

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)

Г. А. Геворкян, А. С. Канаян, Л. О. Восканян

СИНТЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПРИ ИЗОПРОТЕРЕНОЛОВОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА КРЫС

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереванский институт усовершенствования врачей Минздрава СССР

Одной из основных структур кардиомиоцитов являются митохондрии — важнейшие обменные центры клетки. Роль их заключается в обеспечении сердечной мышцы энергией АТФ для сокращения и релаксации миофибрилл, синтеза белка, поддержания внутриклеточного гомеостаза и ряда других важных функций жизнеобеспечения клетки. Кардиомиоциты чрезвычайно богаты митохондриями, что и обуславливает способность сердечной мышцы к непрерывной работе в течение всей жизни. Количество митохондриального белка составляет 60 мг на 1 г ткани миокарда, что соответствует 40 % всей массы белка сердечной мышцы [16], причем на долю внешних мембран митохондрий приходится около 4 %, внутренних — 20 %, матрикса — 60—70 % от общего митохондриального белка. Митохондрии являются наиболее лабильными внутриклеточными структурами и первыми реагируют на воздействие патогенных факторов. Независимо от природы патогенного агента изменения митохондрий довольно стереотипны и проявляются их набуханием, просветлением матрикса, фрагментацией и гомогенизацией крист и разрушением внешней мембраны [3, 7, 12]. Особенно заметным и ранним изменением подвергаются внутренние мембраны, на которых преимущественно локализованы ферменты, ответственные за основные функции митохондрий. Образовавшийся при их повреждении энергетический дефицит клетка стремится покрыть использованием углеводного пути синтеза АТФ, хотя последний обеспечивает менее половины необходимой энергии [5].

В возникновении заболеваний сердечно-сосудистой системы одно из главных мест отводится ишемии, стрессу или их сочетанию. Стрессовая реакция развивается закономерно в ответ на действие экстремальных факторов и рассматривается как необходимое звено индивидуальной адапта-

ции организма [3]. Однако чрезмерная сила и(или) длительность воздействия способствуют превращению стресс-реакции из общего звена адаптации в общее звено патогенеза стрессорных и ишемических повреждений миокарда, которые тесным образом связаны и взаимообусловлены. Стрессорные повреждения миокарда реализуются чрезмерным усилением нормального адренергического эффекта. Показано, что кардиомиоциты очень быстро реагируют на избыточное количество в крови катехоламинов экзо- и эндогенного происхождения [2]. Применяя меченый изопротеренол, удалось показать, что зоны его накопления соответствуют зонам наибольшего повреждения кардиомиоцитов [15]. Следует отметить, что изопротеренол обладает наиболее выраженным некрогенным эффектом: эффект изопротеренола > норадреналина > адреналина.

Мы попытались изучить интенсивность синтеза белка в субфракциях митохондрий миокарда белых крыс при его изопротереноловом повреждении в условиях физиологического развития животных, что может способствовать выявлению некоторых патогенетических звеньев, а возможно, и собственных защитных сил организма при адренергических повреждениях миокарда.

Методика

Эксперименты проведены на беспородных белых крысах-самцах 3 возрастных групп: 1-, 3- и 6-месячных. Для получения одинаковой тяжести метаболических повреждений миокарда животным вводили разные дозы изопротеренола: 12 мг на 100 г массы тела месячным, 8 мг на 100 г массы тела 3-месячным и 16 мг на 100 г массы тела 6-месячным крысам. Изопротеренол всем животным вводили внутривенно двукратно с интервалом 24 ч. Умерщвляли животных через 24 ч после повторной инъекции изопротеренола. За 2 ч до забоя им вводили внутривенно 80 мКи смеси L-¹⁴C-аминокислот (серин + лейцин + + глутаминовая кислота) с удельной радиоактивностью 240 мКи/ммоль («Хемапол», ЧССР). После декапитации сердце перфузировали

0,15 М раствором KCl и гомогенизировали в 0,44 М сахарозе, содержащей 1 мМ ЭДТА. Активность протеаз ингибировали фенилметилсульфонилфторидом в конечной концентрации 1 мМ. Митохондрии и их субфракции получали по методам, описанным в литературе [6, 11].

