Atlante A., Valent D., de Van L.* - Mitochondrion. 2003. V. 2. P. 319-343.
2. *Кондрашова М. Н.* - Биохимия. 1991. V. 56. P. 388-406.
3. *Кондрашова М. Н.* - Биофизика. 1989. V. 34. P. 450-458.
4. *Randle P. J.* - Circ. Res. 1976. V. 38. P. 108 - 112.
5. *Писаренко О. И., Соломатина Е. С., Студнева И. М.* - Биохимия. 1987. V.52. P.543-549.
6. *Писаренко О. И., Шульженко В. С., Студнева И. М.* - Кардиология. 2003. N.1. P. 71-75.
7. *Писаренко О. И., Студнева И. М., Портной В. Ф.* - Бюл. exper. биол. мед. 1987. Т. 54. С. 273-274.
8. *Sanborn T., Gavis W., Brekowitz S. et al.* - Am. J. Physiol. 1979. V. 237. P. H535 - H 541.
9. *Takata T., Hiltunen J. K., Hassinen I. E.* - Biochem. J. 1980. V. 192. P. 285-295.
10. *Kondrashova M. N., Gogvadze V. G., Medvedev B. I., Babsky A. M.* - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V.109. P. 376-381.
11. *Саакян И. Р.* В сб: Терапевтическое действие янтарной кислоты. Пущино. 1976. С. 201-203.
12. *Саакян И. Р.* - ДАН АрмССР. 1980. Т. 70. N2. С. 110-116.
13. *Hansford R. G., Hogue B. A., Mildazine V.* - J. Bioenerg.Biomembr. 1997 V. 29. P. 89-95.
14. *Kondrashova M. N., Fedotcheva, N. I., Saakyan I. R., Sirota T. V., Lamasiev K. G., Kulicova M. V., Темнов А. В.* - Mitochondrion. 2001. V. 1/3. P. 249-267.
15. *Саакян И. Р., Карапетян Т. Д., Шердукалова Л. Ф., Пилюян А. Г.* А. С. №1455306 СССР. 1988. МКИ С 01 №33/48.
16. *Саакян И. Р., Саакян Г. Г.* В сб.: Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. ОНТИ ПНЦ РАН. Пущино. 1996. С. 73-186.
17. *Саакян И. Р., Саакян С. Г., Кондрашова М. Н.* - Биохимия. 2001. Т. 66. С. 976-984.
18. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* - J. Biol. Chem. 1951. V 193. P. 265-275.
19. *Гублер Е. В.* В кн.: Вычислительные методы анализа в распознавании патологических процессов. Л. Медицина. 1978.

Ի. Ռ. Սահակյան, Ռ. Գ. Քամայան, Կ. Ա. Ղևոնդյան

**Ասպարտամինատրանսֆերազը որպես Ca^{2+} -ի սուկցինատ կախյալ կլանման
էֆեկտիվ կարգավորիչ փորձնական կենդանիների սրտի և լյարդի
միտոքոնդրիումներում**

Մշակվել է հյուսվածքային պրեպարատներում Ca^{2+} -ի սուկցինատ կախյալ կլանման ինտենսիվությամբ ասպարտատրանսամինազի ուղղորդվածությանը հետևելու մեթոդ, որի հիմքում Ca^{2+} -ի կլանման վրա գլուտամինաթթվի և α -կետոգլուտարաթթվի հակառակ ազդեցությունն է՝ պայմանավորված սաթաթթվի օքսիդացմամբ: Վերջինս իրականացվում է օքսալաքացախաթթվի առաջացման և յուրացման ճանապարհով: Ցույց է տրվել Ca^{2+} -ի կլանման բարձր զգայունությունը տրանսամինազների արգելակիչ ամինաօքսիքացախաթթվի նկատմամբ: Ստացված արդյունքները ընդլայնում են եղած պատկերացումները բջջի տարբեր մակարդակներում իրականացվող նյութափոխանակության պրոցեսների ինտեգրացման աստիճանի մասին: