

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

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1989

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

1989

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 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
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)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Е. М. Васильева, А. Г. Зябкина

АКТИВНОСТЬ АТФАЗ, СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В СЕРДЦЕ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В АОРТЕ СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

Градиент одно- и двухвалентных катионов является необходимым условием для жизнедеятельности клеток. Имеется значительное число работ [6, 9], в которых одной из причин возникновения гипертонической болезни предполагается нарушение ионного гомеостаза, в регуляции которого значительная роль принадлежит циклазной системе клетки. Имеющиеся в литературе данные относительно активности АТФаз при эссенциальной гипертензии весьма разноречивы. Так одни авторы [9, 14, 29] обнаружили снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы у крыс со спонтанной гипертензией. По данным других авторов [12, 15, 26], активность указанного фермента возрастала по сравнению с нормотензивными животными. Остается невыясненной и взаимосвязь перекисного окисления липидов (ПОЛ) с развитием артериальной гипертензии.

Методика

Исследовали активность АТФаз у нормотензивных взрослых крыс линии Вистар-Кьюто (WKY) и спонтанно гипертензивных крыс линии Окамото-Локки (SHR). В эксперимент брали крыс-самцов, масса которых к 4 мес составляла $334 \pm 10,4$ г (WKY) и $300 \pm 7,9$ г (SHR). $p < 0,05$. Артериальное давление соответственно $115,7 \pm 2,0$ и $160,7 \pm 3,1$ мм рт. ст.; $p < 0,001$. Крыс забивали под легким эфирным наркозом, сердце быстро выделяли и перфузировали по модифицированной методике Лангендорфа. После 25-минутной перфузии сердце помещали в среду выделения на ледяную баню и дальнейшие процедуры проводили на холоду при $2-4^\circ\text{C}$. Для выделения мембранных фракций использовали модифицированные методики Tada et al. [27] и Levitsky et al. [19]. Сердца 3—4 крыс объединяли и гомогенизировали в 4 объемах среды выделения, содержащей 100 мМ NaCl в 5 мМ гистидиновом буфере pH 7,2 (СВ₁). Гомогенат для лучшего разрушения клеток центрифугировали 30 мин при 60 000 г. Надосадок отбрасывали, а осадок гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в СВ₁ и центрифугировали при 600 г, 10 мин. Полученный надосадок фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 20 мин при 11 000 г. Актомнозин удаляли, добавляя к надосадку раствор, содержащий 3 М KCl, 0,1 мМ ЭГТА, 0,2 % альбумина, до концентрации KCl 0,6 М.

Через 30 мин экстракции на холоду, проводимой при медленном помешивании, суспензию центрифугировали при 2000 г 20 мин, осадок отбрасывали, а надосадок повторно центрифугировали при 11 000 г, 20 мин. Полученный осадок использовали для выделения фракции тяжелого саркоплазматического ретикулама (ТСР). Надосадочную жидкость делили на 2 части, одну из них центрифугировали при 45 000 г 90 мин, осадок суспендировали в СВ₂ (5 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭГТА, pH 7,2) с добавлением 0,01 % тритона X-100 [8], экстрагировали на мешалке 10 мин и вновь центрифугировали при 45 000 г 60 мин. Надосадок отбрасывали, а осадок дважды промывали 5 мМ гистидиновым буфером pH 7,2 с последующим осаждением (фракция легкого саркоплазматического ретикулама — ЛСР). Осадок суспендировали в среде хранения, содержащей 0,25 М сахарозы, 5 мг/мл альбумина, 5 мМ гистидина, pH 7,2 (СХ₁) и хранили при -20°C до 1 мес.

Вторую половину надосадка, предназначенную для выделения плазматических мембран, центрифугировали при 22 000 г 30 мин, осадок отбрасывали, а полученный надосадок инкубировали с 0,1 % додецилсульфатом натрия, 15 мин на холоду. Суспензию центрифугировали при 200 000 г 30 мин. Осадок дважды промывали гистидиновым буфером 5 мМ pH 7,4, суспендировали в среде хранения (СХ₂), содержащей 0,25 М сахарозы, 10 мМ гистидина, 0,2 % альбумина, pH 7,4 и хранили при 20°C . Для определения АТФазной активности использовали среды следующих составов: 30 мМ имидазола, 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ $\text{Na}_2\text{-ATP}$, pH 7,4 (общая АТФаза); 120 мМ NaCl, 3 мМ MgCl_2 , 30 мМ имидазола, 3 мМ уабанина, 3 мМ $\text{Na}_2\text{-ATP}$ pH 7,4 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза). Об активности Na^+ - K^+ -АТФазы судили по разности между активностью общей, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз. Активность Ca^{2+} -АТФазы определяли по разности между активностью фермента в среде, содержащей 30 мМ имидазола, 30 мМ NaCl, 0,5 мМ CaCl_2 , 4 мМ MgCl_2 , 4 мМ $\text{Na}_2\text{-ATP}$ pH 7,0 в присутствии или отсутствии 1 мМ ЭГТА [18]. Все растворы готовили на деионизированной воде. Об АТФазной активности судили по приросту неорганического фосфата в среде инкубации. Фосфор определяли по Лоурн — Лопену, белок — по Лоурн.

Содержание цАМФ и цГМФ в ткани сердца определяли радионуммуным методом с применением стандартных наборов фирмы «Амершам».

Для определения продуктов ПОЛ сразу после забоя выделяли аорту, отмывали ее в ледяном 0,9 % растворе KCl, гомогенизировали на холоду сначала в фарфоровой ступке, затем в стеклянном гомогенизаторе. На 10 мг ткани брали 1 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,6. Дальнейшие определения малонового

дальдегида (МДА) и днеповых конъюгатов (ДК) в гомогенате осуществляли по методу [7]. Статистическую обработку проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно на рис. 1, активность Ca^{2+} - и Na^+ , K^+ -АТФазы в плазматических мембранах у животных линии SHR больше, чем у крыс WKY соответственно на 163 и 100 % ($p < 0,05$).

Считают, что причиной артериальной гипертензии является генетический дефект, выраженный в уменьшении способности организма выводить натрий, что приводит к увеличению общего объема крови и повышению артериального давления и (или) повышению скорости поступления Ca^{2+} в клетку [6, 9]. На основании полученных нами данных можно предположить, что генетически детерминированный повышенный уровень Na^+ и Ca^{2+} в клетке обуславливает изменения в биохимических механизмах, направленные на поддержание ионного градиента на допустимом для жизнедеятельности клеток уровне.

Во фракциях легкого и тяжелого саркоплазматического ретикулов активность Na^+ , K^+ -АТФазы у крыс линии SHR также была выше, чем у крыс линии WKY, но и у тех, и у других животных она была ниже, чем во фракции плазматических мембран. Присутствие Na^+ , K^+ -АТФазной активности в этих фракциях подтверждается публикациями [2].

Данные об активности Na^+ , K^+ -АТФазы при артериальной гипертензии, как уже говорилось выше, весьма

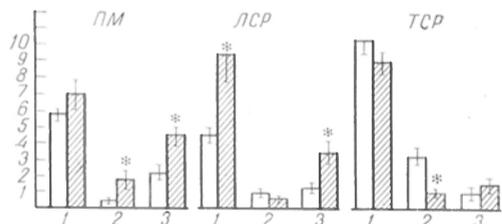


Рис. 1. АТФазная активность в различных фракциях сердца крыс.

PM — плазматические мембраны, LSP — легкий саркоплазматический ретикулум, TSP — тяжелый саркоплазматический ретикулум. Здесь и на рис. 2 и 3: 1 — Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза, 2 — Ca^{2+} -АТФаза, 3 — Na^+ , K^+ -АТФаза. Светлые столбики — нормотензивные крысы; заштрихованные — спонтанно гипертензивные. Звездочка — $p < 0,05$ относительно нормотензивной группы животных. По оси ординат — в мкмоль P_i на 1 мг белка за 1 ч.

разноречивы: одни авторы обнаружили так называемый натрийуретический гормон, ингибирующий Na^+ , K^+ -АТФазу и считают, что активность Na^+ , K^+ -АТФазы при гипертензии снижена [9, 14]. По данным других авторов [10, 12, 15, 26], активность Na^+ , K^+ -АТФазы у животных линии SHR в 1,5—2 раза выше, чем у крыс линии WKY. Возможно, что у крыс линии SHR преобладают механизмы долгосрочного контроля за активностью ферментов, поддерживающих ионный гомеостаз клетки [15]. Это может осуществляться путем индукции биосинтеза фермента, в частности, за счет увеличенного биосинтеза альдостерона в надпочечниках, что обнаружено у крыс линии SHR [5, 22, 24]. Возможна также демаскировка латентной формы фермента [2, 10], которая активируется микромолярными концентрациями Ca^{2+} [11]. Существуют данные о значительном увеличении вымывания K^+ из аорты крыс SHR [17], а как известно, K^+ конкурирует с уабанном, препятствуя его связыванию с ферментом. Это также может являться причиной повышения активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы у животных линии SHR во фракции ЛСР на 121 % ($p < 0,01$) была выше, чем у крыс WKY. В то же время активность Ca^{2+} -АТФазы во фракциях ЛСР и ТСР была снижена по сравнению с нормотензивными животными. Известно, что в связывании Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулом принимают участие 2 независимых друг от друга компонента, с малым и очень высоким сродством к Mg^{2+} . Поскольку последний, по-видимому, обеспечивает транспорт Ca^{2+} [4], снижение Ca^{2+} -АТФазы может привести к компенсаторному увеличению активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, что согласуется с данными [29] о снижении у крыс SHR способности к связыванию Ca^{2+} .

Исследование уровня циклических нуклеотидов показало, что содержание цАМФ в ткани сердца крыс SHR (рис. 2) значительно выше по сравнению с нормотензивными животными (на 191 %; $p < 0,05$), тогда как количество цГМФ было несколько снижено. Рядом авторов [1, 23, 28] показано, что цАМФ увеличивает содержание Ca^{2+} и Na^+ в цитоплазме. Имеются сведения, что ионы натрия сами по себе увеличи-

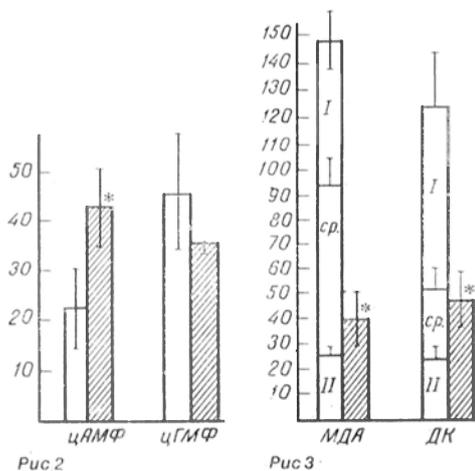


Рис. 2. Содержание циклических нуклеотидов в сердце крыс.

По оси ординат — в пмоль на 1 мг ткани.

Рис. 3. Содержание малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) в аорте крыс.

По оси ординат — в мкмоль на 1 мг белка.

вают уровень цАМФ в 2,5 раза. Однако цАМФ может вызывать дозозависимое увеличение активности Na^+ , K^+ -АТФазы [21], а также стимулировать захват Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулом [1]. Эти данные, свидетельствующие об увеличенном содержании ионов Na и Ca^{2+} в клетке при спонтанной гипертензии, согласуются с нашими данными о параллельном (компенсаторном) увеличении количества цАМФ и активности N^+ , K^+ -АТФазы в плазматической мембране и Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФазы во фракции ЛСР сердца у крыс линии SHR. При этом нельзя, однако, исключить влияния гипертрофии сердца *per se*, имевшее место у находившихся в данном исследовании взрослых крыс с длительной стойкой гипертензией, что требует дальнейшего изучения.

В связи с тем, что исследование АТФазной активности и содержания циклических нуклеотидов проводили на перфузируемом сердце, во избежание искажения данных образование продуктов ПОЛ изучали в гомогенате аорты тех же крыс. Оказалось, что образование ДК и МДА у крыс линии SHR снижено по сравнению с крысами WKY. Однако это правомерно только для средних значений. Было установлено, что по образованию ДК и МДА

нормотензивные крысы WKY делятся на 2 подгруппы: с высокой и низкой способностью к ПОЛ. Причем уровень продуктов ПОЛ во 2-й подгруппе был даже ниже, чем у крыс SHR (рис. 3). Образование ДК и МДА в 1-й подгруппе крыс WKY в несколько раз превышало аналогичные показатели у крыс SHR. Мы полагаем, что это можно объяснить следующим: в эксперименте использовали крыс линии WKY, из которых была выведена линия спонтанно гипертензивных животных. У крыс линии WKY существует наследственная предрасположенность к гипертензии, но таковая не развивается. Не исключено, что при определенных неблагоприятных условиях у крыс линии WKY со сниженными процессами ПОЛ могла бы развиваться гипертензия.

В этой связи следует иметь в виду, что в нормальной клетке процессы ПОЛ являются физиологически необходимыми, так как благодаря им окисленные фосфолипиды становятся доступными действию фосфолипаз. Установлено, что перекиси липидов снижают поглощение Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулом и уменьшают активность Ca^{2+} -АТФазы [25]. цГМФ активирует Са-фосфорилазу, увеличивая количество свободных жирных кислот в клетке, ингибирует активность Na^+ , K^+ -АТФазы [3]. Эти данные согласуются с нашими результатами об одновременном более высоком уровне цГМФ, активации ПОЛ и снижении активности Na^+ , K^+ -АТФазы у крыс WKY по сравнению с животными линии SHR. Поскольку в случае с крысами SHR речь идет о долговременной адаптации организма к высокому уровню артериального давления, можно предположить, что снижение интенсивности ПОЛ у этих животных на поздних стадиях артериальной гипертензии играет положительную роль, давая возможность клеткам интенсивно регулировать нарушенный ионный баланс за счет активации транспортных АТФаз. В то же время снижение образования МДА может косвенно указывать на угнетение биосинтеза сосудорасширяющих простагландина E_2 и простаглицлина, что усугубляет развитие гипертензии [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабанова В. В., Егоров В. Я. // Физиол. журн. ССР. — 1985. — Т. 71. — № 11. — С. 1368—1374.

2. Болдырев А. А. Транспортные аденозинтрифосфатазы. — М., 1985. — С. 3—222.
3. Даниленко М. П. // Труды ин-та физиологии АН КирССР. Фрунзе. — 1982. — Т. 25. — С. 12—149.
4. Курский М. Д., Ромась И. И., Рыбальченко В. К. // Биохимия животных и человека. — М., 1977. — Т. 1. — С. 5—24.
5. Марков Х. М., Банкова В. В., Кучеренко А. Г. // Вестн. АМН СССР. — 1978. — № 7. — С. 84—90.
6. Постнов Ю. В. // Кардиология. — 1985. — № 10. — С. 63—71.
7. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 63—68.
8. Bennett J. P. // Curr. Top. Membr. Transport. — 1980. — Vol. 14. — P. 127—164.
9. Buckalew V. M., Gruber K. A. // Ann. Rev. Physiol. — 1984. — Vol. 46. — P. 343—358.
10. Cirillo M., David-Dujilho M., Devynck M. A. // Clin. Sci. — 1984. — Vol. 67. — № 5. — P. 535—540.
11. Del Castello J. R., Marin R., Porverbio T., Proverbio F. // Biochem. biophys. Acta. — 1982. — Vol. 692, № 1. — P. 61—68.
12. Erdmann E., Schmidinger U. // Topics in Pathophysiology of Hypertension. — Boston, 1984. — P. 558.
13. Fujimoto Y., Tanioka H., Kashi L., Fujita T. // Biochem. J. — 1983. — Vol. 212. — P. 167—171.
14. Glynn J. M., Rink T. J. // Nature. — 1982. — Vol. 300. — P. 576—577.
15. Godfraind T., Noel F. // Arch. int. Pharmacodyn. — 1980. — Vol. 245, N 1. — P. 139—144.
16. Gudmundsson O., Andersson O., Hertz H. et al. // Cardiovasc. Pharmacol. — 1984. — Vol. 6, Suppl. 1. — P. S35—S41.
17. Jones A. W. // Circulat. Res. — 1974. — Vol. 35, N 5. — P. 117—122.
18. Karmazyn M., Tuana B. S., Dhalla N. S. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. — 1981. — Vol. 59. — P. 1122—1127.
19. Levitsky O. O., Aliev M. K., Kuzmin A. V. // Biochim. biophys. Acta. — 1976. — Vol. 443. — P. 468—484.
20. Lichtstein D., Boone G., Blun A. J. // Life Sci. — 1979. — Vol. 25, N 11. — P. 985—992.
21. Limas C. J., Cohn J. N. // Circulat. Res. — 1974. — Vol. 35, N 4. — P. 601—607.
22. Luthra M. G., Kim H. D. // Biochim. biophys. Acta. — 1980. — Vol. 600, N 2. — P. 467—479.
23. Mesta-Ketela T., Vapaatalo H. // Prostaglandin and Tromboxanes. — Jena, 1981. — P. 129—130.
24. Mujais S. K., Chekai M. A., Jones W. J. // J. clin. Invest. — 1984. — Vol. 73, N 1. — P. 13—19.
25. Okabe E., Hiyama E., Oyama M. et al. // Pharmacology. — 1982. — Vol. 25. — P. 138—148.
26. Rayson B. M., Lonther S. O. // J. molec. cell. Cardiol. — 1981. — Vol. 13, Suppl. 2. — P. 6.
27. Tada M., Yamamoto T., Tonomura Y. // Physiol. Rev. — 1978. — Vol. 58, № 1. — P. 1—79.
18. Thundroyen F. T., Higginson L. M., Opie L. H. // Basic Res. Cardiol. — 1981. — Vol. 76. — P. 449—452.
29. Watari S., Nagata E., Ookubo T. // Jap. Circulat. J. — 1981. — Vol. 45. — P. 979.

Поступила 23.10.88

ACTIVITY OF ATPASES, CONTENT OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN HEART TISSUE AND LIPID PEROXIDATION IN AORTA OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

E. M. Vasil'eva, A. G. Zyabkina

Institute of Pediatrics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Activities of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺, Mg²⁺-ATPases as well as content of cAMP were increased in heart tissues of spontaneously hypertensive rats as compared with normotensive animals. On the other hand, the rate of lipid peroxidation was decreased in aorta of the hypertensive rats.

УДК 612.015.1].015.31].085.2

Г. К. Парсаданян, Л. В. Саркисян, И. Г. Асланян, Г. Т. Адунц,
Г. Г. Адунц

ВЛИЯНИЕ АЛЛОКСАНА IN VITRO НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ФОСФОРНОГО ОБМЕНА

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Аллоксан и стрептозотоцин используют при моделировании диабета в экспериментах на животных. Изучены вызываемые аллоксаном нарушения в некоторых звеньях углеводно-фосфорного обмена в тканях, происходящие вследствие перерождения β-клеток островков Лангерганса [1, 6, 12, 14]. Наряду с диабетогенным действием на ранних этапах после введения аллоксана могут отмечаться неспецифические

изменения отдельных звеньев метаболизма, что, по-видимому, связано с влиянием аллоксана на внутриклеточные механизмы окислительного обмена [5, 8, 13]. In vivo аллоксан восстанавливается в клетках в диалуровую кислоту, повторное окисление которой кислородом приводит к образованию таких цитотоксических свободных радикалов, как O₂⁻ или OH[•] [7, 10, 11]. Через 3 ч после введения аллокса-