Чистоту выделенных митохондриальных субфракций контролировали под электронным микроскопом и с помощью энзиматических методов — по активности моноаминоксидазы [14] и цитохромоксидазы (по поглощению кислорода с помощью электрода Кларка на кислородном анализаторе Beckman-0260). Белки внутренней митохондриальной мембраны фракционировали по методу [19]. Полученные гели денситометрировали на лазерном денситометре при 540 нм, после чего разрезанные по белковым профилям солиubilизировали в смеси липолума — лумасольфа (9 : 1) «Roche Bioelectrogonique» (Франция). Уровень радиоактивности определяли на жидкостном сцинтилляционном спектрометре СЛ-4221 (Франция) по программе, предусматривающей счет абсолютной радиоактивности методом внешнего стандарта. Полученные данные были подвергнуты компьютерной обработке для получения усредненной картины распределения радиоактивности по отдельным белковым фракциям после электрофореза, с достоверностью 92 %. Радиоактивность всей митохондриальной фракции и фракции мембран определяли после их предварительной солиubilизации 0,5 М раствором протозола NEN (США) с последующим отсчетом в сцинтилляторе на основе ксилюла [9]. Белок определяли по Лоури [13].

Для морфологического контроля миокард фиксировали 10 % забуференным по Лилли формалином и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Селье. Срезы просматривали в проходящем и поляризованном свете.

Результаты и обсуждение

Под воздействием изопротеренола развивались очаговые метаболические повреждения миокарда контрактурного типа, преимущественно II—III степени. Наблюдались также очаги зернисто-глыбчатого распада, миоцитолитическая дистрофия по Селье, фуксинофильная дистрофия по Селье. В отдельных участках на месте гибели кардиомиоцитов обнаруживалась их резорбция с активацией фибропластических процессов в виде скопления фибропластов и макрофагов. Очаги метаболических повреждений были локализованы преимущественно в папиллярных мышцах и субэндокардиальных пластах стенки левого желудочка сердца. По распространенности и выраженности метаболические повреждения миокарда были примерно одинаковыми у крыс всех возрастных групп.

Изучение уровня включения радиоактивных предшественников показало, что под влиянием изопротеренола происходило резкое по сравнению с контролем увеличение удельной радиоактивности белков внутренних мембран митохондрий у 1-месячных крыс (на 80,7 %) и снижение ее у 3- и 6-месячных животных на 53,5 и 54,7 % соответственно (см. таблицу). Ингибция скорости включения меченых аминокислот в белки внутренних мембран митохондрий под влиянием изопротеренола была наиболее выраженной у 3-месячных крыс: по сравнению с 1-месячными скорость включения подавлялась в 2,5 раза, при этом незначительно отличаясь от таковой у 6-месячных животных.

Удельная радиоактивность белков внешних мембран митохондрий снижалась у животных всех возрастных групп, причем если это уменьшение радиоактивности у 1-месячных крыс было статистически недостоверным по сравнению с интактными, то у 3- и 6-месячных оно достигало 68 и 40 % соответственно (см. таблицу).

Удельная радиоактивность белков внешних мембран митохондрий снижалась у животных всех возрастных групп, причем если это уменьшение радиоактивности у 1-месячных крыс было статистически недостоверным по сравнению с интактными, то у 3- и 6-месячных оно достигало 68 и 40 % соответственно (см. таблицу).

Уровень включения радиоактивных предшественников (расп/мин на 1 мг белка) в субфракции митохондрий 1-, 3- и 6-месячных крыс при изопротереноловом повреждении миокарда

Субфракция	Группа крыс		
	1-месячные	3-месячные	6-месячные
Контроль			
Внешние мембраны	12 500±300	12 984±837	13 728±491
Внутренние мембраны	7 104±400	10 383±1252	12 110±1085
Матрикс	41 193±4162	12 768±1024	8 958±1483
Опыт			
Внешние мембраны	10 893±1381	4 150±84	8 202±138
Внутренние мембраны	12 837±817	5 040±176	5 488±130
Матрикс	14 917±534	3 736±50	7 431±163

Примечание. В каждой группе было по 5 животных; опыты проводили в 6 повторностях.

