

И. В. ЛЕВАНДОВСКИЙ, В. В. ЛЯХОВИЧ, А. В. ПАНОВ,
Т. М. ОКСМАН, действительный член АМН СССР В. В. КОВАНОВ

ВЛИЯНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ТОКСИНА НА МЕМБРАНЫ

Нарушение проницаемости сопутствует длительной ишемии (^{2, 4}). В частности, при восстановлении кровообращения в длительно ишемизированной конечности возникает отек, степень которого находится в прямой зависимости от времени предшествующей ишемии органа. При этом из ишемизированной конечности после ее перфузии было выделено белковое вещество с молекулярным весом 12 000 водородных единиц, обладающее выраженным токсическим действием, названное ишемическим токсином (¹). Отсюда следует предположить, что возникновение отека, а следовательно нарушение проницаемости клеточных мембран, может явиться результатом непосредственного действия ишемического токсина (ИТ) на мембраны. Исследования проводились на искусственной мембране и на мембранных структурах митохондрий. При этом учитывали, что внутренняя мембрана митохондрий слабо проницаема к ионам H^+ и OH^- , моновалентным катионам и ряду анионов, что позволяет изучать пассивный транспорт веществ в этих органеллах. Кроме того, обладая способностью к активному перемещению ионов за счет использования энергии окисления субстратов или гидролиза АТФ, митохондрии являются удобной моделью и для изучения действия ИТ на активный перенос ионов.

Митохондрии выделялись в сахарозной среде дифференциальным центрифугированием. Кинетика изменения объема изучалась на спектрометре «Hitachi» при длине волны 520 мμ. Поглощение O_2 измерялось на полярографе LP-60 с помощью стационарного платинового электрода. Кинетика движения H^+ -ионов определялась с помощью рН-метра, соединенного с потенциометром EZ-2. Электропроводность искусственной липидной мембраны, сформированной из фосфатидилэтаноламина по способу (⁶), измерялась путем сравнения напряжения на эталонном сопротивлении и сопротивлении мембраны. Контролем являлись опыты с добавлением нетоксичной фракции перфузата с тем же молекулярным весом.

В первой серии экспериментов (рис. 1) эффект ИТ исследовался на митохондриях, инкубированных в среде NH_4NO_3 . Согласно (³), набухание митохондрий в этих средах можно вызвать разобщителями окислительно-фосфорилирования, транспортирующими H^+ -ионы в матриксное пространство. Появление во внутреннем пространстве катиона NH_4^+ вызывало движение проникающего аниона NO_3^- и H_2O и, следовательно, увеличение объема (рис. 1а). Последующее введение в среду инкубации АТФ приводило к противоположно направленному перемещению ионов и сокращению митохондрий. При добавлении к интактным препаратам 0,8 мμ ИТ происходило быстрое набухание митохондрий. В отличие от предшествующего опыта, обработанные ИТ митохондрии теряли осмотические свойства, что свидетельствовало о появлении проводимости не только к H^+ -ионам, но и неспецифической проводимости к различным компонентам среды. Ни АТФ, ни субстраты окисления не способны были вызвать процесс сокращения митохондрий. Однако предварительная обработка последних ротеноном препятствовала развитию набухания. Тем не менее последующее добавление разобщителя приводило к такому же увеличе-

нию объема, как и у интактных препаратов. При обработке ИТ митохондрий, находящихся в среде KNO_3 , так же быстро увеличивался их объем (рис. 2), и при этом нарушались осмотические свойства при добавлении раствора KCl . Скорость набухания увеличивалась при возрастании концентрации ИТ (0,3; 0,4; 0,8 μg). Ротенон, как и в предыдущих экспериментах, блокировал повреждающий эффект ИТ, но не препятствовал развитию высокоамплитудного набухания, вызванного активным поглощением

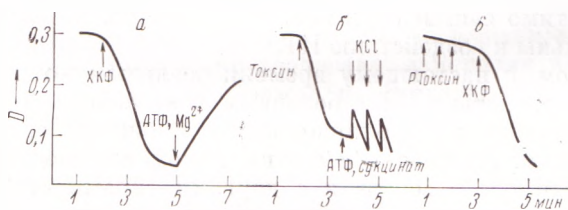


Рис. 1. Влияние ишемического токсина на изменение митохондриального объема. Среда: NH_4NO_3 100 мМ, трис- HCl 5 мМ, рН 7,4, ХКФ (хлоркарбонилцианидфенилгидрозон) $3 \cdot 10^{-7}$ М, токсин 0,8 μg , АТФ, Mg^{2+} 5 мМ, KCl 50 осмотических ммол. ротенон 2 μg на 1 мг белка, митохондрии 2 мг белка в кювете. а — набухание и сокращение митохондрий после воздействия ишемического токсина, б — влияние ротенона (Р), ишемического токсина и разобщителя ХКФ

