

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

13. La Noue K. F., Wals J. A., Koch C. D. — Amer. J. Physiol., 1981, vol. 241, p. H663—671.
14. Lochner A., Van Niekierk I., Kolze J. C. N. — J. molec. cell. Cardiol., 1981, vol. 13, p. 991—997.
15. Pande S. V., Blanchaer M. C. — J. biol. Chem., 1971, vol. 246, p. 402—411.
16. Shug A. L., Shrago E., Billar N. et al. — Amer. J. Physiol., 1975, vol. 228, p. 689—692.
17. Von Korff R. W. — J. biol. Chem., 1965, vol. 240, p. 1351—1358.
18. Williamson J. R., Corkey B. E. — Meth. Enzymol., 1969, vol. 13, p. 434—513.

Поступила 26.03.84

EFFECT OF ISCHEMIA AND ROTENONE ON THE CONTENT OF LIPIDS, ADENINE NUCLEOTIDES AND FUNCTIONAL ACTIVITY IN HEART MITOCHONDRIA

A. J. Toleikis, V. J. Zilinskiene,
V. J. Borutaite, A. J. Dagys,
A. J. Trumpickas, A. K. Praskevicius

Institute of Cardiovascular Researchs, Medical School, Kaunas

Myocardial mitochondria (MCh), isolated with rotenone (MCh + RO) and in absence

of rotenone (MCh — RO), were studied in rabbits with ischemia (0.5 hr autolysis) and in controls. Content of acyl-CoA was increased by 50 %, linoleic acid — by 49 % and lysophosphatidyl choline — by 37 % in MCh + RO of control animals as compared with the MCh — RO preparation. In the MCh + RO preparation from rabbits with ischemia content of acyl-CoA was increased by 62 %, while concentration of free fatty acids (FFA) and phospholipids was similar to those of the MCh — RO preparation. After isolation of mitochondria with rotenone composition of adenine nucleotides was distinctly altered. Content of ATP was decreased by 27% in mitochondria of both ischemic and control animals, although total amount of adenine nucleotides was decreased only slightly. As shown by estimation of succinate oxidation and membrane potential rotenone did not affect the mitochondrial respiration. In mitochondria of ischemic rabbits concentrations of FFA and lysophosphatidyl choline were increased, whereas content of ATP, total amount of adenine nucleotides, the rate of succinate oxidation and membrane potential were decreased. The method developed, isolation of mitochondria with rotenone, may be used in studies of the role of acyl-CoA in energy metabolism of cells.

УДК 616.127-008.931:577.152.313]-074

Г. К. Парсаданян, Л. П. Тер-Татевосян, И. Г. Асланян, Г. Т. Адунц

ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗА СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ. ВЫДЕЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Наличие в сердечной мышце системы ферментов, обеспечивающих фосфорилирование — дефосфорилирование ферментных и неферментных белков объясняется как существованием универсальных механизмов регуляции обмена углеводов (и липидов), так и особыми функциями фосфопротеинфосфатаз (ФПФаз), связанных с сократительными белками. Фосфорилирование миокина, по-видимому, является главной регуляторной системой, контролирующей взаимодействие между актином и миокином в гладкой мускулатуре [8, 21]. В сердечной и скелетных мышцах, откуда были изолированы специфические киназы легких цепей миокина, фосфорилирование, по-видимому, играет модулирующую роль [4]. Так, недавно было показано, что фосфорилирование мышечного миокина может коррелировать с посттетаническим потенциалом пикового одиночного со-

кращения [19]. Менее изучены свойства и роль ФПФаз в регуляции метаболизма сердечной мышцы. Поливалентность функций этих фосфатаз предполагает наличие их отдельных специализированных форм. При очистке с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе ФПФазы из сердца собаки были получены 4 фракции, различающиеся по ряду свойств, и в том числе по чувствительности к различным метаболитам [17]. Наличие множественных форм ФПФаз в экстрактах из сердца собаки было подтверждено [11] выделением с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации 5 изоформ, различающихся по молекулярной массе, субстратной специфичности и чувствительности к двухвалентным катионам. Использование метода изоэлектрофокусирования позволило нам также изолировать 5 отдельных форм ФПФазы из сердца

крыс, охарактеризовав их изoeлектрические точки [3].

Противоположные данные были получены другими авторами [20], обнаружившими после многоэтапной очистки наличие в сердце быка лишь одной ФПФазы, характеризующейся широкой субстратной специфичностью. В сердце свиньи тоже показано наличие одной ФПФазы с молекулярной массой 224 000 Д [13]. В присутствии этанола она диссоциировала с образованием активного компонента с молекулярной массой 31 000 Д.

Вопрос о том, не объясняется ли широкая специфичность некоторых препаратов ФПФаз наличием в них нескольких индивидуальных ферментов, остается открытым.

Мы поставили перед собой задачу изолировать и охарактеризовать отдельные формы ФПФазы из сердечной мышцы.

Методика

В экспериментах были использованы самцы беспородных белых крыс массой тела 130—150 г. Сердечную мышцу сразу после декапитации животных помещали на лед и гомогенизировали на холоде в стеклянном гомогенизаторе Поттера с 0,05 М боратым буфером pH 6,2 в соотношении 1 : 5 (масса/объем). Для выделения препарата ФПФазы гомогенат ткани центрифугировали при 14 500 г в течение 20 мин. Надосадочную жидкость наносили на термостатированную (5—6 °C) колонку (20×3 см) с сефадексом А-50, уравновешенную с 0,05 М боратым буфером.

Элюирование белков с анионообменника осуществляли в ступенчатом градиенте ионной силы от 0,05 до 2 М. В диапазоне 0,05—0,2 М необходимую ионную силу растворов обеспечивали боратым буфером соответствующей концентрации, а более высокую ионную силу — добавлением KCl. Фракции белков собирали при скорости элюции 1,5 мл/мин, объем каждой фракции составлял 10 мл. В каждой фракции определяли активность ФПФазы (КФ 3.1.3.16), пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) и триметафосфатазы (КФ 3.6.1.2). Активность ФПФазы во фракциях определяли, как описано в литературе [9]. Инкубационные пробы содержали 1 мл 1% раствора казеина на боратном буфере pH 6,2 и 0,5 мл соответствующей фракции, содержащей фермент. Инкубацию проводили в течение 1 ч при 37 °C. ФПФазную реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 30% ТХУ на холоде. Пирофосфатазу определяли, как описано ранее [10]. В качестве субстрата использовали пирофосфат натрия. Триметафосфатазную активность во фракциях определяли согласно [5]. Инкубационные пробы в обоих случаях содержали 1 мл фракции и 1,25 мл субстрата (конечная концентрация в пробах 6,6 мМ), приготовленного на 0,1 М медианальном буфере pH 5,0. Реакцию останавливали после 1 ч инкубации при 37 °C добавлением 4 мл

40 % ТХУ на холоде. Во всех случаях количество неорганического фосфата определяли как описано ранее [22].

О наличии белкового ингибитора во фракциях, не содержащих ФПФазной активности, судили по подавлению исходной активности ФПФ в тканевом экстракте. В этом случае пробу фермента (0,5 мл) преинкубировали с фракцией ингибитора (0,5 мл) в течение 5 мин при 37 °C.

Результаты и обсуждение

Профиль элюции цитоплазматической ФПФазы сердца белых крыс из колонки с ионообменной смолой (сефадекс А-50) свидетельствует о наличии множественных форм этого фермента (рис. 1). Основные пики ФПФазной активности удавалось элюировать при ионной силе буфера 0,8 М (I), 1 М (II) и 2 М (III). В расчете на 1 мл элюата активность во всех трех пиках была примерно одного порядка: от 102 Е (I пик) до 83 Е (III пик). При расчете на A_{280} наивысшая удельная активность была обнаружена в пике II (404 Е/ A_{280}); удельная активность белков пика I была почти в 3 раза меньшей.

По литературным данным, активность щелочной фосфатазы при очистке сопровождается фосфатазой фосфорилазы сердца кролика [18]. Из скелетных мышц выделены 2 формы ФПФазы, одна из которых обладала высокой активностью щелочной фосфатазы [16]. Учитывая большое родство пирофосфата и неорганических полифосфатов к фосфопро-теинам (ФП), представляло интерес выяснить, не обладают ли некоторые фракции ФПФазы, элюируемые с колонки ионообменника, свойством расщеплять также и неорганические пиро- и полифосфаты. Как выяснилось, основная часть пирофосфатазной активности элюируется с колонки при концентрации KCl 0,4 М (см. рис. 1), причем профиль элюции этого фермента не совпадает с таковым ФПФазы. Ионообменная хроматография на колонке с сефадексом А-50 позволила изолировать ряд фракций триметафосфатазы, элюирующихся при ионной силе 0,05, 0,2, 0,4, 0,8 и 2 М (рис. 2). Триметафосфатазная активность, элюируемая при концентрации KCl 0,8 М, сопровождала ФПФазную активность. По-видимому, в этом случае мы имеем дело с малоспецифичной фосфатазой, способной дефосфорилировать как ФП, так и другие фосфомоноэфиры. Эти данные согласуются с

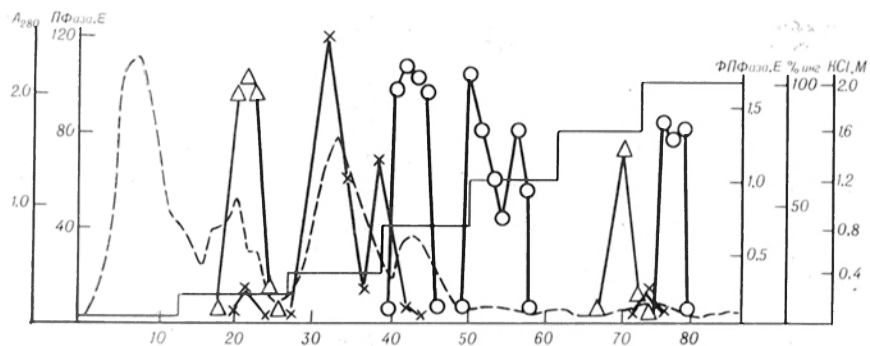


Рис. 1. Профиль элюции ФПФазы, ПФазы и белкового ингибитора ФПФазы при хроматографии на колонке с сефадексом А-50.

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — номера фракций, по оси ординат — активность ФПФазы (кружочки) и ПФазы (крестик) (в Е — ммоль Р на 1 мл фракции в 1 мин) и белковых ингибиторов (треугольник; в % ингибирования ФПФазы). Пунктирная линия — оптическая плотность, сплошная — концентрация KCl, М.

полученными нами ранее результатами, в которых ФПФаза почек, расщепляющая широкий спектр фосфатов, в том числе и низкомолекулярные субстраты, элюировалась при наименьшей ионной силе буфера [2]. Наличие у отдельных молекулярных форм ФПФазы способности дефосфорилировать также и триметафосфат, обычно не встречающийся в тканях высших животных [1], свидетельствует о резервных возможностях ФПФазы по обезвреживанию этого соединения.

Контролируемое нагревание (52 °С, 10 мин) по-разному влияло на активность отдельных форм ФПФазы (см. таблицу). Активность ФПФазы I повышалась на 38%, тогда как ФПФаза

II полностью, а ФПФаза III — на 48% ингибировались при указанных условиях.

Среди соединений, участвующих в постсинтетической регуляции ФПФазы, значительную роль играют белковые ингибиторы этого фермента. Ранее нам удалось выделить из экстракта сердца 2 индивидуальных белка, тормозящих дефосфорилирование казеина, и охарактеризовать их изоэлектрические точки ($pI=5,7$ и $6,6$ соответственно) [3]. Использование гель-хроматографии на сефадексе А-50 позволило также выявить 2 белковых ингибитора ФПФазы сердца крыс. Один из них элюировался при слабой ионной силе (0,2 М), тогда как второй — при концентрации KCl 1,6 М.

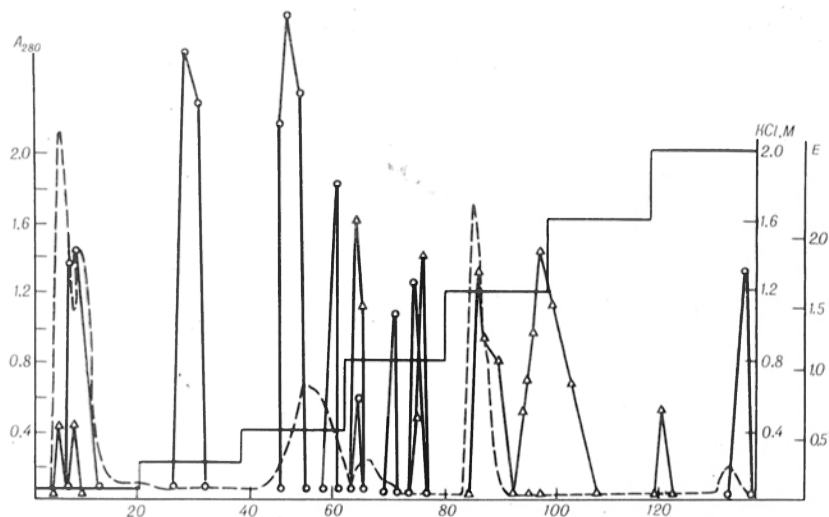


Рис. 2. Профиль элюции триметафосфатазы при хроматографии на колонке с сефадексом А-50.

Треугольнички — активность триметафосфатазы, кружочки — то же ФПФазы (в Е — ммоль Р на 1 мл фракции в 1 мин).

Действие термообработки на отдельные молекулярные формы ФПФазы и ее белковые ингибиторы

Условия опыта	Активность ФПФазы, нмоль/(мин·мл)			Эффективность ингибиторов (подавление ФПФазы), %	
	I	II	III	I	II
Контроль	1,66	1,60	1,40	22	36
Термообработка	2,29	0	0,73	0	36

Термообработка этих ингибиторов при 95 °С (5 мин) по-разному отражалась на их эффективности. Ингибитор I инактивировался при термообработке, тогда как ингибитор 2 полностью сохранял свою активность (см. таблицу). Возможно, что каталитически активные формы ФПФазы взаимодействуют с этими регуляторными белками, образуя высокомолекулярные ФПФазные комплексы. Образование таких комплексов может избирательно влиять на субстратную специфичность ФПФазы. Так, взаимодействие термостабильного белкового ингибитора с очищенным препаратом ФПФазы из печени приводило к более сильному ингибированию дефосфорилирования фосфорилазы а по сравнению с гистонами [14].

Имеются данные о том, что при некоторых патологических состояниях нарушается обмен ФП в сердце. Так, ФПФазная реакция в митохондриях сердца крысы снижается при аллоксановом диабете [12]. Повышение уровня пальмитилкарнитина в ишемическом сердце приводило к ингибированию реакций фосфорилирования белков сердечной мышцы [15]. В ходе индуцированной триiodотиронинном гипертрофии сердца повышается активность цАМР-зависимой протеинкиназы [7]. Отмечена повышенная активность цитоплазматической ФПФазы в аорте спонтанно гипертензивных крыс [16].

Все указанное свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения свойств отдельных молекулярных форм ферментов, участвующих в обмене ФП и их белковых регуляторов, что является важным для изучения клиники и диагностики ряда сердечно-сосудистых заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

- Кулаев Н. С. — Биохимия высокомолекулярных полифосфатов. М., 1975.

- Парсаданян Г. К., Домбради В., Гергей П., Бот Г. — Биохимия, 1983, т. 48, № 4, с. 606—610.
- Парсаданян Г. К., Тер-Татевосян Л. П., Шерстнев К. Б. — Биохимия, 1981, т. 46, № 7, с. 1236—1240.
- Adebslein R. S., Paio M. D., Rappoport L. et al. — In: Protein Phosphorylation and Bio — Regulation. Basel, 1980, p. 17—38.
- Berg G. — J. Cell. comp. Physiol., 1955, vol. 45, p. 435—443.
- Bhalla R. C., Shorma R. V., Ramanathan S. — Hypertension, 1980, vol. 2, p. 207.
- Bogdanovsky-Segueval D., Raymonjean M., Buchner L. et al. — Life Sci., 1980, vol. 27, p. 387—394.
- Chacko S., Conti M. A., Adelstein R. S. — Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1977, vol. 74, p. 129—133.
- Feinstein R. V., Folk M. — J. biol. Chem., 1949, vol. 177, p. 339—345.
- Heppel L. A., Meth. Enzymol., 1955, vol. 2, p. 570—573.
- Hsiao K. — Diss. Abstr., Int. B. 1979, vol. 39, p. 3297—3299.
- Hutson N. Y., Kerby A. L., Rondle P. J., Sugden P. H. — Biochem. J., 1978, vol. 173, p. 669—678.
- Imazu M., Imaoka T., Usual H. et al. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1978, vol. 84, p. 777—788.
- Khandelwal R. L., Zinman S. M. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1978, vol. 82, p. 1340—1348.
- Kuo J. F. — Fed. Proc., 1981, vol. 40, p. 1722—1729.
- Lee E. Y. C., Silberman S. R., Canapathi M. K. et al. — Advanc. Cyclic Nucl. Res., 1980, vol. 13, p. 95—107.
- Li H.-Ch. — FEBS Letters, 1975, vol. 55, p. 134—138.
- Li H.-C., Hsiao K.-I., Sampathkumar S. — J. biol. Chem., 1979, vol. 259, p. 3368—3380.
- Manning D. R., Stull J. T. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1979, vol. 90, p. 169—176.
- Nakai C., Thomas J. A. — J. biol. Chem., 1974, vol. 249, p. 6459—6470.
- Sobieszek A., Small J. V. — J. molec. Biol., 1977, vol. 112, p. 559—568.
- Taussky H. H., Shorr E. — J. biol. Chem., 1953, vol. 202, p. 675—680.

