

И. В. ЛЕВАНДОВСКИЙ, В. В. ЛЯХОВИЧ, Т. М. ОКСМАН,
И. Б. ЦЫРЛОВ, действительный член АМН СССР В. В. КОВАНОВ

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ТОКСИНА

Выделенный из ишемизированных тканей, при различных видах острой ишемии, ишемический токсин (1) оказывает значительное влияние на структурную организацию митохондриальных мембран, приводя к неспецифическому повышению проницаемости для компонентов среды инкубации и увеличению объема (2). Исходя из хемосмотической теории сопряжения (3) очевидно, что подобное изменение митохондриальной структуры должно приводить к снижению способности к аккумуляции энергии и осуществлению энергетических реакций. В связи с этим для выяснения механизма действия ишемического токсина (ИТ) представляло интерес проследить влияние ИТ на систему сопряженного дыхания в мембранах митохондрий, возможность повышения проницаемости мембран митохондрий в результате взаимодействия ИТ с тиоловыми группами внутренней митохондриальной мембраны и сравнить с влиянием ИТ на систему, способную лишь к свободному окислению.

Митохондрии печени крыс выделяли дифференциальным центрифугированием в 0,25 M сахарозе + 5 mM трис-HCl, pH 7,4 + 1 mM ЭДТА. Скорость поглощения O₂ регистрировалась полярографически, а кинетика движения H⁺-ионов — с помощью pH-метрической техники. Микросомы печени крыс выделяли, как было описано нами ранее (4). Цитохромы P₄₅₀ и P₄₂₀ определяли с помощью спектрофотометра «Hitachi-356» (4), НАДФ-Н-цитохром-с-редуктазу по методу (5), а НАДФ-Н-цитохром-P₄₅₀-редуктазу — по методу (6), метаболизм аминопирина регистрировали по накоплению конечного продукта реакции по методу (7). Связывание субстратов с цитохромом P₄₅₀ определяли по методу (8), белок — по методу (9). Представленные результаты являются средними из 3—4 препаратов микросом. Каждый препарат содержит микросомы, выделенные из печени 4—5 крыс.

Обработанные 1 мкг белка ИТ митохондрии набухали, причем последующая энергизация при помощи сукцината не вызывала сокращения, т. е. выхода ионов и воды (рис. 1а). Добавление в среду инкубации дитиотрейтола (ДТТ) восстанавливало исходные свойства митохондрий и возвращало им способность к энергизации и энергезависимому выходу ионов, что подтверждалось сокращением митохондрий при добавлении сукцината и АТФ (рис. 1б). Предварительное введение в среду инкубации ДТТ предотвращало набухание митохондрий, вызываемое ИТ (рис. 1в). Тицичный SH-реагент парахлормеркурийбензоат (ПХМБ) в дозе 5 мкМ, взятый для сравнения, вызывал подобное, как и ИТ, набухание митохондрий и точно так же сукцинат и АТФ были эффективны лишь после добавления ДТТ (рис. 1г).

Митохондрии после действия ИТ в меньшей степени оказались способными аккумулялировать и удерживать ионы Са в присутствии органического фосфата; они поглощали меньше Са, чем в норме, и быстрее набухали (рис. 2).

Обработка митохондрий ИТ вызывала значительное ускорение дыхания стадии 4 (ср. с рис. 3а). Введенный на этом фоне цитохром с вос-

становливал исходную скорость переноса электронов до стадии 3 (рис. 3б). ДТТ предотвращал ускорение дыхания, вызываемое одним ИТ. Добавление хлоркарбонилцианидфенилгидрозола (ХКФ) вызывало, как и в контрольных опытах, значительное ускорение дыхания (рис. 3в). Влияние ДТТ на фоне действия ИТ снижало скорость окисления сукцината в стадии 4 до величин, близких к контрольным.

При добавлении ИТ к микросомам выяснилось, что он лишь в небольшой степени способен снижать количество цитохрома P_{450} — гемопротеида, осуществляющего в микросомах монооксигеназные реакции. Так, содержание цитохрома P_{450} (в нмол. P_{450} на 1 мг белка) составляло в конт-

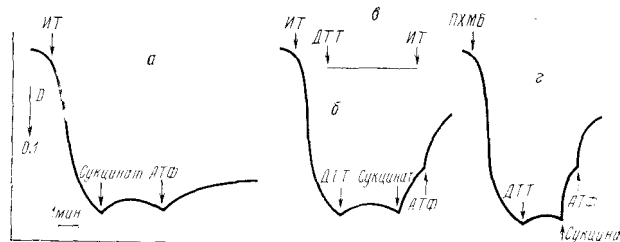


Рис. 1. Влияние ишемического токсина на изменение митохондриального объема. Среда: NH_4NO_3 100 ммол.; трис-НСI 5 ммол., pH 7,4; ИТ 1 мкг белка; митохондрии 50 мкг; ДТТ 50 мкг; АТФ 250 мкмол.; ПХМБ 5 мкг; сукцинат 200 мкмол. а — набухание митохондрий после воздействия ИТ, б — восстановление свойств митохондрий ДТТ, в — предотвращение ДТТ действия ИТ, г — прекращение ДТТ действия ИТ

роле 0,85, при добавлении 1 мкг ИТ на 1 мг белка составляло 0,72, при добавлении 2 мкг ИТ 0,69.

ИТ не изменял скорость НАДФ-Н-цитохром-с-редуктазной реакции и лишь в незначительной степени снижал НАДФ-Н-цитохром- P_{450} -редуктазу. Активность (в нмол. цитохрома с в 1 мин. на 1 мг белка) для НАДФ-Н-цитохром-с-редуктазы в контроле равнялась 81, при добавлении 1 мкг ИТ на 1 мг белка — 80, при добавлении 2 мкг ИТ 79; для НАДФ-Н-цитохром- P_{450} -редуктазы она составляла в контроле 1,76, при добавлении 1 мкг ИТ была равна 1,4, при добавлении 2 мкг ИТ 1,3. При исследовании величины K_s — спектральной константы связывания, отражающей степень сродства метаболизируемых субстратов к цитохрому P_{450} , было обнаружено, что ИТ повышает ее для аминопирина, что свидетельствует о снижении сродства фермента к этому субстрату, причем метаболизм аминопирина снижался не очень значительно. Величина K_s в контроле была равна 190 мкмол., при добавлении 1 мкг ИТ на 1 мг белка 240 мкмол., при добавлении 2 мкг ИТ 260, в то же время метаболизм аминопирина, определяемый числом нмолей НСОН в 1 мин. на 1 мг белка, выражался следующими величинами: в контроле 3, 4, при добавлении 1 мкг ИТ 3,0, при добавлении 2 мкг ИТ 2,8.

Таким образом, введение ИТ оказывает повреждающее влияние на структуру и функцию митохондриального аппарата и приводит к неспособности мембран удерживать генерируемую разность потенциалов, вызывая снижение окислительного фосфорилирования и отсюда снижение выработки АТФ. Это положение подтверждается потерей цитохрома с, являющегося слабо связанным дыхательным переносчиком, под влиянием ИТ. Снижение активного переноса ионов Ca^{2+} против градиента концентраций также указывает на снижение способности к энерготрансформирующим реакциям. На основании того, что влияние ИТ может быть прекращено или предупреждено ДТТ, восстанавливающим функциональную способность SH-групп, можно предполагать, что точкой действия ИТ на мембране митохондрий могут быть SH-группы, ответственные за поддер-

жание ее структурной интеграции и низкой протонной проводимости (¹⁰). Вероятно, ИТ, связываясь с SH-группами митохондриальных мембран, вызывает частичную дезэнергизацию митохондрий, увеличивая скорость поглощения O₂ в стадии 4. В отличие от эффектов на митохондриях, ИТ оказывает не столь выраженное влияние на систему свободного окисления в микросомах печени, приводя лишь к незначительному снижению ее метаболической активности. Этот факт становится понятным,

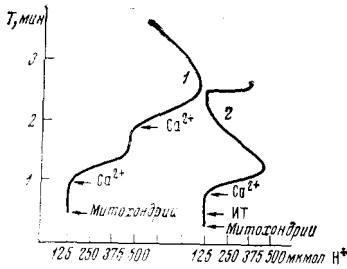


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика движения H⁺-ионов в процессе аккумуляции Ca²⁺ митохондриями. Среда: KCl 125 ммоль; глицил-глицин 3,3 ммоль, pH 7,4; фосфат (KH₂PO₄) 1 ммоль; сукцинат 5 ммоль; Ca²⁺ 100 мкмоль; ротенон 5 мкг; митохондрии 5 мг; ИТ 1 мкг. 1 — контроль, 2 — введение ИТ

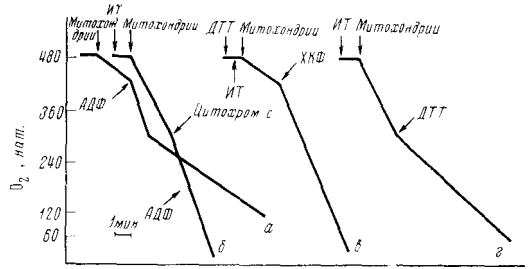


Рис. 3

Рис. 3. Поглощение O₂ митохондриями. Среда: 125 ммоль KCl; трис-HCl 10 ммоль, pH 7,4; АДФ 100 мкмоль; сукцинат 5 ммоль; ИТ 1 мкг белка; ДТТ 50 мкг; ХНФ 3·10⁻⁷ мол.; цитохром с 10 мкмоль. а — поглощение O₂ интактными митохондриями, б — влияние ИТ на дыхание митохондрий, в, г — взаимодействие ИТ с ДТТ

если предположить, что ИТ воздействует главным образом на мембранные структуры исследованных внутриклеточных компонентов, а не прямо на локализованные в них системы свободного окисления. Поскольку сопрягающая функция митохондрий intimately связана со структурным состоянием этих органелл, являющихся электрическим и осмотическим барьером между цитоплазмой и матриксным пространством, то изменение свойств этого барьера приводит к потере фосфорилирующей способности. Мембраны эндоплазматического ретикулума, не способные к генерации потенциала и синтезу АТФ, в меньшей степени подвержены повреждающему влиянию ИТ, а прямое действие на ферментные комплексы микросом проявляется не столь выразительно.

Эти данные подтверждают высказанный ранее тезис о повреждающем влиянии ИТ на структуру и функцию митохондриального аппарата. Вероятно, ИТ оказывает свое влияние благодаря взаимодействию с SH-группами внутренней митохондриальной мембраны. Очевидно, что именно митохондрии являются в клетке теми частицами, на которые прежде всего может воздействовать ИТ.

Лаборатория по пересадке органов и тканей
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
5 IX 1974

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, т. 199, № 4, 980 (1971). ² И. В. Левандовский, В. В. Ляхович и др., ДАН, т. 214, № 6, 1460 (1974). ³ P. Mitchell, Nature, v. 191, 144 (1961). ⁴ J. B. Tsyrlor, V. M. Mishin, V. W. Lyakhovich, Life Sciences, v. 11, 1045 (1972). ⁵ A. H. Phillips, R. Y. Langdon, J. Biol. Chem., v. 237, 2652 (1962). ⁶ Y. Gnosspelliuss, H. Thor, S. Orrenius, Chem. Biol. Interaction, v. 1, 125 (1969–1970). ⁷ T. Nash, Biochem. J., v. 55, 416 (1953). ⁸ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁹ J. B. Shenkman, H. Remmer, R. W. Estabrook, Mol. Pharm., v. 3, 113 (1967). ¹⁰ G. P. Brierley, K. M. Scott, M. J. Jurkowitz, J. Biol. Chem., v. 246, 2241 (1971).