

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1986

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

1986

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 XXXII

ВЫПУСК 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА,
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОК-
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РО-
ЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕ-
ВЕРИН, 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)
ТУРАКУЛОВ 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

А. П. Агуреев, И. В. Жигачева

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ ПИРАЦЕТАМА НА ОКИСЛЕНИЕ NADH ПО ВНЕШНЕМУ ПУТИ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС

ИИИ по биологическим испытаниям химических соединений, Купавна Московской области

Известно, что ферменты интактных митохондрий, выделенных из различных тканей животных, катализируют окисление экзогенного NADH с довольно низкой скоростью [9]. Вместе с тем при определенных воздействиях на организм (стресс, адаптация к холоду) или на митохондрии *in vitro* (снижение pH среды инкубации, увеличение концентрации неорганического фосфата, свободных жирных кислот, ионов Ca^{2+} в среде инкубации) эта скорость может резко возрасти [1]. Окисление NADH в указанных случаях идет в обход первых пунктов сопряжения дыхательной цепи — по внешнему пути окисления. Согласно предположению В. П. Скулачева [6], активация внешнего пути окисления NADH обусловлена десорбцией в межмембранное пространство митохондриальной части цитохрома *c*, который выполняет роль переносчика электронов между цитохромом b_5 внешней мембраны и цитохромоксидазой.

В настоящее время показано, что увеличение скорости окисления экзогенного NADH по амитал-антимитин А-резистентному пути сопровождается набуханием митохондрий. Ингибиторы фосфолипазы A_2 (нуперканн, диканн), комплексообразующие агенты (ЭГТА, ЭДТА), ингибиторы перекисного окисления липидов (попол и др.) предотвращают активацию данного шунта [3]. В связи с этим интересно было выявить взаимосвязь перекисного окисления липидов и вязкости митохондриальных мембран с десорбцией цитохрома *c* и активацией окисления NADH по внешнему пути.

Активацию внешнего пути окисления NADH вызывали многократным введением крысам известного ноотропного препарата 2-пирролидонацетамид, или пирацетама [2, 7].

Методика

Исследования проводили на крысах-самках массой 150—180 г. Пирацетам подкожно или внутривенно в течение 6 сут в дозе 100 мг/кг. Жи-

вотных декапитировали через 2 ч после последнего введения препарата. Митохондрии печени выделяли, как описано ранее [5]. Среда инкубации митохондрий содержала 70 мМ KCl, 5 мМ неорганический фосфат, pH 7,5. Температура среды инкубации 28°C. Регистрацию дыхания митохондрий проводили при помощи закрытого электрода типа Кларка на полярографе I.P-60. Для определения продуктов перекисного окисления липидов из полярографической ячейки отбирали пробы, содержащие 0,5 мг белка митохондрий. Образование конечного продукта перекисного окисления липидов — малонового диальдегида (МДА) измеряли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [4], а начальные стадии — по спектрам флюоресценции при максимуме флюоресценции 420—470 нм и максимуме поглощения 360 нм [8]. Изменение вязкости митохондриальных мембран определяли по соотношению интенсивности флюоресценции мономеров и эксимеров пирена [10]. Для этой цели использовали среду инкубации 1 (СИ₁), содержащую 250 мМ сахарозу, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ малат, 4 мМ глутамат, pH 7,5, и среду инкубации 2 (СИ₂), содержащую 70 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ малат, 4 мМ глутамат, pH 7,5. Расчет микровязкости проводили по формуле: $\eta = RT/6\pi b D_n N_A$, где R — газовая постоянная; b — радиус пирена; N_A — число Авогадро; D_n — коэффициент диффузии пирена, равный $k_3/8\pi N_A 2b$; k_3 — константа эксимеризации пирена.

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, митохондрии печени крыс, получавших пирацетам, влияли на окисление NADH митохондриями печени белых крыс ($M \pm m$)

Добавка	Окисление NADH (нмоль поглощенного O_2 на 1 мг белка за 1 мин)	
	без пирацетама	с пирацетамом (<i>in vivo</i>)
ДНФ	28,4 ± 1,9	24,3 ± 3,5
ДНФ + амитал	4,2 ± 0,6	3,5 ± 0,6
ДНФ + антимитин А	2,5 ± 0,3	2,0 ± 0,3
ДНФ + NADH	3,9 ± 0,6	11,5 ± 1,8
Контроль (без добавок)	6,3 ± 0,3	8,7 ± 0,8

Примечание. Среда инкубации содержала 70 мМ KCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ глутамат, 1 мМ малат. Дополнительные добавки: 20 мкМ ДНФ, 2 мМ амитал, $8 \cdot 10^{-7}$ М антимитин А, 1 мМ NADH, белок в ячейке — 2 мг/мл (данные 6 параллельных опытов).

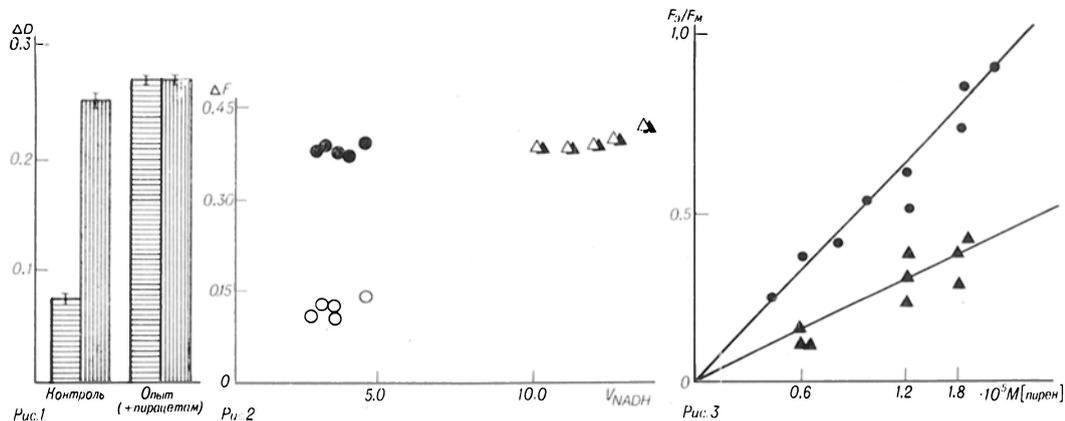


Рис. 1. Зависимость содержания МДА от функционального состояния митохондрий печени крысы.

СИ 70 мМ КСl, 5 мМ KH_2PO_4 , 4 мМ глутамат, 1 мМ малат, 20 мкМ ДНФ, 2 мМ амитал, $8 \cdot 10^{-7}$ М антимицина А, 1 мМ NADH, pH 7,5. Столбики с горизонтальной штриховкой — intactные митохондрии, с вертикальной — митохондрии после инкубации в ячейке.

Рис. 2. Взаимосвязь флюоресценции продуктов перекисного окисления липидов и функционального состояния митохондрий печени крысы.

Си, как на рис. 1. ΔF — в ед. флюоресценции; V_{NADH} — скорость окисления NADH (в нмоль O_2 за 1 мин на 1 мг белка митохондрий) в присутствии всех компонентов, указанных для СИ на рис. 1. Светлый кружок — intactные митохондрии, темный — после инкубации в ячейке, светлый треугольник — опыт (+пирацетам) — intactные митохондрии, темный — опыт — после инкубации в ячейке.

Рис. 3. Влияние инъекций пирацетама на микровязкость митохондриальных мембран печени крысы.

СИ, 70 мМ КСl, 10 мМ трис-НСl, 4 мМ глутамат, 1 мМ малат, pH 7,5. F_2 — флюоресценция эксимеров пирена; F_M — флюоресценция мономеров пирена. Кружок — опыт; треугольник — контроль.

там, характеризуются высокими скоростями окисления NADH по внешнему пути. Эти скорости превышают контрольные величины в 2,5 раза.

Уровень продуктов перекисного окисления липидов, их флюоресценция и образование МДА в митохондриях подопытных животных в 2—3 раза выше, чем у контрольных (рис. 1, 2). После инкубации митохондрий в полярографической ячейке в присутствии разоблицителя 2,4-динитрофенола (ДНФ), NADH, амитала и антимицина А различия в концентрациях продуктов перекисного окисления липидов между контрольной и опытной группой нивелируются (см. рис. 1, 2). Таким образом, при инкубации митохондрий контрольных животных с ДНФ, амитаом, антимицином А и NADH происходит активация перекисного окисления липидов. Представлялось интересным выяснить, на какой стадии или, вернее, после добавления каких препаратов в среду инкубации митохондрий активируется процесс перекисного окисления липидов. Оказалось, что добавление в среду инкубации разоблицителя ДНФ приводит к

некоторому возрастанию флюоресценции продуктов перекисного окисления липидов с $0,00010 \pm 0,00001$ до $0,00060 \pm 0,00002$ ед. флюоресценции. Последующая добавка в среду инкубации амитала и антимицина А снижала уровень флюоресценции до необходимого. И лишь после добавления к митохондриям NADH происходит резкое повышение уровня флюоресценции продуктов перекисного окисления липидов — до $0,0018 \pm 0,0001$ ед. флюоресценции. Отметим, что уровень флюоресценции продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях подопытных животных не изменялся при добавлении разоблицителя, ингибиторов дыхания и NADH и составлял $0,0020 \pm 0,0002$ ед. флюоресценции. Таким образом, при окислении NADH в присутствии амитала и антимицина А митохондриями печени уровни продуктов перекисного окисления липидов сопоставимы как в митохондриях, окисляющих NADH с высокой скоростью, так и в митохондриях, окисляющих NADH с довольно низкой скоростью. Это может свидетельствовать о том, что активация перекисного окис-

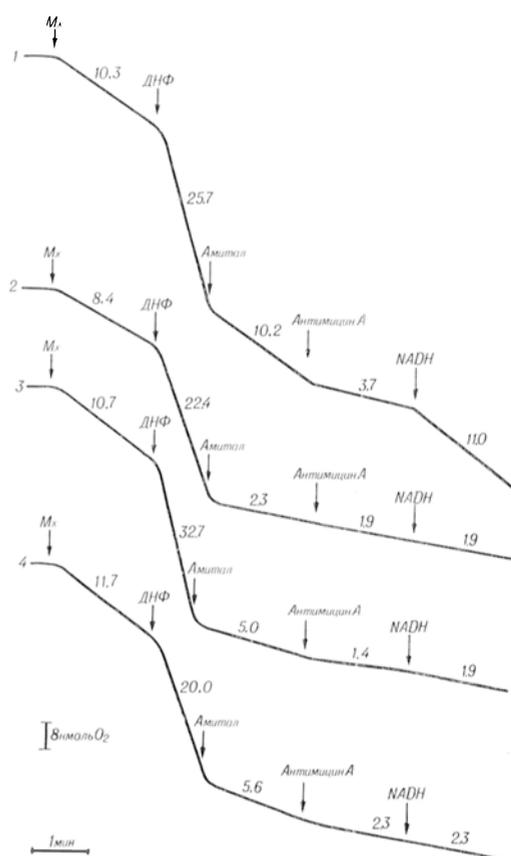


Рис. 4. Влияние состава на кинетику потребления кислорода митохондриями печени белых крыс.

1 — СИ 70 мМ КСl, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 2 — СИ 300 мМ сахароза, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 3 — СИ 70 мМ сахароза, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 4 — СИ 35 мМ сахароза, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5. Добавки: 4 мМ глутамат, 1 мМ малат, 20 мкМ ДНФ, 2 мМ амитал, $8 \cdot 10^{-7}$ М антимицин А, 1 мМ NADH.

ления липидов, возможно, является необходимым, но недостаточным условием для инициирования окисления NADH по внешнему пути.

При активации окисления NADH по внешнему пути, нечувствительному к амиталу и антимицину А, наблюдалось снижение вязкости митохондриальных мембран с $0,80 \pm 0,15$ до $0,37 \pm 0,05$ П (рис. 3). Это снижение было одинаково как в солевой, так и в сахарозной среде инкубации. Однако, как видно на рис. 4, в сахарозной среде инкубации (кривые 2, 3, 4) не отмечается активации внешнего пути окисления NADH даже при сильном снижении тоничности среды, т. е. при сильном набухании митохондрий. Эти данные свидетельствуют о том, что снижение вязкости митохондриальных мембран,

вероятно, предшествует активации внешнего пути окисления NADH и является необходимым условием для десорбции цитохрома с в межмембранное пространство митохондрий при помещении их в солевую среду инкубации. Появление цитохрома с в межмембранном пространстве приводит к образованию контакта между системой $\text{I}r_5$ — цитохром b_5 внешней мембраны митохондрий с цитохромоксидазой и вслед за этим к активации окисления NADH по внешнему пути.

Таким образом, проведенные исследования показали, что активации внешнего пути окисления NADH в митохондриях печени под влиянием пирацетама предшествует возрастание уровня перекисного окисления липидов и снижение вязкости мембран митохондрий.

Работа выполнена на базе Межфакультетской проблемной НИЛ им. А. Н. Белозерского Московского университета им. М. В. Ломоносова. Авторы выражают благодарность Л. С. Ягуржинскому и Е. Н. Моховой за помощь при выполнении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агуреев А. П., Мохова Е. Н. — В кн.: Реакции живых систем и состояние энергетического обмена. Пуцзино, 1979, с. 27—50.
2. Агуреев А. П., Терехина А. И. — Вопр. мед. химии, 1983, № 5, с. 32—35.
3. Агуреев А. П., Алтухов П. Д., Мохова Е. Н., Савельев И. А. — Биохимия, 1981, т. 46, № 11, с. 1945—1956.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
5. Жигачева И. В., Мохова Е. Н., Скулачев В. П. — Докл. АН СССР, 1976, т. 227, № 2, с. 493—496.
6. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., 1969.
7. Терехина А. И., Агуреев А. П., Лисица Л. И. и др. — В кн.: Вессоюзный съезд фармакологов. 5-й. Тезисы докладов. Ереван, 1982, с. 293.
8. Fletcher B. L., Vanderkool J., Dillard C. J. — *Analyt. Biochem.*, 1973, vol. 52, p. 1—9.
9. Lehninger A. — In: Harvey Lectures. Ser. 49, 1953—1954. Philadelphia, 1955, p. 49—176.
10. Vanderkooi J., Callis B. — *Biochemistry (Wash.)*, 1974, vol. 13, p. 4000—4006.