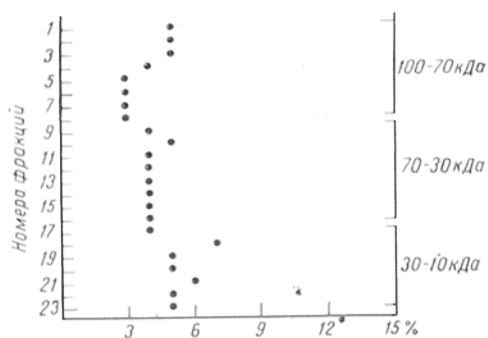


Рис. 1. Распределение радиоактивности между белковыми фракциями (1—23; ось ординат) внутренних мембран митохондрий миокарда 1-месячных крыс.

Радиоактивность каждой отдельной фракции выражена в % от суммарной радиоактивности всех 23 фракций. Данные выражены в расп/мин на 1 мг белка. Достоверность различий составляет 92 %. Количество белка, внесенного в лунку, составляет 140 мкг.

Результаты исследований по изучению возрастных особенностей включения аминокислот в белки митохондриального матрикса интактных крыс показали, что с возрастом происходило постепенное снижение удельной радиоактивности белков матрикса. Так, у 3-месячных крыс в отличие от 1-месячных удельная радиоактивность снижалась на 69 %, а у 6-месячных — на 79 % (см. таблицу).

Под воздействием изопротеренола удельная активность белков матрикса у 1- и 3-месячных крыс снижалась в 3 раза по сравнению с соответствующей контрольной группой. У 6-месячных животных изопротеренол не влиял на указанный выше тест. Реакция белков митохондриального матрикса на фоне введения изопротеренола сохраняла ту же возрастную динамику, что и у интактных крыс: у 3-месячных животных обнаружено снижение радиоактивности белков матрикса на 75 % по сравнению с 1-месячными, а у 6-месячных — на 50 %.

При фракционировании белков внутренних мембран митохондрий на 10 % ПААГ нами были выделены 23 фракции, которые условно подразделялись на 3 группы: 1) относительно высокомолекулярная — 100—70 кДа (фракции 1—8); 2) среднемолекулярная — 70—30 кДа (фракции 9—16); 3) низкомолекулярная — 30—10 кДа (фракции 17—23). Динамика изменения фракционного состава белков внутренней мембраны митохондрий в воз-

растном аспекте была нами исследована ранее. Полученные результаты свидетельствовали о повышении скорости включения предшественников по мере физиологического роста [1]. Изопротеренол вызывал не только количественные изменения белков (подавление синтеза), но и значительные качественные сдвиги в фракционном спектре белков. Наиболее выраженные качественные сдвиги наблюдали у 3-месячных крыс, менее выраженные — у 1- и 6-месячных. Так, у месячных животных наряду с усилением удельной радиоактивности тотального белка внутренних мембран выявлено примерно равномерное распределение метки по всем трем условным группам белков с незначительным превалярованием в низкомолекулярной группе: 32,4; 32,4 и 35,2 % соответственно (рис. 1). Интересен факт исчезновения 2 фракций из группы высокомолекулярных белков, 1 из среднемолекулярной и 3 из низкомолекулярной группы 3-месячных крыс. При этом метка между группами белков распределялась следующим образом: 51,1 % — высокомолекулярная, 32,9 — среднемолекулярная и 19,9 % — низкомолекулярная (рис. 2). Следует отметить, что столь выраженное повышение тотальной радиоактивности группы высокомолекулярных белков было обусловлено первой фракцией, которая составляла 32,8 % от общей радиоактивности. У 6-месячных крыс количество фракций восстанавливалось до 23, при этом наибольшей радиоактивностью обладала высокомолекулярная группа белков (рис. 3). Следовательно, если изопротеренол не влиял существенно образом на фракционный состав белков внутренней мембраны.

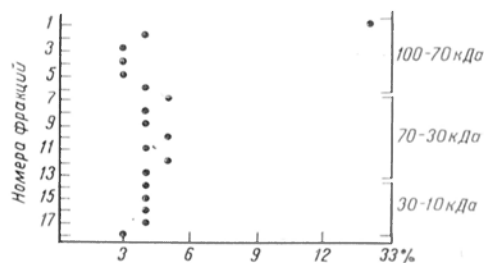


Рис. 2. Распределение радиоактивности между белковыми фракциями (1—18; ось ординат) внутренних мембран митохондрий миокарда 3-месячных крыс.