Получила 28.03.84

HEART MUSCLE PHOSPHOPROTEIN-PHOSPHATASE. ISOLATION OF INDIVIDUAL MOLECULAR FORMS AND THEIR PROPERTIES

H. K. Parsadanyan, L. P. Ter-Tatevosyan,
I. G. Aslanian, G. T. Adunz

State University, Yerevan

Individual molecular forms of phosphoprotein phosphatase (PPase) and their inhibitors of the protein nature were isolated from rat heart muscle by means of column chromatography on DEAE Sephadex A-50. All the three fractions of PPase were capable to dephosphorylate casein but did not affect pyrop-

hosphate. PPase I dephosphorylated trimethaphosphate or casein. The enzyme molecular forms were different from each other by the value of specific activity and sensitivity to heat treatment. Two protein inhibitors eluted

by buffers of different ionic strength — 0.2 M and 1.6 M — were identified. One of them was inactivated during heat treatment (95°, 5 min), while the second inhibitor maintained completely its activity in these conditions.

УДК 612.351.11:577.152.11.014.46:615.214.24:547.854.5

Л. Ф. Гуляева, В. М. Мишин

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНДУКЦИИ ФЕНОБАРБИТАЛОМ В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Отдел физиологии и патологии клетки Института клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

Особенности функционирования микросомной системы метаболизма ксенобиотиков печени в онтогенезе представляют большой интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения. Ряд работ в этом направлении показал количественные и качественные различия между новорожденными и взрослыми особями [11, 15, 18]. В исследованиях, посвященных индукции монооксигеназной системы печени фетальных и неонатальных крыс, показано, что у эмбрионов нет чувствительности к индукции фенобарбиталом, в то время как 3-метилхолантрен индуцирует бенз(а)пирен гидроксилазную активность [3]. Однако в печени фетальных и неонатальных животных фенобарбитал индуцирует цитохром Р-450, иммунологически идентичный цитохрому взрослых крыс [2]. Показано, что 3-метилхолантрен (типичный индуктор цитохрома Р-448) у фетальных животных индуцирует цитохром Р-450, характерный для индукции фенобарбиталом, хотя в печени матери регистрируется цитохром Р-448 [9].

В настоящее время считается доказанным, что специфичность и активность метаболизма ксенобиотиков микросомной печени определяются набором множества форм цитохрома Р-450 [4]. Однако исследованию этого аспекта микросомной монооксигеназы у новорожденных животных посвящены лишь единичные и противоречивые сообщения. По-видимому, отмеченные выше различия могут быть обусловлены индукцией (или отсутствием индукции) множества форм цитохрома Р-450, отличающихся по количеству или каталитической активности от свойственных печени взрослых животных.

Применение иммунохимических методов с использованием антител к опреде-

ленным формам цитохрома Р-450 позволяет определить не только качественный уровень индукции, но и выяснить вклад определенной формы цитохрома Р-450 в метаболизм того или иного субстрата [17].

Нами исследована индукция ферментов монооксигеназной системы с точки зрения функционирования множественных форм цитохрома Р-450 в раннем неонатальном периоде и предпринята попытка определить их участие в метаболизме некоторых ксенобиотиков.

Методика

Объектом исследования служили новорожденные крысы линии Вистар (6—7, 17—18 дней). Индукцию микросомальных ферментов вызывали внутрибрюшинным введением фенобарбитала (80 мг на 1 кг массы), в течение 4 дней. Микросомы выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Содержание цитохромов b_5 и Р-450 определяли, как описано ранее [10], содержание НАДФН-цитохром с редуктазы — по восстановлению цитохрома с [12]. Цитохром Р-450 и Р-448 из ткани взрослых животных выделяли, как описано в литературе [5], используя в качестве ионообменника ДЭАЭ-сефацель. Антитела к полученным цитохромам получали иммунизацией беспородных кроликов [6]. Сыворотку крови животных получали через 10 дней после разрешающего внутривенного введения антигена. Фракцию IgG выделяли из сыворотки крови фракционированием сульфата аммония. Скорость гидроксилирования бенз(а)пирена определяли флуоресцентным методом [11], скорость N-деметилирования бензфетаминна — методом Наш [16]. В качестве ингибитора реакции N-деметилирования бензфетаминна использовали антитела к цитохрому Р-450 (анти-Р-450) и цитохрому Р-448 (анти-Р-448). N-деметилирующую активность микросом в присутствии антител определяли после пренкубации в течение 10 мин. Эффект ингибирования антител рассчитывали, принимая за 100% максимальную скорость процесса в отсутствие антител. Белок определяли методом Лоури и соавт. [7], используя в качестве стандарта