Поступила 25.12.81

ON THE MECHANISM OF PYRACETAME
EFFECT ON NADH OXIDATION VIA EX-
TERNAL PATHWAY IN RAT LIVER MITO-
CHONDRIA

A. P. Agurcev, I. V. Zhigacheva

Institute for Biological Testing of Chemical
Compounds, Cupavna, Moscow Region

Activation of the external pathway (amylal-
antimycine A-resistant) of the exogenous

NADH oxidation was studied in rat liver mito-
chondria after long-term (within 6 days) admi-
nistration of pyracetame. Stimulation of lipid
peroxidation and a decrease in viscosity of
mitochondrial membranes accompanied the in-
crease in the rate of oxygen consumption in
mitochondria in presence of the exogenous
NADH, amylal and antimycine A.

УДК 612.173.1.015.1:577.152.633+616.127-008.931:577.152.633]-056.43

*В. П. Мирошниченко, Г. В. Крюкова,
А. М. Зубовская, И. Л. Шарлова*

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ
МИОКАРДА КРОЛИКОВ В НОРМЕ И ПРИ ЕГО
АЛЛЕРГИЧЕСКОМ НОВРЕЖДЕНИИ**

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва

Регуляция функциональной активпо-
сти миокарда гормональными и биоло-
гически активными соединениями опо-
средуется циклическими нуклеотидами
цАМФ и цГМФ. Существование
цГМФ было установлено только в кон-
це 70-х годов, т. е. спустя 10 лет после
открытия цАМФ. В настоящее время
цГМФ обнаружен в большинстве тка-
ней животных. Широко исследуются
функции этого нуклеотида в организ-
ме. Можно с определенностью заклю-
чить, что функции цГМФ и цАМФ раз-
личны, а представление об их противо-
положном эффекте пока сохраняет
силу в отношении действия на ритм
сердца. цАМФ вызывает положительные
инотропный и хронотропный эф-
фекты, а цГМФ ослабляет их [13,
15, 20].

Разные механизмы вовлечены в ре-
гуляцию образования в тканях цАМФ
и цГМФ. Аденилатциклаза, катализи-
рующая синтез цАМФ — мембранный
фермент, регуляция активности кото-
рого находится под гормональным кон-
тролем; фермент тесно связан с соот-
ветствующими рецепторами. Гуанила-
тциклаза, катализирующая биосинтез
цГМФ, в значительной части находится
в цитоплазме и только некоторая
часть фермента (в зависимости от ви-
да ткани) является мембраносвязан-
ной. Считается, что увеличение уровня
цГМФ обусловлено активацией гуа-
нилатциклазы. Однако регуляция ак-
тивности этого ключевого фермента,
механизм его действия, роль цитоплаз-

матической и мембраносвязанной форм
фермента, а также физиологическая
роль самого цГМФ не выяснены.

Уровень цГМФ в сердечной мышце
и его изменения отмечены при некото-
рых патологиях сердечно-сосудистой
системы [6, 19]. В то же время сведе-
ния об активности гуанилатциклазы
сердечной мышцы и ее регуляции в
норме крайне редки и отрывочны [14,
16], а в случаях патологии — практи-
чески отсутствуют. Между тем выяв-
ление нарушений в системе обмена
цГМФ и его регуляции в организме
способствует пониманию механизмов,
лежащих в основе патологических из-
менений в тканях и действия лекарст-
венных препаратов и создает возмож-
ность коррекции и направленной про-
филактики и терапии.

Целью настоящей работы было ис-
следование активности гуанилатцикла-
зы, ее регуляции гормональными фак-
торами, другими биологически актив-
ными соединениями, а также определе-
ние уровня цГМФ в ткани миокарда
кролика в норме и при аллергическом
повреждении сердца.

Методика

Подопытными животными служили кроли-
ки-самцы (20 особей) массой 2,3—2,5 кг. Жи-
вотных декапитировали. Аллергическое по-
вреждение сердца (АПС) вызывали по ранее
описанному методу [3]. Уровень цГМФ и ак-
тивность гуанилатциклазы устанавливали в
тканях миокарда в норме и при АПС. Для
определения содержания цГМФ использовали
наборы фирмы «Amersham» (Англия) соглас-