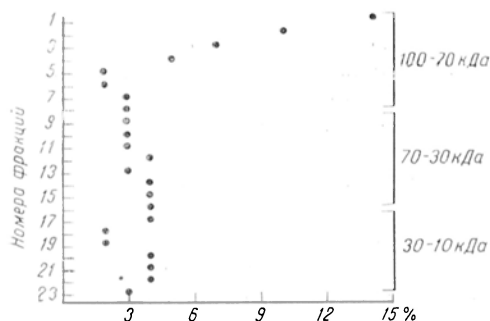


Рис. 3. Распределение радиоактивности между белковыми фракциями (1—23; ось ординат) внутренних мембран митохондрий миокарда 6-месячных крыс.

1-месячных крыс, то у 3- и 6-месячных животных зарегистрирована высокая радиоактивность высокомолекулярной (100 кДа) фракции. По всей вероятности, в этих случаях мы имеем дело с процессом агрегации продуктов протеолитического расщепления, но не с усилением скорости синтеза первой фракции. Его доля в общем количестве белка внутренних мембран изменялась по ходу развития с 5 % (у месячных) до 32 и 14 % соответственно у 3- и 6-месячных животных.

Таким образом, хотя тяжесть повреждения миокарда изопротеренолом у животных разных возрастных групп была примерно одинаковой, следовая реакция митохондрий кардиомиоцитов оказалась неоднозначной. У 1-месячных крыс интенсивность синтеза белка внешних мембран митохондрий под влиянием препарата не претерпевала существенных изменений; но замечалось резкое усиление включения метки в белки внутренней мембраны митохондрий. Полученные нами данные об усилении интенсивности синтеза белка внутренней мембраны 1-месячных крыс под влиянием изопротеренола согласуются с результатами, которые объясняют эффект изопротеренола на синтез белка снижением концентрации микроэргов в митохондриях в результате разобщения окисления и фосфорилирования, вызванных препаратом [20]. По всей вероятности, усилением интенсивности синтеза белка внутренних мембран митохондрий можно объяснить высокую резистентность сердца животных данной возрастной группы к повреждающему влиянию изопротеренола. Самоограни-

чение интенсивности адренергического эффекта в сердце 1-месячных крыс, возможно, обусловлено особенностями метаболизма, в частности большим резервом пластичности на данном этапе развития. Скорость включения метки во многом зависит от пула аминокислот, ферментов, катализирующих образование пептидной связи, и ряда других факторов. Посттрансляционный транспорт белков находится в зависимости от степени энергизации митохондрий [18], которая, по-видимому, особенно высока у 1-месячных животных.

Снижение удельной радиоактивности белков внутренней мембраны митохондрий сердечной мышцы 3- и 6-месячных крыс по сравнению с таковой у интактных животных обусловлено не только уменьшением скорости синтеза, но и, по-видимому, увеличением скорости их деградации. Известно, что скорость синтеза и деградации белков в физиологических условиях находится в динамическом равновесии [17]. Под воздействием изопротеренола это равновесие может сместиться в ту или иную сторону. При этом важная роль отводится размерам белковых молекул, которые могут существенно изменять скорость катаболизма [8].

В реализации эффекта катехоламинов на сердце большое значение придается кальциевой триаде: нарушение расслабления миофибрилл, активация фосфолипаз и протеаз, нарушение окисления и фосфорилирования в обогащенных Ca^{2+} митохондриях [4]. Результаты проведенных нами ранее исследований свидетельствуют о нарушении функции кальциевого насоса и значительном накоплении Ca^{2+} (повышении его уровня на 93 %) в саркоплазматическом ретикулуле миокарда под влиянием изопротеренола [10]. Повреждение митохондриальных мембран изопротеренолом обусловлено не только активацией липолиза и протеолиза, но и, как показали наши данные, нарушением скорости синтеза и фракционного состава белка матрикса и мембран митохондрий.