ем ионов Ca^{2+} и фосфата (рис. 2в). Исследование кинетики H^+ -ионов при транспорте Ca^{2+} в митохондриях показало, что, в отличие от контрольных препаратов, митохондрии, обработанные ИТ, более быстро и при меньших концентрациях Ca^{2+} увеличиваются в объеме. Введение контрольной фракции не вызывало набухания митохондрий (рис. 2б).

Полученные данные позволяют считать, что ИТ способен модифицировать свойства внутренней митохондриальной мембраны, увеличивая ее проницаемость к ионам H^+ , а также K и Cl . Это сопровождается увеличением объема митохондрий и, согласно представлениям хемиосмотической теории сопряжения (⁵), должно приводить к снижению дыхательного контроля и синтеза АТФ. Действительно, при полярографическом исследовании оказалось, что добавление ИТ к интактным митохондриям,

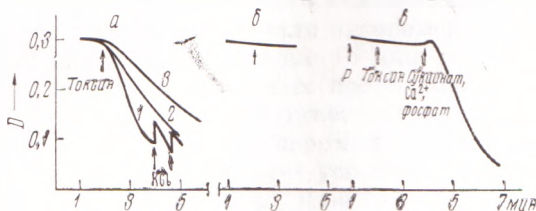


Рис. 2. Набухание митохондрий в среде, содержащей KNO_3 . Среда: KNO_3 100 мМ, трис- HCl 5 мМ, Ca^{2+} 150 μM , фосфат 5 мМ, сукцинат 5 мМ. а — влияние различных доз ишемического токсина (1 — 0,8 μg , 2 — 0,4 μg , 3 — 0,3 μg), б — действие контрольной фракции, в — действие ротенона (Р), Ca^{2+} , сукцината и фосфата

окисляющим сукцинат, приводило к увеличению скорости дыхания в отрегулированном состоянии и отсутствию ответов на добавку АДФ. Эти факты подтверждают высказанное положение и дают основание для заключения о том, что эффект ИТ зависит от его первичного действия на мембрану митохондрий, снижения исходно высокого электрического сопротивления, повышения проницаемости к ионам среды и развивающегося вследствие этого разобщения.

Результаты опытов, в которых изучалось влияние ИТ на сопротивление фосфатидилэтаноламиновой мембраны, показали, что эффект ИТ на проницаемость митохондриальных мембран реализуется не через его первичное взаимодействие с фосфолипидным компонентом, так как электрические характеристики фосфолипидных мембран не изменялись. По-видимому, ИТ взаимодействует с белковым компонентом мембран митохондрий, локализованным в области I комплекса и способным связываться с ротеноном. Это подтверждается тем, что митохондрии, обработанные ротеноном, необратимо связывающимся, как известно, в области I комплекса, нечувствительны к воздействию ИТ.

Таким образом, к настоящему времени реальным может быть предположение о взаимодействии ИТ с белковым компонентом I комплекса, вызывающем увеличение их проницаемости и снижение способности к аккумуляции энергии. По аналогии с этим феноменом можно ожидать, что ИТ способен взаимодействовать и с другими типами биомембран, обладающими подходящими рецепторными группами, и вызывать увеличение их проницаемости.

Лаборатория по пересадке органов и тканей
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
2 VIII 1973

Институт клинической и
экспериментальной медицины
Сибирского филиала
Академии медицинских наук СССР
Новосибирск

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. М. Оксман, М. В. Далин, В. В. Кованов, ДАН, 199, № 4, 980 (1971).
² Л. М. Сабурова, Белковое и электролитное равновесие при реплантации конечности, Кандидатская диссертация, М., 1967. ³ G. P. Brierley, C. D. Stoner, Biochemistry, № 9, 708 (1970). ⁴ O. Eiken, Surgical Forum, 14, 204 (1963).
⁵ P. Mitchell, Nature, 191, 144 (1961). ⁶ P. Muller, D. O. Rudin, Biochem. Biophys. Res. Commun., 26, № 4, 398 (1967).