

**ОРИГИНАЛЬНЫЙ ЦИТО-БИО-ХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ
ИНДИВИДУАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ПО
КОМПЛЕКСНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ (ПАТТЕРНУ)
АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ***

М.Н. Кондрашова, Н.В. Хундерякова, М.В. Захарченко

mkondrashova23@inbox.ru

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино.

142290, г. Пущино Московской обл. ул. Институтская, 3.

Тел. (495) 632-78-69

АННОТАЦИЯ

Разработан новый метод, определения активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях. Он назван цито-био-химическим, так как объединяет преимущества стандартного цитохимического метода изучения ферментов, фиксированных на стекле в лимфоцитах на мазке крови и современных биохимических методов исследования митохондрий. В результате на мазке крови цитобиохимическим методом выявляется ответ сукцинатдегидрогеназы (СДГ) на действие адреналина в организме, на 200- 400% и более превышающий активность в покое, вместо активации на 20-40%, определяемой принятыми методами.

Важным достоинством метода, проводимого путем компьютеризованного видеомикроскопирования множества окрашенных объектов в одном мазке является статистическая достоверность каждой отдельной получаемой величины. Кроме активности, разработанные усовершенствования позволяют выявить различные функциональные состояния СДГ. Новые показатели являются чувствительными характеристиками индивидуальных различий состояния организма в норме, предпатологии и заболеваниях.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, цитохимия, митохондрии, адреналин, диагностикум, лимфоциты

**NOVEL CYTO-BIO - CHEMICAL METHOD FOR REVEALING INDIVIDUAL DIFFERENCIES
OF PHYSIOLOGICAL STATES OF THE ORGANISM BY COMPLEX CHARACTER (PATTERN)
OF SUCCINATE DEHYDROGENASE ACTIVITY**

M.N.Kondrashova, N.V.Khunderyakova, M.V.Zakharchenko

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino.
mkondrashova23@inbox.ru

Novel method of succinate dehydrogenase (SDH) activity measurement in lymphocytes in smear of blood is elaborated. It is called: cyto-bio-chemical, because it combines the advantages of the standard cytochemical assay to study glass-adhered enzymes with that of modern biochemical methods for investigation of mitochondria. As a result, cytobiochemical method reveals in a smear of blood response of SDH to adrenaline in the organism which exceeds the level of quiescent state 200-400% and more instead of 20-40% activation determined by current methods. The important advantage of the method carried out by computer videomicroscopy of a great number of stained objects in a single smear is statistical validity of the each separate value obtained. The novel improvements make it possible to determine SDH activity more correctly and besides to reveal its different functional states. Novel tests are sensitive characters of individual differences in the state of the organism in norm, prepathology and diseases.

Key words: succinate dehydrogenase, cytochemistry, mitochondria, adrenaline, diagnostic set, lymphocytes

*Лекция, прочитанная на VI Симпозиуме "Регуляторы энергетического обмена.

Клинико-Фармакологические аспекты" в Томском Научном Центре СО РАМН

Введение. Информативность сукцинатдегидрогеназы как показателя состояния организма.

Одним из современных направлений медицины является подход к патогенезу и лечению путем выяснения роли митохондрий в формировании физиологических и патологических состояний организма и попыток коррекции нарушений митохондриальных процессов. Сложились такие пограничные между биохимией, физиологией и медициной области знания как Митохондриальная физиология, Митохондриальные болезни, Митохондриальная медицина. Они основаны на знании участия первичных, генетических или вторичных, фенотипических нарушений митохондриальных процессов в поддержания здоровья, развития патологических нарушений, их профилактики и лечения. Эти области стремительно разрастаются, приводим несколько ссылок, касающихся окислительного метаболизма, являющегося предметом нашего исследования [1-5].

Роль митохондрий в формировании физиологического состояния организма была предметом исследования в нашей стране, в частности в нашей группе, задолго до современного подъема интереса к этому вопросу в международном сообществе. У нас сложилось хорошо известное в России

оригинальное представление, согласно которому субстраты окисления в митохондриях играют роль регуляторов физиологического состояния. Началось с наиболее яркого явления - огромного преимущества окисления янтарной кислоты (ЯНТ) как источника энергии в митохондриях над другими субстратами. На основе этого возникло предположение, что окисление ЯНТ является основным источником энергообеспечения при активности в отличие от покоя [6]. Вскоре выяснилось, что регуляция ЯНТ выходит за границы митохондрий. Ранними работами нашей группы еще в 1976 и 1982 годах было показано, что в низких микромолярных концентрациях ЯНТ осуществляет регуляцию гипоталамуса в организме и стимулирует выброс адреналина и норадреналина [см. в обзорах 7, 8]. Эти гормоны в свою очередь активируют образование и окисление ЯНТ [6-10]. Выявление двустороннего взаимодействия субстрата окисления ЯНТ и гормонов адреналина и норадреналина привело к представлению о существовании в организме субстратно-гормональной системы регуляции. Было обнаружено также, что существует вторая часть этой системы, включающая взаимодействие α -кетоглутаровой кислоты и ацетилхолина [11-13]. Таким образом, субстратно-гормональная система связывает симпатическую и парасимпатическую нервную систему с процессами в митохондриях [14].

Действие низких доз ЯНТ было названо нами сигнальным [15-18]. Этот термин применительно к ЯНТ независимо появился значительно позже в работе по обнаружению рецептора к ЯНТ [19], что является важным подтверждением наших представлений о существовании субстратно-гормональной системы, которая должна включать специальные рецепторы. Интересно заметить, что авторы этой работы обнаружили рецепторы только именно к этим двум субстратам цикла Кребса, хотя как они сами отмечают, причины этого остались непонятными. С нашей точки зрения это свидетельствует о физиологической регуляторной роли именно этих двух субстратов.

Обширные по тематике и территории исследования по применению ЯНТ для оздоровления и лечения, проводящиеся в России на протяжении уже значительного времени представляют мощную практическую поддержку представлений о ее физиологической роли, сложившихся на основании исследований на животных [20-22].

Применение основанных на ЯНТ оздоровительных и лечебных средств особенно требует новых методов, которые бы позволили заглянуть внутрь митохондрий данного человека, чтобы осуществить индивидуализированную диагностику и оптимизацию его состояния. В многолетних попытках на животных использовать для этой цели современные принятые биохимические методы изучения энергетических процессов в митохондриях мы убедились в их малой чувствительности к изменению состояния в организме. Полагая, что причиной этого является грубое разрушение структурной организации митохондрий при их выделении, мы пытались использовать мало разведенный гомогенат

в физиологической концентрации хлористого калия [23, 24]. В этих препаратах сохранялись части митохондриально-ретикулярной сети, в форме которой митохондрии существуют в интактной клетке. Микроскопические исследования такого гомогената впервые выявили распад сети при стрессовых воздействиях в организме, а также привели к обнаружению двух природных факторов, восстанавливающих самоорганизацию - карнозина и отрицательных ионов воздуха [25, 26]. Однако, дополнительное разведение, которое необходимо для биохимических исследований, устраняет преимущества таких препаратов. Кроме того, использование биоптатов ткани непригодно для широкого применения в клинике. Поэтому мы обратились к давно существующему опыту цитохимического изучения дегидрогеназ митохондрий по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) митохондриями в лимфоцитах на мазке крови. В таких препаратах митохондрии сохраняют присущую им структурную организацию в клетке, чему может способствовать иммобилизация на стекле в естественной клеточной среде. Имеющийся большой опыт клинического использования этого метода в лаборатории Р.П. Нарциссова и его коллег показал его информативность, особенно изменений активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), к изменениям состояния организма [27, 28]. Однако, с позиций современных условий исследования митохондрий биохимическими методами, состав сред, разработанный около полувека назад, представлялся неприемлемым. В нашей группе было проведено тщательное изучения влияния изменения концентрации отдельных компонентов среды на чувствительность метода к изменению состояния в организме и разработан состав, обеспечивающий значительное ее повышение. Более подробно развитие этих исследований и процедура проведения метода описаны в нашем патенте [29] обзоре [30] и методической статье [31]. В настоящей работе дается представление о возможностях метода, иллюстрируемое данными, полученными при обследовании здоровых добровольцев.

Принцип подбора условий для цитобиохимических исследований

Подбор состава сред проведен с целью повышения чувствительности измеряемой *ex vivo* активности СДГ к изменениям состояния организма на основе принципа, отличающегося от всех предыдущих цитохимических исследований. Обычно при подборе состава сред исследователи выбирают условия максимальной окраски контрольного показателя, отрабатываемого на контрольном животном или здоровом человеке. Получение **максимальной** окраски рассматривается как достижение максимальной чувствительности метода.

Использованный нами принцип состоит в подборе состава растворов, обеспечивающих **минимальную** окраску препаратов у интактного, спокойного животного. Это достигает цели

получения **максимальной разницы** показателей между спокойным и возбужденным организмом. У спокойного животного повышение окраски свидетельствует об активации СДГ.

Поскольку оно наблюдается при отсутствии возбуждения в организме, оно, по-видимому, обусловлено активирующим - "возбуждающим" действием компонентов раствора. Такая активация - возбуждение клеток в мазке компонентами раствора - уменьшает или полностью уничтожает наблюдение активации, реализующейся в организме. Различие между показателями активности в покое и при возбуждении организмам мы называем **физиологической чувствительностью** метода, в отличие от обычно используемого только одного показателя активности у интактных животных, который можно назвать **химической чувствительностью**. Проведенное исследование впервые предлагает такой принцип подбора состава растворов. Разработанная среда способствует максимально возможному сохранению состояния покоя в организме - *in vivo*, в клетках на мазке - *ex vivo*. Мы проводим подбор состава сред не только на спокойном животном, но и на животном, возбужденном введением активирующей дозы адреналина или стрессом. Критерием правильности подбора условий является выявление максимальной разницы показателей при разных физиологических состояниях, а не максимального окрашивания у спокойного животного. Поскольку предлагаемый способ основан на использовании современных биохимических данных для усовершенствования стандартного цитохимического метода, он назван цито-био-химическим. Мы показали, что используемые в цитохимических исследованиях состав и концентрации веществ в растворах вызывают активацию СДГ уже в норме. По этой причине дополнительная активация при возбуждении в организме слабо выявляется или даже переходит в ингибирование. Мы изменили состав и концентрации используемых веществ, приблизив их к физиологическим условиям. Это в 2-3-5 и более раз повысило чувствительность наблюдаемых *ex vivo* показателей к изменению состояния *in vivo* (физиологическая чувствительность). Состав предлагаемых нами сред, методы и интерпретация результатов подробнее описаны отдельно [29 -31], а также приведены в подписи к рис.1.

Другим важным отличием разработанного нами цитобиохимического метода, явилось то, что вместо единственного показателя активности СДГ, мы используем комплекс показателей, который позволяет, прежде всего, более правильно рассчитать саму активность СДГ и впервые охарактеризовать окисление эндогенной ЯНТ в организме и ее регуляторное сигнальное действие. Таким образом, индивидуальная характеристика человека представляется комплексом цитобиохимических показателей. Они составляют специфический паттерн (узор) личности. Мы выявили несколько таких паттернов, характерных для здоровых обследуемых, а также для пациентов. В начальном проведенном нами исследовании показано, что один и тот же тип паттерна встречается у

нескольких обследуемых из общей группы. Таким образом, он представляет собой не случайное соотношение отдельных показателей, а их закономерное сочетание.

Индивидуальные отличия цитобиохимических показателей здоровых людей.

На рис. 1 показано выраженное отличие окраски лимфоцитов двух здоровых женщин 32 лет. Видно, что окраска НСТ, отражающая активность СДГ, значительно сильнее у обследуемой Б, чем у обследуемой А. Их можно характеризовать как более возбужденную и более спокойную соответственно, поскольку аналогичное повышение активности СДГ мы наблюдали у крыс после введения адреналина [29,30].

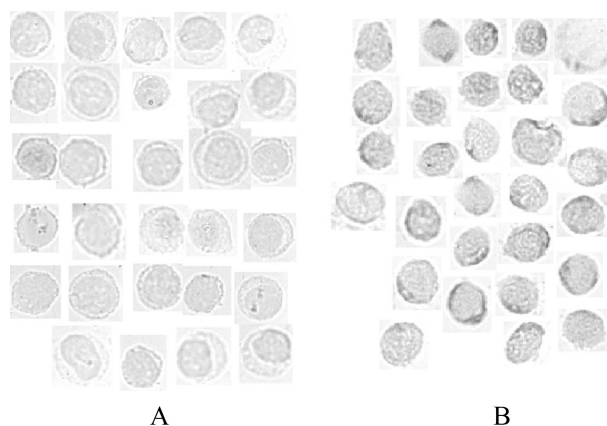


Рис.1. Видеомикроскопическое изображение лимфоцитов человека на мазке крови.

Окрашивание НСТ проводили в разработанной авторами среде, приближенной к физиологической, содержащей: 125 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1,22 НСТ, pH $7,2 \pm 0,05$. Окраска развивается в течение часа при 37° С. А - покой, Б - возбужденная норма.

Величина различий, наблюдаемых в наших условиях, значительно больше, чем выявляется между здоровыми людьми принятыми методами. Как видно из рис. 1, она очевидна и на глаз, и как показано на рис. 2 выражается количественно при компьютерной видеомикроскопической обработке.

Важным достоинством метода, проводимого путем компьютеризованного видеомикроскопирования множества окрашенных объектов в 30 лимфоцитах является высокая статистическая достоверность каждой отдельной получаемой величины. Число окрашенных объектов составляет 250-350 для проб со средней активностью, до 600-700 для проб с высокой активностью и порядка 100 для проб с низкой активностью. Даже для меньшего числа объектов $p = 0,001$. Высокая физиологическая чувствительность и статистическая надежность метода позволили выявить существование подгрупп с разным уровнем покоя или возбужденности среди здоровых обследуемых

возраста 27-32 лет, в основном магистрантов и аспирантов Пушкинского Государственного Университета.

На рис. 2 приведены комплексы измерений нескольких показателей восстановления НСТ, которые мы называем паттернами или узорами. На рисунке представлено по одному примеру для каждого из четырех выявленных паттернов. Однако, как показано далее, каждый из этих типов встречается у нескольких индивидуумов в обследуемой группе.

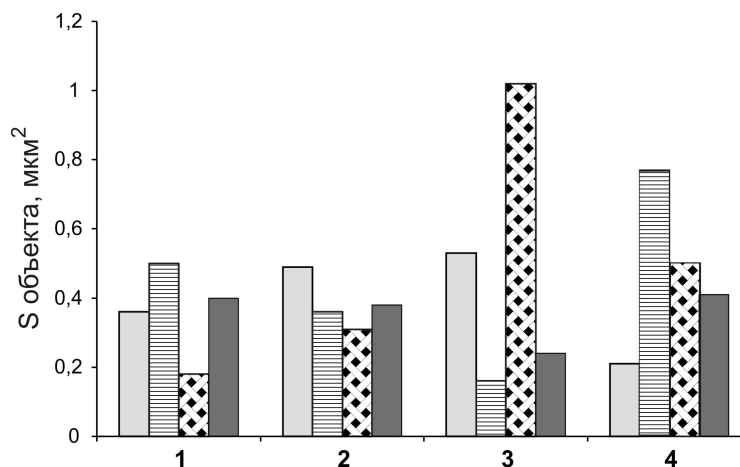


Рис.2. Цитобиохимические паттерны СДГ для здоровых добровольцев.

1 - 4 индивидуальные примеры. Восстановление НСТ за счет окисления эндогенных субстратов (ЭС) - серые столбики; ЭС + 5 мМ малоната (МАЛ) - горизонтальные полоски; субстрата СДГ 5мМ ЯНТ - шахматная штриховка; 5 мкМ ЯНТ - темно-серые столбики. Измерение восстановления НСТ при добавлении 5 мМ ЯНТ соответствует определению активности СДГ, принятому в цитохимии, только при более высоких концентрациях и другой среде. Как указано ниже, мы проводим дополнительные расчеты с использованием показателей первых двух проб, которые позволяют более точно определить активность СДГ (29-31). Измерение в присутствии 5 мкМ ЯНТ представляет попытку измерить сигнальное действие ЯНТ. В данной работе приводятся величины средней площади одного окрашенного объекта (S), полученной делением общей окрашенной площади на число объектов.

Приведенные на рис 2 паттерны цитобиохимических показателей СДГ 2 и 3 соответствуют микрофотографиям лимфоцитов спокойной и возбужденной обследуемых А и Б, представленным на рис. 1. Прежде всего, видно выраженное повышение третьей пробы в паттерне, отражающей активность СДГ, у возбужденной обследуемой относительно спокойной. Важным новым показателем, предложенным нами, является величина восстановления на ЭС и действие на нее МАЛ. Величины восстановления на ЭС близки у обеих обследуемых, но у спокойной величина на ЭС почти вдвое больше, чем активность СДГ, а у возбужденной вдвое ниже активности ее СДГ. Очень информативным новым показателем является влияние МАЛ на восстановление за счет ЭС. В рассматриваемых двух случаях, 2 и 3 МАЛ снижает восстановление, причем и по абсолютной

величине и относительно пробы с ЭС больше у возбужденной. Это указывает на большее участие в окислении эндогенной ЯНТ у возбужденной, что соответствует данным об активации окисления ЯНТ при возбуждении адреналином. Предлагаемые измерения позволяют более точно определить величину активности СДГ. Из показателей пробы с добавлением 5мМ ЯНТ (третьи столбики в паттернах) необходимо вычесть восстановление НСТ за счет ЭС, а точнее показатели пробы с МАЛ, так как она вычлняет и вклад эндогенной ЯНТ. Получаемая разность является более точным определением восстановления НСТ за счет добавленной ЯНТ. Она ближе к истинному значению, поэтому мы обозначаем ее как "истинную" в отличие от обычно определяемой активности, которую можно назвать "общей". Учет дополнительных введенных нами показателей позволяет охарактеризовать не только активность СДГ, но и ее функциональное состояние. Описанные паттерны 2 и 3 мы определяем как состояние покоя и активности СДГ соответственно.

Информативность проб с ЭС и МАЛ позволяет уверенно выделить еще один тип паттерна, представленный первым слева примером 1. Видно, что общая активность СДГ тоже низка, подобно примеру 2. Однако, между ними та разница, что МАЛ в первом случае не уменьшает, а увеличивает восстановление на ЭС. Такое увеличение может быть небольшим и очень большим (как в примере 4), но оно принципиально отличается тем, что МАЛ не снижает а повышает восстановленность НСТ. Это указывает на отсутствие вклада ЯНТ в окисление ЭС. Возможные причины восстановления рассмотрены ранее (29) и могут быть специально исследованы. Однако, несомненно, отсутствие вклада эндогенной ЯНТ в окисление. Это дает основание выделить подтип на примере 1 как состояние более глубокого покоя СДГ, чем на примере 2. Состояние покоя СДГ на примере 2 можно назвать оперативным покоем потому, что ввиду поддержания участия ЯНТ в окислении, можно полагать, что переход из него к активности осуществляется более быстро, как например, у спортсменов после разминки. Напротив, состояние покоя в примере 1 можно расценивать как более глубокое, переход из которого к активности замедлен. Рассмотрение комплекса показателей позволяет обнаружить на человеке явление, показанное в нашей лаборатории на животных, а именно полное отсутствие активности СДГ в состоянии покоя. Видно, что восстановление НСТ в пробе с добавлением миллимолярных концентраций ЯНТ равно восстановлению с МАЛ при оперативном покое и в три раза ниже такового для глубокого покоя. Таким образом, если вычесть восстановление НСТ без добавки ЯНТ из показателя его восстановления при добавлении ЯНТ, выявится полное отсутствие активности фермента, несмотря на добавление его субстрата. Это мы рассматриваем как указание на латентное или "спящее" состояние СДГ в состоянии глубокого покоя. Поскольку СДГ активируется адреналином, отсутствие активности свидетельствует о меньшей выраженности симпатической активации у этих обследуемых. Это соответствует физиологическим представлениям о

реципрокном попеременном включении - выключении симпатической и парасимпатической регуляции в организме при активности и покое соответственно, что соответствует принципу "все или ничего". Такой механизм впервые выявлен в биохимических исследованиях, по-видимому, потому, что никогда до сих пор не удавалось сохранить нативную структуру митохондрий при определении активности СДГ. Состояние СДГ у обследуемой с более высокой активностью мы определяем как физиологическую активацию или просто активацию. Оно наблюдается при нормальном физиологическом состоянии организма и отражает большую выраженность симпатической регуляции.

Кроме рассмотренных примеров, у здоровых молодых людей при перенапряжении, например, после бессонной ночи после повторного экзамена, к тому же связанного с поездкой в Москву из Пущино, пример 4 на рис. 2, встречается паттерн СДГ, приближающийся к состоянию гиперактивации с ингибированием, характерный для гипертонии [29, 31] см. также далее рис.3В. Это состояние характеризуется повышением малонатом восстановления НСТ на ЭС более чем вдвое и снижением активности СДГ по сравнению с состоянием активации также примерно вдвое. Мы его определяем как состояние активации с ингибированием. Оно четко отличается от нормальной активации тем, что добавление ИЗЛ повышает активность СДГ при ингибировании и не влияет на нее при нормальной активации (рис. 3, и работы [29, 31]). Поскольку добавление ИЗЛ при гипертонии реализует более высокую активность СДГ, чем при напряжении у здоровых, мы называем паттерн СДГ при гипертонии: гиперактивация с ингибированием, а паттерн у здоровых при напряжении: активация с ингибированием.

Наконец, последним новым показателем состояния организма является восстановление НСТ при применении сигнальной концентрации ЯНТ. Восстановление при микромолярных концентрациях ЯНТ невелико при отсутствии ингибирования СДГ. Однако оно повышается при его появлении. Это видно и на примере 4 рис.2, и наблюдалось нами в еще более сильной степени в работах [16, 29] и в других случаях, которые будут описаны отдельно.

Показанные на рис.2 единичные примеры типов паттернов встречаются в группе обследуемых неоднократно. Это показано в Приложении на рис.2а, где приведено по три примера для каждого паттерна.

При различиях показателей по абсолютной величине общий тип - узор ответа хорошо воспроизводится, что подтверждается адекватной статистической обработкой. Других сочетаний в обследуемой группе не было выявлено.

Типичные сочетания цитобиохимических показателей приведены в таблице.

Таблица

СДГ Общая ЯНТ 5мМЭС + Мал 5мМЭндогенные субстратыПодгруппы Проба 3 Проба 2 (ЭС) Проба 1	СДГ Истинная (Расчет)
0,29 ± 0,090,34 ± 0,080,43 ± 0,101. Глубокий покой n=7	0 (-0,05 ± 0,1) (3 - 1)
0,31 ± 0,060,40 ± 0,090,29 ± 0,092. Оперативный покой n=6	0 (0,03 ± 0,1) (3 - 2)
0,75 ± 0,26#0,19 ± 0,06#0,6 ± 0,243. Активация n=3	0,56 ± 0,29 (3 - 2)
0,46 ± 0,04#0,41 ± 0,190,74 ± 0,23#4. Активация с ингибированием n=4	0,05 ± 0,23 (3 - 1)

Типичные сочетания (паттерны) цитобиохимических показателей восстановления НСТ у здоровых людей.

Приведены в мкм² средние значения площади окраски одного объекта. Данные представляют средние и стандартные отклонения. Различия достоверны по сравнению с показателями для глубокого покоя по непараметрическому U-критерию Вилкоксона - Манна - Уитни, #p ≤ 0,05. Истинную активность СДГ рассчитывали как разность между пробой с добавлением ЯНТ и одной из проб без ее добавления, что указано в скобках.

Изменения истинной СДГ относительно двух групп покоя, равных нулю, нельзя выразить числом, так как деление на 0 невозможно. Эти изменения можно описать как выключение и включение. Нулевые значения активности СДГ обозначены жирным шрифтом, чтобы выделить впервые выявленное латентное, выключенное, "спящее" состояние.

Изменение цитобиохимического паттерна при предпатологических состояниях у трудоспособных людей

Разработанный нами метод позволяет обнаружить различный объем вовлечения метаболических процессов при начале развития патологических сдвигов у работоспособных людей. Наглядным примером может служить сопоставление паттернов у трех обследуемых женщин, находящихся на

работе в 8-9 часов утра и пребывавших в состоянии относительного покоя в момент взятия крови (рис.3). Особенности образа жизни и состояния обследуемых указаны в подписи к рисунку.

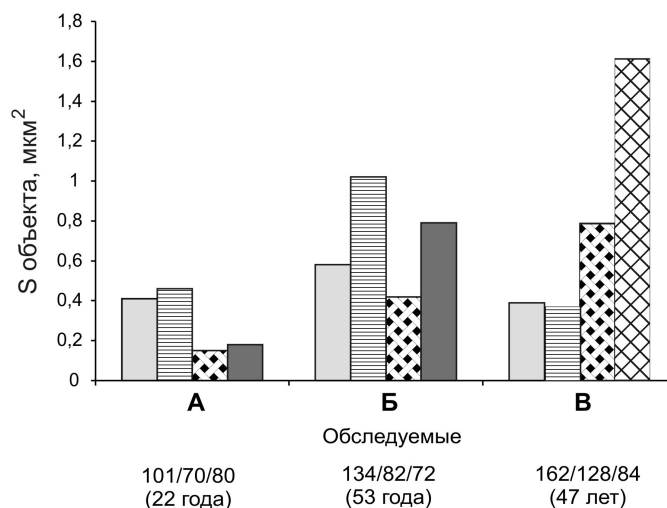


Рис.3. Примеры сопоставления цитобиохимических паттернов восстановления НСТ с АД у трех женщин (Обозначения как на рис.2), а в паттерне В сеточка представляет - восстановление НСТ при добавлении 5 мМ ЯНТ + 5мМ ИЗЛ. Внизу приведены величины артериального давления в мм. рт. столба, систолическое/диастолическое/пульс и возраст.

А. Состояние глубокого покоя СДГ. Обследуемая - научный работник, работоспособна, однако жалуется на постоянное недомогание, несмотря на жизнь в условиях экологически благоприятного города Пущино.

Б. Состояние СДГ - активация, сдерживаемая ингибированием. Обследуемая - научный работник, работоспособна, принимает аденоблокатор, испытывает недостаток физической активности, живет в Пущино.

В. Состояние СДГ - гиперактивация, сдерживаемая ингибированием. Обследуемая - менеджер, работоспособна, лечится по поводу пищевой аллергии и гипертонии, отличается повышенной нервозностью, живет в Москве. Активация ИЗЛ выявляет скрытое ингибирование при патологической гиперактивации СДГ [29,31].

Рис.3 представляет паттерны при развитии в организме не сильно выраженных патологических сдвигов. При этом в состоянии покоя наблюдались паттерны одного типа, но возрастающего объема. От А к Б и В артериальное давление нарастает от гипотонической величины через небольшое повышение в пределах возрастной нормы к выраженной гипертонии, сопровождающейся повышенной нервозностью. Видно, что три представленных паттерна однотипны по форме, первые два буквально идентичны, если проследить узор показателей, но значительно отличаются по амплитуде. СДГ не активирована у первой обследуемой. Учитывая ее жалобы на постоянную усталость, можно полагать, что сохранение в дневное время состояния "спящей СДГ" не является оптимальным для физиологической деятельности. Однако показатели двух других превышают физиологическую оптимальную активацию СДГ, представленную выше на рис.2. Лекарственное

сдерживание гиперактивности у обследуемой Б происходит на фоне прогрессирующей активации окисления. Гиперактивность особенно выражена у обследуемой В, при сильной гипертонии. Гиперактивность проявляется как при окислении только ЯНТ, так еще гораздо больше при добавлении активирующей СДГ изолимонной кислоты (ИЗЛ). Дополнительная активация ИЗЛ показывает значительную величину скрытой гиперактивации, характерной для длительного стресса [29]. Это показывает, что реализация относительного покоя при развитии гипертонии сопряжена с нарастающими метаболическими затратами. Более подробно характеристики СДГ при гипертонии описаны отдельно [31].

Мы назвали увеличение метаболических затрат на поддержание покоя метаболической гипертрофией. Это явление может быть аналогично морфологической гипертрофии мышц или миокарда при ослаблении их удельной мощности. В основе в обоих случаях может лежать ослабление энергетической регуляции дыхания в митохондриях.

Важным новым показателем является сохранение или потеря состояния латентности СДГ. Видно, что у двух первых обследуемых латентное состояние СДГ сохраняется, хотя у второй это происходит на возрастающем уровне всех показателей. В третьем случае при выраженной гипертонии латентное состояние СДГ утрачивается. Таким образом, качество покоя (подобно выражению качество жизни) различно по метаболической "подкладке".

Для диагноза состояния организма и способа контроля лечения можно предложить описанные новые показатели - истинную СДГ, утрату и восстановление состояния глубокого покоя с сохранением латентной СДГ, наличие и уменьшение метаболической гипертрофии. Предлагаемое более глубокое проникновение в состояние митохондрий человека представляет обширное поле для дальнейших плодотворных физиологических и медицинских исследований.

Авторы благодарны ОАО "Диод" за постоянную финансовую поддержку.

Литература

1. Rustin P., Munnich A., Rotig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme.// Eur J Human Genetic. 2002. Vol.58, №10. P. 289–291.
2. Mitochondrial Physiology (MiP). The Many Faces and Functions of an Organelle./ Ed. Erich Gnaiger – Schroecken – Vorarlberg, Austria, 2005.
3. Alaynick W.A. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism.// Mitochondrion. 2008. Vol.8, P. 329–337.

4. Сухоруков В.С., Клембовский А.И., Невструева В.В., Леонтьева И.В., Белозеров Ю.М., Себелева А.И. Митохондриальная природа кардиомиопатий у детей (анализ биоптатов скелетных мышц)// Архив патологии. 1997. Т.5, №59. С. 12–21.
5. Вишневский Е.Л., Сухоруков В.С., Пушкарь Д.Ю., Шабельникова Е.И., Вишневский А.Е., Коваль А.Л. Влияние виагры на состояние полисистемного энергетического метаболизма при стрессе (экспериментальное исследование)// Урология. 2004. Т. 4. С. 51–55.
6. Кондрашова М.Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления.// Биохимия. 1991. Т. 56. С. 388–406.
7. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий./ Маевский Е.И. и др. – ОНТИ, Пущино, 2001.
8. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты.// Вопр. Биол. Мед. Фармац. Химии. 2002. №1. С. 1–7.
9. Бабский А.М., Стефанкив Ю.С., Кондрашова М.Н., Шостаковская И.В. Субстратно-гормональная система янтарная кислота - катехоламины. Новые данные. В кн.: Митохондрии в патологии. (М.Н.Кондрашова, Ю.Г.Каминский, Е.И.Маевский ред.) ОНТИ Пущино, 2001, 14-21.
10. Хундерякова Н.В., Захарченко М.В., Захарченко А.В., Кондрашова М.Н. Гиперактивация сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови новорожденных крысят.// Биохимия. 2008. Т. 73, №3. С. 414–419.
11. Шостаковская И.В., Долиба Н.М., Бабский А.М., Кондрашова М.Н. Активация ацетилхолином окисления альфа-кетоглутарата в митохондриях печени.// Укр. Биох. Журн. 1986. Т. 58, №6. С. 54 – 61.
12. Kondrashova M.N., Doliba N.M. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine.// FEBS Lett. 1989. Vol. 243. P. 153 – 155.
13. Долиба Н.М., Кургалюк Н.Н., Абдула Локаль, Шостаковская И.В., Кондрашова М.Н. Реципрокное сукцинату и катехоламинам действие введенных альфа-кетоглутарата и ацетилхолина на окисление субстратов в митохондриях сердца и нейрогуморальный статус организма.// Митохондрии в патологии. ОНТИ Пущино, 2001. С. 21–27.
14. Кондрашова М.Н., Федотчева Н.И., Саакян И.Р., Сирота Т.В., Захарченко М.В., Леонтьев Д.С., Игнатьев Д.А., Темнов А.В., Самохвалов В.А. Субстратно-гормональная система регуляции физиологического состояния. Условия ее выявления. Использование в практике.// Горизонты биофизики. ОНТИ; НЦБИ; Пущино, 2003. С. 147–154.

15. Kondrashova M.N., Kuznetzova G.D. Succinic acid as a physiological signal molecule./ Signal molecule and behaviour. Eds. W. Winlow et. al. Manchester University Press, Manchester; New York, 1991. P. 295 –300.
16. Кондрашова М.Н., Захарченко М.В., Самохвалов В.А., Шихлярова А.И., Барсукова Л.П., Марьяновская Г.Я., Гаркави Л.М. Сигнальное действие янтарной кислоты и ее лечебное применение в малых дозах. // Регуляторы энергетического обмена. – 12 Российский Национальный конгресс «Человек и Лекарство». М, 2005. С. 8–16.
17. Kondrashova M.N., Maevsky E.I., Grigorenko E.V., Babsky A.M., Doliba N.M., Saakyan I.R., Sirota T.V., Fedotcheva N.I., Samokhvalov V.A. The interaction of Krebs cycle with sympathetic and parasympathetic nervous system. Substrate-hormonal system.// International Conference on Mitochondria, from Molecular Insight to Physiology and Pathology. 40 Years of Bari Meetings. Dedicated to Ernesto Quagliariello. Bari; Italy, 2005. P. 74.
18. Maevsky E.I., Rosenfeld A.S., Grishina E.V., Peskov A.B., Kondrashova M.N. Signal, sympathetic action of succinate in experimental and clinical studies.// BBA, Suppl., 14th EBEC Short Reports. 2006. Vol. 14. P. 536–537.
19. He, W., Miao, F.J. - P., Lin, D.C. – H., Schwandner, R.T., Wang, Z., Gao, J., Chen, J.- L., Tlan, H., and Ling, L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors.// Nature, 2004. Vol. 429. P. 188–193.
20. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве./ Под ред. М.Н. Кондрашова и др. ОНТИ, Пущино, 1997.
21. Митохондрии в патологии./ Под ред. М.Н. Кондрашова и др. – ОНТИ, Пущино, 2001.
22. Регуляторы энергетического обмена. Клинико-фармакологические аспекты.// Материалы симпозиумов на IX, X, XI, XII, XIII Российском Национальном конгрессе «Человек и Лекарство»./ Под ред. В.А. Хазанов. – М, 2002; 2003; 2004;2005; 2006.
23. Кондрашова М.Н., Сирота Т.В., Темнов А.В., Белоусова Ж.В., Петруняк В.В. Обратимая организация митохондрий в ассоциаты как фактор регуляции дыхания.// Биохимия. 1997. Т. 62, №6. С. 154–163.
24. Kondrashova M.N., Fedotcheva N.I., Saakyan I.R., Sirota T.V., Lyamzaev K.G., Kulikova M.V., Temnov AV. Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate.// Mitochondrion. 2001. Vol. 1. P. 249–267.

25. Захарченко М.В., Темнов А.В., Кондрашова М.Н. Влияние карнозина на самоорганизацию ансамблей митохондрий в гомогенате печени крысы.// Биохимия. 2003. Т.68. С. 1226–1230.
26. Темнов А.В., Сирота Т.В., Ставровская И.Г., Фойгель А.Г., Кондрашова М.Н. Влияние супероксида воздуха на структурную организацию и фосфорилирующее дыхание митохондрий.// Биохимия. 1997. Т.62. С. 1272 – 1279.
27. Нарциссов Р.П. Митохондриальные болезни. Взгляд цитохимика. М., Медицина, 1999.
28. Диагностические и прогностические возможности клинической цитохимии. Петричук С.В. и др. М. 2005.
29. Пат. № 2007143021/15(047111). Россия. Приоритет от 20 ноября 2007.
Цитобиохимический способ определения активности сукцинатдегидрогеназы, окисления эндогенной янтарной кислоты, сигнального действия микромолярных концентраций янтарной кислоты, его применение для количественной оценки уровня адренергической регуляции в организме, среда и набор для осуществления способа. / ИТЭБ РАН, Кондрашова М.Н., ОАО ДИОД, Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Маевский Е.И.
30. Kondrashova M.N., Zakharchenko M.V., Khunderyakova N.V. Preservation of the in vivo state of mitochondrial network for ex vivo physiological study of mitochondria.//Int J Biochem Cell Biol (2009), doi:10.1016/j.biocel.2009.04.020.
31. Хундерякова Н.В., Захарченко М.В., Маевский Е.И., Кондрашова М.Н. Методика определения цитобиохимических показателей (паттернов) активности сукцинатдегидрогеназы на примере обследования пациентов с пищевой аллергией и сопутствующей гипертонией.//Вестник Новых медицинских Технологий. 2009 (в печати).

Приложение.

Рис. 2а.

Четыре типа характерных паттернов СДГ, выявленных у здоровых людей и представленных тремя примерами каждый с описанием отличительных признаков данного типа. Других типов паттернов не обнаружено в обследуемой группе.