Исходя из изложенного, можно заключить, что в механизмах проявления чрезмерного эффекта изопротеренола имеет значение фоновое состояние метаболизма миокарда, в частности его возрастные особенности. Наиболее эффективно механизмы самоза-

щиты миокарда от влияния избыточных количеств изопротеренола функционируют у 1-месячных крыс, менее эффективно — у 6-месячных и слабо — у 3-месячных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян Г. А., Симонян А. А., Восканян Л. О. // Укр. биохим. журн. — 1988. — Т. 60, № 1. — С. 19—23.
2. Данилова К. М. // Арх. пат. — 1961. — № 11. — С. 11—17.
3. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984. — С. 33.
4. Меерсон Ф. З. // Физиология адаптационных процессов. — М., 1986. — С. 545.
5. Собыль Б. Е. // Метаболизм миокарда. — М., 1975. — С. 352—372.
6. Чернух А. М., Контева Л. А. // Метаболизм миокарда. — М., 1977. — С. 329—338.
7. Aschenbrenner V., Zak R., Culilletta A. F., Rabinowitz M. // Amer. J. Physiol. — 1971. — Vol. 221. — P. 1418—1425.
8. Dehlinger J. J., Schimke R. T. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246. — P. 2574—2583.
9. Fricke U. // Analyt. Biochem. — 1975. — Vol. 63. — P. 555—558.
10. Galoyan A. A., Kevorkian G. A., Voskanian L. H. et al. // Neurochem. Res. — 1988. — Vol. 13. — P. 435—441.
11. Hoppel C., Cooper C. // Arch. Biochem. — 1969. — Vol. 138. — P. 173—178.
12. Jefferson L. S., Wolpert E. B., Giger K. E., Morgan H. E. // J. biol. Chem. — 1971. — Vol. 246. — P. 2171—2178.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // Ibid. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. McCaman R. E., McCaman N. M., Hunt J. M., Smith M. S. // J. Neurochem. — 1965. — Vol. 12. — P. 15—23.

15. Milei J., Nunez G. R., Rapaport M. // Cardiology. — 1978. — Vol. 63. — P. 139—151.
16. Mela-Riker L. M., Bukoski R. D. // Ann. Rev. Physiol. — 1985. — Vol. 47. — P. 645—663.
17. Schoenheimer R., Ratner S., Rittenberg D. // J. biol. Chem. — 1939. — Vol. 130. — P. 703—732.
18. Schleyer M., Schmidt B., Neupert W. // Europ. J. Biochem. — 1982. — Vol. 125. — P. 109—116.
19. Weber K., Osborn N. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244. — P. 4406—4412.
20. Wood W. G., Lindenmayer G. E., Schwartz A. // J. molec. cell. Cardiol. — 1971. — Vol. 3. — P. 127—128.

Поступила 11.11.88

SYNTHESIS OF MITOCHONDRIAL PROTEINS IN ISOPROTENEROL-DERIVED NECROSIS OF RAT MYOCARDIUM

G. A. Kevorkian, A. S. Kananyan, L. O. Voskanian

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Institute for Postgraduate Training of Physicians, Yerevan

A rate of ^{14}C -amino acids incorporation into mitochondrial proteins was studied during necrosis of myocardium developed after intraperitoneal injection of (—)isoproterenol to 1-, 3- and 6 months old rats. The rate of label incorporation into the outer membranes fraction was decreased in all the age groups studied, whereas incorporation of the label into the fraction of inner membranes was increased in myocardium of 1 month old rats and decreased in other age groups. Proteins of mitochondrial inner membrane were fractionated by means of electrophoresis in 10 % polyacrylamide gel. In the group of 3 months old animals 23 fractions were detected, while only 18 fractions were found in 1- and 6 months old rats

УДК 616.753.962.4-074

Е. П. Смородин, Х. Э. Арукаэву

ВЫДЕЛЕНИЕ α_2 -МАКРОГЛОБУЛИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА КОМБИНАЦИЕЙ МЕТОДОВ ПСЕВДОЛИГАНДНОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

Институт экспериментальной и клинической медицины Минздрава Эстонской ССР, Таллин

α_2 -Макроглобулин (α_2 -МГ) плазмы крови является ингибитором протеаз с широким спектром действия [5]. Для изучения физиологической роли α_2 -МГ важное значение имеет выделение его в чистом виде в нативной форме. Методы выделения α_2 -МГ имеют недостатки: множество этапов и низкий выход [9, 10], инактивация препарата [11], необходимость при-

менения дефицитного иммуносорбента [3], использования плазмы крови с фенолином гаптоглобинов 1—1 [12]. Применение псевдолигандной аффинной хроматографии на Цибаكرون голубой агарозе имеет большие потенциальные возможности для разделения белков крови [7]. Такой метод выделения α_2 -МГ достаточно прост и позволяет избавиться от главных при-