

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1985

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1985

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXI

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



МОСКВА. МЕДИЦИНА. 1985



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИ-
МОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,
Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС,
С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТАРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
ШАПОТ В. С. (Москва)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

1983

16. Conney A. H. — Pharmacol. Rev., 1967, vol. 19, p. 317—366.
17. Creaven P. J., Davies W. H., Williams R. T. — J. Pharm. Pharmacol., 1966, vol. 18, p. 485—489.
18. Gilbert D., Golberg L. — Food Cosmet. Toxicol., 1965, vol. 3, p. 417—432.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
20. Omura T., Sato R. — Ibid., 1964, vol. 239, p. 2370—2377.
21. Parkinson A., Cocherline R., Safe S. — Chem. — Biol. Interact., 1980, vol. 29, p. 277—289.
22. Poland A., Glover E. — Molec. Pharmacol., 1977, vol. 13, p. 924—938.
23. Remmer H. — Europ. J. clin. Pharmacol., 1972, vol. 5, p. 116—136.
24. Richter C., Azzi A., Wegar U., Wandel A. — J. biol. Chem., 1977, vol. 252, p. 5061—5066.
25. Saito M., Ikegami S., Ito Y., Innam S. — J. Nutr. Sci. Vitaminol., 1982, vol. 28, p. 455—466.
26. Yoshimura H., Ozawa N., Saeki S. — Chem. pharm. Bull., 1978, vol. 26, p. 1215—1221.

Поступила 28.04.84

THE FUNCTIONAL STATE OF MONOOXYGENASE SYSTEM IN RAT LIVER TISSUE AFTER EFFECT OF IONOL AND POLYCHLORINATED DIPHENYLS

N. V. Lashneva, A. V. Khan, V. A. Tutelyan

Laboratory of Enzymology, Institute of Nutrition, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

After a single administration of polychlorinated diphenyls (sovol) at a dose of 50 mg/kg content of hemoproteins was increased simultaneously with an increase in the rate of N- and O-demethylation in rat liver microsomes. Repeated administrations of a synthetic antioxidant 2,6-ditert-butyl-4-methylphenol (ionol) at a dose of 500 mg/kg stimulated also the liver tissue monooxygenase system; in this case, an increase in content of cytochromes P-450 and b_5 was accompanied by a distinct acceleration in oxidation of the first and second types of substrates in microsomes. A combined effect of sovol and ionol maintained the rate of microsomal enzymes induction, which exceeded markedly the values caused by individual effects of the compounds.

УДК 616-018.1:576.311.347]-02:613.863]-092.9

А. М. Бабский, М. Н. Кондрашова

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ СТРЕССЕ НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ

Львовский университет им. Ивана Франко, Институт биологической физики АН СССР, г. Пуцино

Изменения энергетического обмена являются важной составляющей общего адаптационного синдрома или стресса [5, 9]. Они включают и перестройки процессов в митохондриях (МХ). Исследование этих изменений можно проводить путем изучения как реакций МХ, выделенных из тканей животных при стрессе [5, 6] или при введении гормонов [10, 11], так и воздействия сыворотки крови животных с измененным состоянием организма на МХ, полученные от интактных животных [3, 7]. В частности, показано, что дыхание МХ мозга кошки под действием сыворотки крови больных психозами изменяется в зависимости от тяжести состояния больного [2, 3]. При увеличении глубины заболевания наблюдается прогрессирующее ослабление энергетического контроля дыхания МХ, выражающееся в ингибировании фосфорилирующего дыхания (активное состояние, состояние 3) и подъеме дыхания покоя (контролируемое состояние, состояние 4) [2]. Пред-

ставлялось вероятным, что изменение энергетических процессов в выделенных МХ под действием сыворотки крови может явиться чувствительным показателем состояния энергетического обмена при различных воздействиях на организм. Это предположение проверено в настоящей работе на примере адаптационного синдрома (иммобилизационный стресс). При этом использовали комплекс условий, повышающих чувствительность выявления изменений в организме с использованием выделенных МХ [5].

Обнаружена дополнительная к рассмотренным выше показателям начальная стадия активации фосфорилирующего дыхания МХ, более сильно выраженная при стрессе, чем в норме. Указанные изменения отчетливо проявляются на МХ мозга и печени крыс, что позволяет шире применять описываемый метод для оценки степени изменений митохондриальных процессов в организме животных и человека.

МХ печени и мозга выделяли по общепринятым методам с модификациями [5], обеспечивающими лучшее выявление *in vitro* изменений МХ *in vivo*. В экспериментах использовали 70 крыс-самцов линии Вистар массой 200—220 г. При работе с контрольными животными обращали особое внимание на обеспечение спокойного состояния животных. С этой целью не менее чем за 2 ч до опыта крыс переносили из привычной обстановки вивария и выдерживали в ящике с пищей для привыкания к новой обстановке.

В качестве основы метода получения МХ из головного мозга использовали работу К. Ozawa и соавт. [14]. Животных декапитировали. Для получения более концентрированной суспензии МХ использовали мозг 2 животных. После извлечения его хранили в течение 10 мин в среде гомогенизации, охлажденной до появления плавающих шелковистых кристаллов. Мозг гомогенизировали без предварительного измельчения в гомогенизаторе Поттера — Эльвегейма при скорости 180 об/мин и 3—4 вертикальных ходах пестика. Среда гомогенизации содержала 0,30 М маннит и 0,01 М трис-HCl pH 7,4. Из 10% гомогената центрифугированием поэтапно осаждали фракцию ядер: 3 мин при 600 г и 4 мин при 1300 г без остановки центрифуги. Митохондриальную фракцию получали центрифугированием надосадочной жидкости в течение 20 мин при 20 000 г. Полученный осадок не промывали. МХ разводили средой гомогенизации до концентрации 40—50 мг белка в 1 мл.

Для получения сыворотки цельную кровь брали непосредственно в стеклянную центрифужную сухую темную пробирку. От 1 животного получали около 5 мл крови. Пробирку выдерживали в холодильнике при 2°C в течение 30 мин. Стеклой палочкой проводили по внутренней стороне пробирки у верхнего края свернувшейся крови и центрифугировали 20 мин при 600 г и температуре 2°C. Отслоившуюся от сгустка сыворотку отсасывали на холоду пастеровской пипеткой, не допуская гемолиза. Сыворотку использовали в день выделения, сохраняя ее на льду при ограничении попадания прямого света. Приблизительный выход сыворотки из 5 мл крови 0,5—1 мл.

Влияние сыворотки крови на энергетический обмен оценивали путем полярографической регистрации дыхания МХ мозга в среде инкубации следующего состава: маннит — 0,17 М, KCl — 0,04 М, K_2HPO_4 — 0,01 М, ЭДТА — $2 \cdot 10^{-4}$ М, трис-HCl — 0,02 М (pH 7,4). В среду инкубации вносили 2,5—3,5 мг митохондриального белка на 1 мл суспензии. Дополнительные добавки: сукцинат — 6 мМ, глутамат — 6 мМ, АДФ — 170 мкМ. Температура инкубации 20 и 26°C. Поглощение кислорода регистрировали с использованием платинового электрода на полярографе LP-7. Исследовали влияние сыворотки крови на скорость дыхания МХ в активном состоянии (V_3) и в состоянии покоя (V_4). Абсолютные скорости дыхания выражали в нанogramмах кислорода в 1 мин на 1 мг белка МХ. Белок определяли по Лоури [13].

Иммобилизационный стресс (ИС) вызывали фиксацией животных в положении на животе

в течение 24 ч [12]. Развитие стресса контролировали по снижению массы тимуса, увеличению массы надпочечников и изъязвлениям желудка [9].

Результаты и их обсуждение

В полярографических исследованиях дыхания следует уделять внимание зависимости удельных скоростей дыхания от концентрации МХ при хранении, а также инкубации в полярографической ячейке [8]. На рис. 1 приведен пример повышения скорости окисления сукцината при замедлении фосфорилирования в разведенном препарате МХ печени. Такой фон, по нашим предыдущим данным, препятствует выявлению стимулирующих воздействий, которые ожидали в эксперименте с сывороткой крови при стрессе. Можно рекомендовать оптимальные для выявления физиологических изменений концентрации МХ, которые составляют (в миллиграммах митохондриального белка на 1 мл суспензии) для печени 70—90 и для мозга 40—50, а в полярографической ячейке (в мг митохондриального белка на 1 мл пробы) для печени 4—5, для мозга 2,5—3,5.

Вторым фактором, который мы учитывали, было влияние глутамата на регуляцию окисления сукцината. В большинстве случаев исследователи [13], работая с МХ мозга, в качестве субстратов используют смесь сукцината с глутаматом. При этом скорости дыхания возрастают, так как уменьшается торможение сукцинатдегидрогеназы щавелевоуксусной кислотой (ЩТ). ЩТ сильно выражено у МХ мозга и играет существенную роль в регуляции внутриклеточного метаболизма. Другим фактором снятия ЩТ может быть повышение температуры. На рис. 2 представлена зависимость скорости окисления сукцината и действия сыворотки крови от добавки глутамата и температуры инкубации. Видно, что скорость дыхания увеличивается при использовании глутамата (см. рис. 2, б, г) и повышении температуры (см. рис. 2, в, г), но стимулирующее действие сыворотки крови при ИС уменьшается (см. рис. 2, г) или даже обращается (см. рис. 2, б) на исходно более активных препаратах МХ. Наиболее глубокое ЩТ наблюдается при низкой температуре (20°C) и отсутствии глутамата (см. рис. 2, а). Основным фактором ускорения дыхания при низкой температуре является добав-