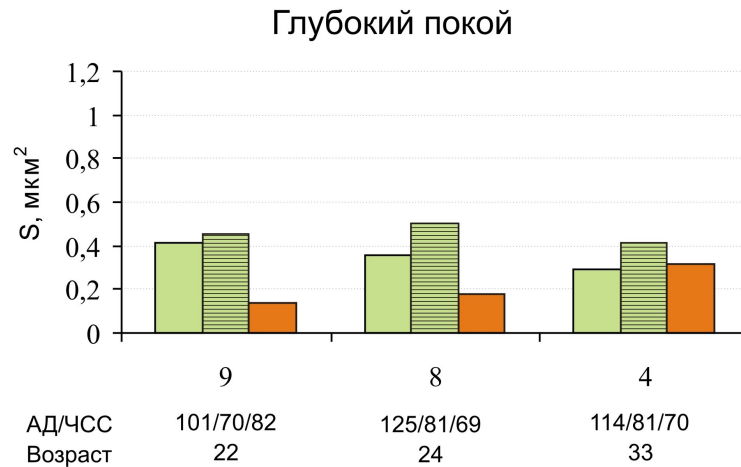


Рис. 2а. 1. Глубокий покой. Обозначения: зеленый - ЭС, горизонтальная штриховка - ЭС+ 5мМ МАЛ, оранжевый -5мМ ЯНТ.

Состояние покоя, из которого трудно перейти к активности. Восстановление на ЭС - низкое, МАЛ активизирует на 10 - 20%, активность СДГ при 5 мМ ЯНТ - низкая, сильно ниже ЭС, и ЭС+МАЛ, состояние СДГ - латентное, "спящее", выключенное.



Рис. 2а.2. Оперативный покой. Обозначения как на **рис 2а 1.**

Состояние покоя, из которого легко перейти к активности. Восстановление на ЭС - низкое, МАЛ уменьшает на 20-25%, активность СДГ при 5мМ ЯНТ низкая. Состояние СДГ также латентное, как при глубоком покое по результатам измерения в присутствии 5 мМ ЯНТ, однако, появление среди эндогенных субстратов эндогенной ЯНТ, чувствительной к МАЛ, свидетельствует о включении тонкой активации СДГ и образования ЯНТ адреналином.

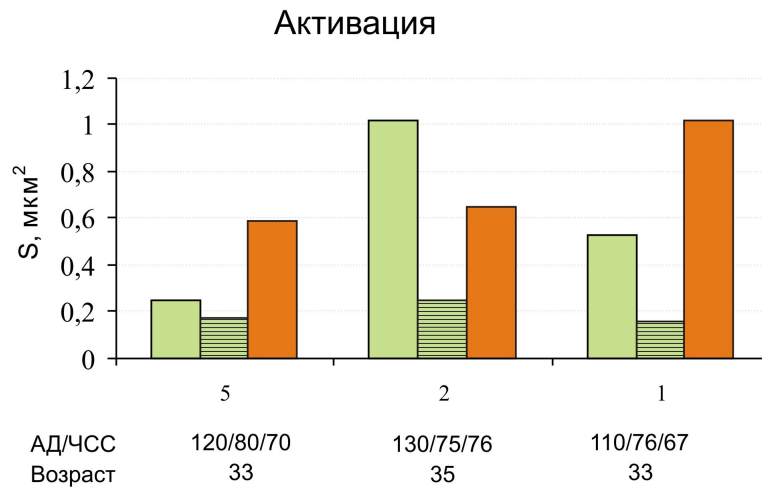


Рис.2а. 3. Возбужденная норма (активация). Обозначения как на *рис 2а 1*.

Активированное состояние еще до работы. Восстановление на ЭС повышено, МАЛ выраженно ингибирует ЭС (большой вклад ЯНТ в ЭС), высокая активность СДГ при 5мМ ЯНТ.

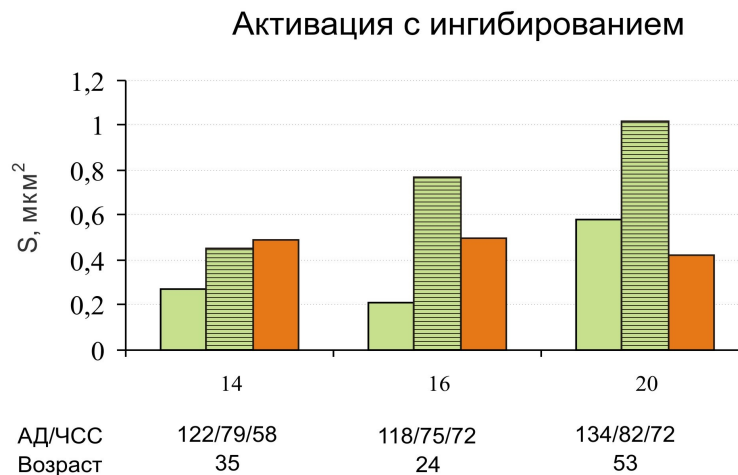


Рис. 2а.4. Активация с ингибированием (напряженный, сдерживаемый) покой, который может перейти в патологию. Обозначения как на *рис 2а 1*.

При таком относительном, не полном (полноценном) покое не выключается возбуждение, которое сдерживается внутренними механизмами, а при их недостаточности лекарствами (α -адреноблокатором в примере 20). Восстановление на ЭС низкое, в примере 20 повышенное по сравнению с покоем, МАЛ повышает восстановление на ЭС в 2 - 4 раза, активность СДГ при 5мМ ЯНТ – средняя и высокая для примера 20.