

ОСОБЕННОСТИ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ГИПОКСИИ И АЦИДОЗЕ

К.А. Рямова, А.С. Розенфельд

Российский государственный профессионально-педагогический университет г. Екатеринбург

Выявлены особенности ответной реакции дыхательной цепи митохондрий различных органов крыс, на физическую нагрузку, гипоксическую гипоксию и метаболический ацидоз. Показано, что экзогенный сукцинат способен повышать работоспособность, уменьшая симптомы рабочей гипоксии и после-нагрузочного ацидоза.

Ключевые слова: гипоксическое состояние, активация дыхания митохондрий, гормональное воздействие.

Оценка и разработка эффективных средств, способствующих поддержанию и сохранению фосфорилирующего дыхания митохондрий в условиях рабочей гипоксии и метаболического ацидоза, требуют понимания тех реакций, которые формируются в дыхательной цепи на моделируемые воздействия. Следует отметить, что в создавшихся условиях, митохондрии функционируют как открытая система, с интенсивным массообменом ограниченным притоком кислорода, в окружении цитозоля с более кислым рН и повышенной концентрацией лактата, фосфата и ионов кальция [23, 18].

В настоящее время установлено, что гипоксические состояния сопровождаются обратимыми нарушениями структуры и функции митохондрий. Причем, после острой гипоксии, независимо от ее генеза, как правило, наблюдается активация фосфорилирующего дыхания изолированных митохондрий [6, 8, 12, 21]. Постгипоксическую активацию митохондрий печени, сердца и коркового слоя почек мы отмечаем после острой гипоксической гипоксии (нахождение животных в течение 15–60 минут в барокамере на «высоте» 8000 метров), после массивной кровопотери, возмещенной аутокровью или эмульсией перфторорганических соединений, после острой этаноловой интоксикации. Для примера приведем данные по изменению дыхания митохондрий печени крыс перенесших 30 минутную гипоксическую гипоксию. Как показано на рис. 1, скорость дыхания митохондрий в третьем состоянии возрастала более чем на 45 % ($p < 0,05$) и в меньшей степени в четвертом состоянии, соответственно увеличивалась величина дыхательного контроля. При этом отношение АДФ/О оставалось неизменным. В более поздние сроки – через 2 часа пребывания животных «на высоте» 8000 метров, также как и при адаптации животных к хронической гипоксической гипоксии – активации дыхания митохондрий не наблюдалось [12].

На основании анализа, ряда выполненных экспериментов *in vivo* и *in vitro*, мы выявили следующие

факторы, ответственные за активацию дыхания митохондрий после острой гипоксии.

1. Гормональное воздействие на уровне ткани, возможно, связанное с гипоксическим стрессом. Подобная гипоксическая активация дыхания наблюдалась после подкожного введения малых доз адреналина (0,1 мг на кг веса) [20] и в случае спонтанно увеличенной продукции глюкокортикоидов в коре надпочечников [5, 6, 11].

2. Уменьшение щавелевоуксусного торможения сукцинат-дегидрогеназы, очевидно, обусловленное повышением степени восстановленности пиридиннуклеотидов после гипоксии. Обычно, в условиях нормоксии внесение в инкубационную среду 3 мМ глутамата или изоцитрата стимулирует окисление сукцината даже в митохондриях интактных животных и тем более в случае дезэнергизации, вызванной какими-либо нагрузками *in vivo* или *in vitro* [4, 9]. Оказалось, что после острой гипоксии ни глутамат, ни изоцитрат не вызывали дополнительной активации дыхания выделенных митохондрий [8, 19].

3. Мобилизация ионов кальция и свободных жирных кислот. Добавление в среду выделения и инкубации комплексообразователей 1 мМ ЭГТА или ЭДТА, или обезжиренного бычьего альбумина (1 мг на мл среды) существенно уменьшало постгипоксическую активацию дыхания, также как и у животных, перенесших холодовой стресс [3, 16, 17]. Как ясно из работ последних лет постгипоксическое увеличение содержания в цитозоле клетки и матрикс митохондрий ионов кальция может существенно увеличивать проток через цикл Кребса даже на фоне повышенного уровня восстановленности НАДН, за счет активирующего воздействия ионов кальция на α -кетоглутарат-дегидрогеназу [18, 23].