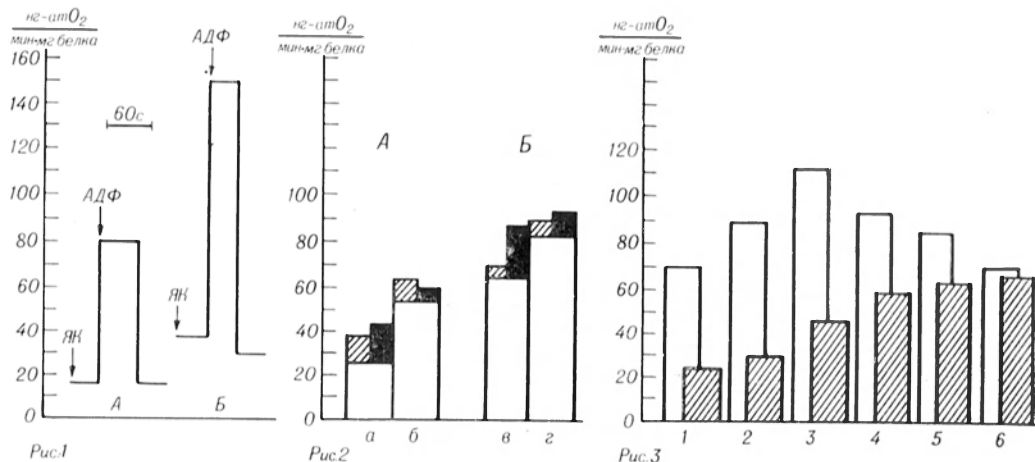


Рис. 1. Зависимость скорости дыхания от концентрации суспензии МХ.

Концентрация МХ в суспензии и полярографической ячейке соответственно: А — 73,0 и 4,5 мг белка в 1 мл; Б — 17,5 и 1,1 мг белка в 1 мл. Температура инкубации 23 °С.

Рис. 2. Зависимость скорости фосфорилирующего дыхания МХ мозга крысы и действия сыворотки крови от температуры инкубации проб, содержащих субстраты окисления.

Температура инкубации: А — 20 °С; Б — 26 °С. Субстраты окисления: а, в — сукцинат 6 мМ; б, г — сукцинат + глутамат по 6 мМ. Концентрация МХ 3 мг белка в 1 мл. Светлые столбики — интактные МХ; заштрихованные — + сыворотка спокойных крыс, темные — + сыворотка крыс после ИС. Концентрация сыворотки 0,02 л/л.

Рис. 3. Влияние различных концентраций сыворотки крови крыс после ИС на скорости дыхания МХ мозга крыс в третьем (светлые столбики) и четвертом (заштрихованные столбики) метаболическом состоянии.

Концентрация сыворотки: 1 — 0; 2 — 0,01 л/л; 3 — 0,02 л/л; 4 — 0,03 л/л; 5 — 0,04 л/л; 6 — 0,05 л/л. Сыворотку добавляли в пробу до МХ. Субстрат окисления: сукцинат + глутамат по 6 мМ. Концентрация МХ 2,4 мг белка в 1 мл. Температура инкубации 26 °С.

ка глутамата, стимулирующая дыхание более чем в 2 раза (см. рис. 2, б). Однако ЦТТ при 20 °С снимается не полностью. Повышение температуры до 26 °С дополнительно значительно активирует дыхание МХ за счет более полного снятия ЦТТ, так как глутамат дополнительно активирует дыхание всего на 28% (см. рис. 2, г). Таким образом, при температуре 26 °С ЦТТ более лабильно и легче может быть снято соответствующими добавками. Оптимальным условием для обнаружения действия сыворотки крови при стрессе является температура 26 °С при отсутствии глутамата.

Данные о влиянии сыворотки крови на скорости дыхания интактных МХ мозга в оптимальных условиях представлены в таблице, из которой следует, что сыворотка крови животных в покое и при ИС увеличивает V_3 и V_4 , а сыворотка крови «стрессовых» животных усиливает этот эффект. Высокая достоверность данного вывода подтверждается статистической обработкой с использованием критерия Вилкоксона [12]: $p < 0,01$. Сходную, но менее выраженную зависимость наблюдали и на МХ печени. Так, разница между действием

сыворотки крови (при увеличенной концентрации) крыс в покое и при ИС по V_3 была около 8%, а по V_4 еще меньше.