4. Активация фосфолипазы А2. Ингибитор фосфолипазы А2 бромфенацилбромид, добавленный в инкубационную среду в концентрации 1 мМ, также уменьшал постгипоксическую активацию дыхания митохондрий [2].

Интегративная физиология

5. Набухание митохондрий после острой гипоксии отмечалось во множестве морфологических исследований [13]. В лаборатории В.П. Скулачева было установлено, что набухание митохондрий сопровождается ускорением переноса восстановительных эквивалентов на уровне цитохромов b-c [10]. Повышение тоничности среды в таких условиях приводит к сжатию митохондрий и подавлению дыхания [2]. Причем ответ на повышение тоничности среды зависит от исходной степени набухания митохондрий. Оказалось, что для полного подавления ответа митохондрий печени на АДФ у интактных животных достаточно повысить тоничность среды добавкой сахарозы до 500 мОсм, тогда как после острой гипоксии для подавления V_3 необходимо повысить тоничность до 700 мОсм.

Активация фосфолипазы A2 и набухание митохондрий после гипоксии могут быть следствием воздействия повышенных концентраций свободных жирных кислот и ионов кальция [7], увеличением внутримитохондриальной концентрации кальция фосфата и недоокисленных субстратов.

Относительно влияния сдвига pH и повышения концентрации лактата как факторов, вносящих свой вклад в постгипоксическую активацию фосфорилирующего дыхания, далеко не все ясно. С одной стороны, известно, [24] что значительное, в несколько раз по сравнению с физиологическим уровнем, увеличение концентрации лактата, независимо от величины pH, может вызывать набухание митохондрий, сопровождающееся активацией дыхания и разобщением окислительного фосфорилирования. С другой стороны, при вышеперечисленных состояниях, и в частности при гипоксической гипоксии содержание лактата возрастает всего в 1,5–2 раза. И величина сдвига pH не превышает 0,1–0,15 ед.

В экспериментах *in vitro* мы обнаружили, что для активирования дыхания необходимо снизить pH инкубационной среды, по крайней мере с 7,4 до 6,9. Особенно заметна такая активация на уровне гомогената (табл. 1). Однако по данным К. Sahlin [22] сдвиг внутриклеточного pH на 0,5–0,6 ед. при мышечной работе сопровождается снижением pH

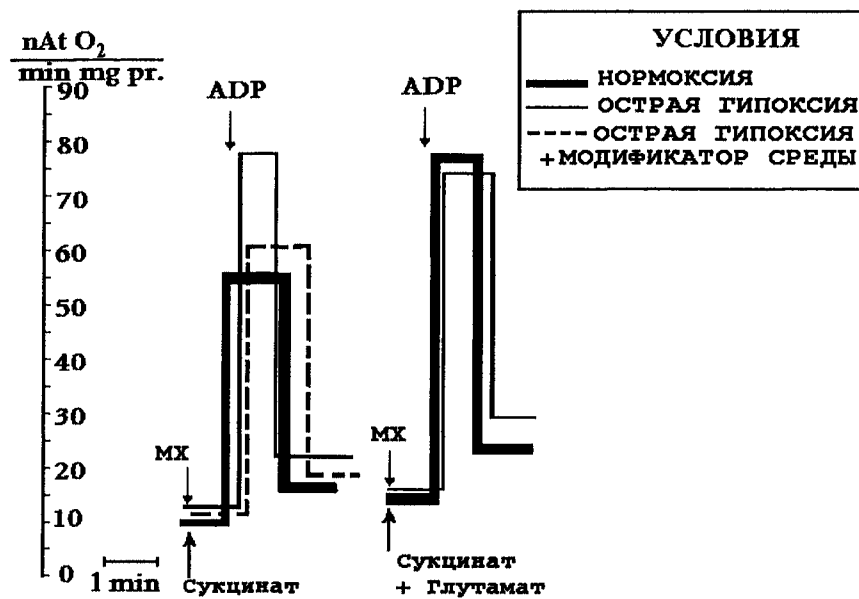


Рис. 1. Скорости дыхания митохондрий печени крысы при окислении сукцината после 60 мин гипоксической гипоксии.

Добавки: 200 мкМ АДФ, 5 мМ сукцината; «модификаторы среды»: ЭГТА 1 мМ или обезжиренный бычий альбумин 1 мг на мл. Каждая кривая построена по средним данным из 7–10 полярограмм регистрации дыхания митохондрий. Ошибка средней $\cong 7\%$ от абсолютной величины средних значений

Таблица 1

Влияние снижения pH инкубационной среды на скорости дыхания при окислении сукцината (5 мМ) гомогенатом сердца крысы ($t 30^\circ C$, $n = 4$) в 4 состояниях и при активации эндогенных АТФ-аз (3 состояния)

pH инкубационной среды	Скорость дыхания в 4 состояниях, нг-атом O в мин на мг белка	Скорость дыхания в 3 состояниях, нг-атом O в мин на мг белка (в присутствии 2,5 мМ Mg^{+2} , 2,5 мМ АТФ)
7,4	$16,2 \pm 1,2$	$67,0 \pm 2,7$
6,9	$25,4 \pm 2,1$ $P < 0,001$	$81,1 \pm 3,2$ $P < 0,05$

в смешанной крови всего на 0,2 ед. Учитывая эти результаты, мы моделировали подобный сдвиг рН в условиях целостного организма при помощи физической нагрузки.

Оказалось, что такой сдвиг рН крови с $7,41 \pm 0,01$ до $7,12 \pm 0,02$ происходит у крыс во время плавания в течение 15 минут с грузом 6 % от массы тела. Одновременно при этом возрастает концентрация лактата в крови и увеличивается отношение лактат/пируват с $13,1 \pm 0,7$ до $54,4 \pm 2,2$. В митохондриях скелетных мышц, выделенных из бедренных мышц крыс, после такой нагрузки наблюдалась гипоксииподобная активация фосфорилирующего дыхания (табл. 2). Естественно, в условиях целостного организма активирующее действие рабочей гипоксии на дыхание митохондрий скелетных мышц является результатом влияния всех указанных выше факторов, а не только сдвига рН и накопления лактата. Тем более было интересно проверить, в какой мере идеология использования сукцината, основанная на митохондриальных подходах, может работать на уровне целостного организма.

В более ранних наших работах было показано, что из всех митохондриальных субстратов при фиксированной АТФ-азной нагрузке *in vitro* наиболее эффективно предотвращали развитие ацидоза сукцинат калия, смесь сукцината калия с глутаматом калия или сукцинат аммония. Это объясняется тем, что даже в обычных нормоксических

условиях, сукцинат выигрывает конкуренцию за дыхательную цепь у НАД-зависимых субстратов (об этом мы судили по изменению дыхательного коэффициента).

При снижении pO_2 в инкубационной среде изменение сродства митохондрий к сукцинату становится еще более выраженным. Возможно, это происходит ввиду нарушения окисления НАД-зависимых субстратов, в то время как флавинозависимые субстраты, и в частности сукцинат, могут еще окисляться [12].

На уровне целостного организма противоацидотическое действие сукцината проверяли в условиях рабочей гипоксии, создаваемой как и в предыдущем эксперименте, физической нагрузкой (плавание крыс в течение 15 минут при температуре воды 30 °С, с грузом 6% от массы тела). Поскольку в экспериментах *in vitro* сукцинат аммония был более эффективным, чем ранее исследуемые субстратные смеси, мы исследовали его действие, вводя животным в желудок в дозе 15 мг на кг массы тела за 20 минут до плавания.

В случае введения животным перед плаванием сукцината аммония рН крови снижалось в меньшей степени – до $7,28 \pm 0,14$ (рис. 2), отношение лактат/пируват не превышало $28,0 \pm 1,4$. Причем противоацидотическое действие сукцината аммония на уровне крови сопровождалось нормализацией параметров фосфорилирующего дыхания митохондрий, выделенных из скелетных

Таблица 2

Дыхание митохондрий скелетных мышц крыс после плавания с предварительным приемом сукцината аммония

Группы животных. Во всех случаях n = 8	Субстраты окисления: Сукцината 5 мМ + Глутамата 8 мМ				
	V ₄	V ₃	ДК	АДФ/О	V _ф
Покой	73,0 ± 7,1	324,0 ± 30,0	4,5 ± 0,4	1,0 ± 0,1	331,0 ± 31,3
Нагрузка	123,0 ± 17,4 p < 0,05	440,0 ± 34,6 p < 0,05	3,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1	457,0 ± 45,5 p < 0,05
Нагрузка с предварительным приемом сукцината	75,0 ± 7,2	318,0 ± 48,0	4,1 ± 0,4	1,2 ± 0,1	413,0 ± 69,5
	Субстраты окисления: Пируват 10 мМ + Малат 5 мМ				
Покой	34,0 ± 4,7	206,0 ± 20,8	5,6 ± 0,27	1,3 ± 0,1	220,0 ± 22,8
Нагрузка	62,0 ± 9,0 p < 0,05	290,0 ± 18,0 p < 0,05	5,1 ± 0,6	1,2 ± 0,2	278,0 ± 25,1
Нагрузка с предварительным приемом сукцината	42,0 ± 5,5	156,0 ± 16,7	3,9 ± 0,3 p < 0,02	1,1 ± 0,1	151,0 ± 17,3

Примечание: V₄ и V₃ – скорости дыхания митохондрий в 4 и 3 состояниях по Чансу и Вилямсу, выраженные в нг-ат О в мин на мг белка митохондрий. V_ф – скорость фосфорилирования добавленного АДФ в нмолях в мин на мг белка. P < при сравнении с показателями покоя. Среда выделения для митохондрий скелетных мышц: 0,25 М маннит, 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), 1 мМ ЭГТА, 1 мМ АТФ. Инкубационная среда: 0,25 М маннит, 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), 1 мМ ЭГТА, 3 мМ КН₂РО₄, 1 мМ MgSO₄; добавки субстратов по 5 мМ, АДФ – 150 мкМ.

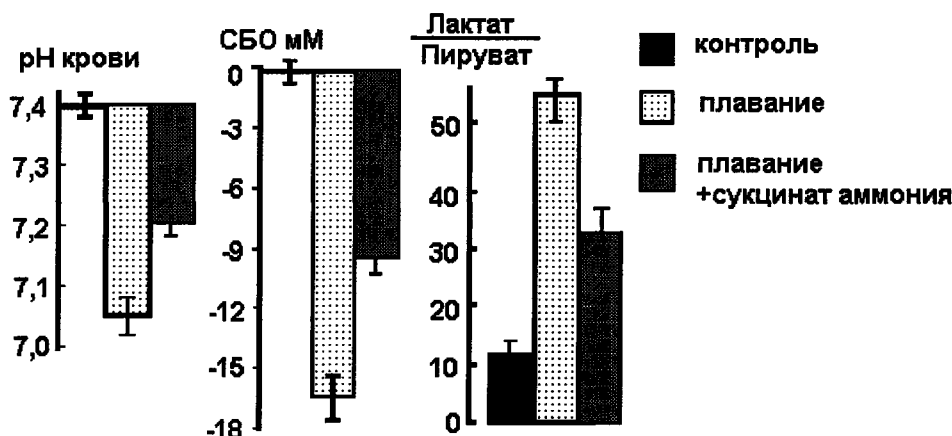


Рис. 2. Влияние предварительного введения сукцината аммония (15 мг на кг массы тела) на рН крови, величину сдвига буферных оснований (СБО) и отношение лактата/пируват в крови крыс после 15-минутного плавания

мышц: практически нацело ликвидировалась посленагрузочная активация дыхания (табл. 2).

Данные по влиянию сукцината аммония на работоспособность детально изложены А.С. Розенфельдом [14], а так же в сборнике «Терапевтическое действие янтарной кислоты». В последние годы эти результаты были подтверждены А.В. Сучковым и соавторами [15], которые показали, что введение сукцината аммония в дозе 0,25–1,0 г на кг веса существенно повышало физическую работоспособность мышей. При этом активность препаратов в ряду возрастала также, как и в наших исследованиях: фармакопейная янтарная кислота < сукцинат натрия < сукцинат аммония. Полученные нами данные и результаты исследования А.В. Сучкова [15], М.Ю. Алексеева [1], позволяют сделать вывод о том, что в условиях целостного организма экзогенный сукцинат способен уменьшать симптомы рабочей гипоксии, что проявляется на уровне изолированных тканевых препаратов. При этом повышается и работоспособность за счет коррекции метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий.

Литература

1. Алексеев, М.Ю. Влияние тренинга, характера физических нагрузок и биологически активных веществ на динамику процессов восстановления после мышечной работы у лошадей: дис. ... канд. биол. наук / М.Ю. Алексеев. – Бобровск, 1977. – 140 с.
2. Брустовецкий, Н.Н. Влияние тоничности среды на скорость дыхания и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени активных и гибернарующих сусликов / Н.Н. Брустовецкий, З.Г. Амерханов, Е.В. Гришина, Е.И. Маевский // Биохимия. – 1990. – Т. 55. – Вып. 2. – С. 201–209.
3. Брустовецкий, Н.Н. Изменения эффективности окислительного фосфорилирования, скорости дыхания и транспорта ионов Ca^{++} в митохондриях печени крыс и сусликов при различных уровнях термогенеза / Н.Н. Брустовецкий, Е.И. Ма-

евский, Л.С. Данилова, С.Г. Колаева, Г.Р. Иваницкий // Докл. АН СССР. – 1984. – Т. 276. – № 5. – С. 1260–1263.

4. Виноградов, А.Д. Колебательный характер установления стационарной концентрации пиридиннуклеотидов в митохондриях при переходе от активного дыхания к состоянию покоя // Колебательные процессы в биологических и химических системах / А.Д. Виноградов, М.Н. Кондрашова. – М.: Наука, 1967. – С. 122–127.

5. Вольский, Г.Г. О характере и особенностях регуляции сукцинатдегидрогеназы глюкокортикоидами / Г.Г. Вольский, Л.М. Осадчая // Митохондрии: Транспорт электронов и преобразование энергии. – М.: Наука, 1976. – С. 164–168.

6. Генкин, А.М. Влияние острой гипоксии и введения глутамата натрия на реакции дыхательной цепи митохондрий некоторых органов / А.М. Генкин, Н.А. Готов, Е.И. Маевский // Митохондрии: Биохимия и ультраструктура. – М., 1973. – С. 82–84.

7. Евтодченко, Ю.В. Механизмы и регуляция транспорта ионов в митохондриях: дис. ... д-ра биол. наук / Ю.В. Евтодченко. – Пуцзино, 1979. – 298 с.

8. Кондрашова М.Н. Адаптация к гипоксии посредством переключения метаболизма на превращении янтарной кислоты / М.Н. Кондрашова, Е.И. Маевский, Г.В. Бабаян // Митохондрии: Биохимия и ультраструктура. – М., 1973. – С. 112–129.

9. Кондрашова, М.Н. Янтарная кислота в скелетных мышцах при интенсивной деятельности и в период отдыха / М.Н. Кондрашова, Н.Р. Чаговец // Докл. АН СССР. – 1971. – Т. 198. – №. 1. – С. 243–246.

10. Красинская, И.П. Два качественно различных структурно-функциональных состояния митохондрий / И.П. Красинская, И.С. Литвинов, С.Д. Захаров, Л.Е. Бакеева, Л.С. Ягужинский // Биохимия. – 1989. – Т. 5. – Вып. 9. – С. 1550–1556.

11. Кулинский, В.И. Влияние катехоломинов на дыхание и НАД-зависимую изоцитратдегидрогеназу

митохондрий печени / В.И. Кулинский, В.М. Воробьева, Л.В. Труфанова // Митохондрии: Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. – М., 1977. – С. 12–18.

12. Маевский, Е.И. Влияние гипоксии и глутамата на реакции дыхательной цепи митохондрий некоторых органов: дис. ... канд. мед. наук / Е.И. Маевский. – Свердловск, 1971. – 244 с.

13. Митин, К.С. Структура митохондрий в норме и патологии / К.С. Митин // Митохондрии: Биохимия и морфология. – М., 1967. – С. 98–106.

14. Розенфельд, А.С. Регуляция сукцинатом вклада митохондрий в поддержание рН при АТФ-азных нагрузках: дис. ... канд. биол. наук / А.С. Розенфельд. – Пуцино, 1983. – 145 с.

15. Сучков, А.В. Влияние янтарной кислоты и ее солей на физическую работоспособность мышей BALB/C / А.В. Сучков, В.В. Панюшкин, С.Н. Португалов // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. – Пуцино, 1998. – С. 195–200.

16. Brustovetsky, N.N. Role of the Ca cycle in uncoupling of oxidative phosphorylation in liver mitochondria of cold-acclimated rats / N.N. Brustovetsky, E.I. Maevsky, S.G. Kolaeva, L.S. Danilova et. al. // *Comp. biochem. physiol.* – 1985. – 82B. – № 3. – P. 545–547.

17. Brustovetsky, N.N. Regulation of the degree of coupling of oxidation with phosphorylation in rat liver mitochondria: relation to thermogenesis / N.N. Brustovetsky, E.I. Maevsky // *IV Europ. Bioenerg. conf. short reports.* – V. 4. – 1986. – P. 381.

18. Drewnowska, K. Stimulatory effect of calcium on metabolism and its sensitivity to pH in kidney mitochondria / K. Drewnowska, A.C. Schoolwerth // *Am J Physiol* 1994 Jul. – 267 (1 Pt 2). – P. 153–159.

19. Maevsky, E.I. The origin of the hypoxic activation of the mitochondrial respiration / E.I. Maevsky, N.N. Brustovetsky // 9-th Colloquium on bioenergetics and mitochondria. Abstracts. Elbingerode, GDR, 1981. – P. 1–12.

20. Kondrashova, M.N. Participation of endogenous succinate in the action of physiological doses of adrenaline / M.N. Kondrashova, I.B. Gusar, E.I. Maevsky, E.A. Wulfius, A.L. Andreev // Abstracts. 6th Joint Symposium of the Biochemical Societies of the GDR and USSR «Regulation in metabolism and bioenergetics». – Tallinn, 1981. – P. 167.

21. Mela, L. Mitochondrial function in cerebral ischemia and hypoxia comparison of inhibitory and adaptive responses / L. Mela. – *Neurol. Res.* – 1979. – P. 51–63.

22. Sahlin, K. Intracellular pH and Energy Metabolism in skeletal Muscle in Man / K. Sahlin // Stockholm, 1978. – *Acta Physiolog. Scandinav.*, 1978. – Suppl. – P. 455.

23. Schoolwerth, A.C. Regulation of rat kidney mitochondrial metabolism in acute acidosis / A.C. Schoolwerth, T. Strzelecki, F.A. Gesek // *Am J Kidney Dis* 1989 Oct. – 14 (4). – P. 303–306.

24. Senger, H. Changes of the oxidative phosphorylation in mitochondria of rat skeletal muscle following strenuous exercise / H. Senger // *Acta biol. med. Germ.*, 1975. – Band 34. – P. 181–188.