Максимальное активирующее действие сыворотки крови наблюдали при ее концентрации в полярографической ячейке 0,02 л/л (рис. 3). При увеличении концентрации от 0,02 до 0,05 л/л снижалась при одновременном повышении V_4 . При концентрации выше 0,05 л/л наступало полное разобщение окислительного фосфорилирования, и тогда V_3 и V_4 равны. В этом случае различия

Изменение скоростей дыхания МХ мозга интактных крыс под влиянием сыворотки крови крыс в покое и при ИС

	V_3	%	V_4	%
Интактные МХ	30,55±4,60	100	63,55±3,75	100
+сыворотка К	37,32±3,66	122	68,62±2,90	108
+сыворотка ИС	41,30±4,32	135	78,20±2,64	123

Примечание. К — животные в покое; ИС — подвергнутые стрессу; концентрация сыворотки в ячейке 0,02 л/л.

между влиянием сыворотки крови в покое и при ИС не наблюдали. При понижении концентрации ниже 0,02 л/л влияние сыворотки крови уменьшалось. Такие взаимозависимости между скоростями дыхания МХ характерны для действия сыворотки крови крыс и в покое, и при ИС. Наличие подобной зависимости между скоростями дыхания в контролируемом и активном состоянии МХ позволяет предположить существование стимулирующего и ингибирующего начала в сыворотке крови при действии на дыхание МХ.

Известно, что морфологические и функциональные изменения, наблюдаемые при стрессе, связаны с активацией симпатoadренальной системы (ось гипоталамус — гипофиз — надпочечники) и системы мобилизационных реакций организма. Такое напряжение адаптационных механизмов приводит к гиперактивному состоянию МХ, которое наряду с ускорением энергопродукции характеризуется гиперактивацией транспорта кальция, приводящей к повреждению мембран [4], что существенно нарушает нормальное функционирование МХ и клеток. Как показали проведенные исследования, гиперактивное состояние МХ в организме при ИС можно выявить по действию сыворотки крови подопытного животного на МХ интактного животного, что дает возможность следить за изменениями при различных физиологических и патологических состояниях животных и человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л., 1978, с. 71—72.
2. Гулидова Г. П. Механизмы нарушения и пути регуляции энергетического обмена в нервной ткани при психических заболеваниях. Автореф. дис. докт. М., 1980.
3. Гулидова Г. П., Полянская Н. П. — Журн. невропатол. и психиатр., 1973, № 1, с. 110.
4. Кондрашова М. И. — В кн.: Митохондрии. Биохимические функции в системе клеточных органелл. М., 1969, с. 23—29.

5. Кондрашова М. И., Григоренко Е. В. Защита от стресса на уровне митохондрий. Развитие щавелевоуксусного ограничения дыхания митохондрий при продолжительном стрессе и введении серотонина. Пушкино, 1981.
6. Кондрашова М. И., Григоренко Е. В., Гущар И. Б. и др. — Биофизика, 1981, № 4, с. 687—692.
7. Панин Л. Е., Кузьменко Д. И., Третьякова Т. А. — В кн.: Механизмы адаптации гомеостатических систем при действии на организм субэкстремальных и экстремальных факторов (энергетический гомеостаз). Новосибирск, 1980, с. 38—51.
8. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., 1973.
9. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М., 1960.
10. Танберген С. О. — Вопр. мед. химии, 1982, № 2, с. 52—58.
11. Dorman D. M., Barril G. H., Bygrave F. L. — Biochem. J., 1975, vol. 150, p. 389—395.
12. Koeltzsky R., Weize V. K., Kopin I. J. — Endocrinology, 1970, vol. 87, p. 744—749.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. et al. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
14. Ozawa K. et al. — J. Biochem. (Tokyo), 1966, vol. 59, p. 501—510.

Поступила 23.11.83

EFFECT OF ANIMAL BLOOD SERUM ON MITOCHONDRIAL RESPIRATION IN STRESS

A. M. Babsky, M. N. Kondrashova

1. Franko State University, Lvov, Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushino

Effect of small amounts of rat blood serum on respiration of the animal brain mitochondria was studied. The following conditions were shown to be critical: the rats had to be kept undisturbed to avoid the effects of stress, high concentrations of mitochondrial suspension had to be used, incubation of the suspension at 26° and use of succinate as a substrate of oxidation were also essential. Low concentrations of blood serum obtained from rats, maintained in tranquil state and, especially, under conditions of immobilization stress, increased the respiration rate in active state (V_3) as well as in inactive state (V_4). An increase in concentration of blood serum caused an inhibition of the V_3 and activation of the V_4 states as well as complete uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria.