

УДК 616.155.164±54.466.3

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ГАМК И ПИРАЦЕТАМА НА СИСТЕМУ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ADP МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

О.П. Соцкий, В.П. Акопян, Л.Г. Жамгарян, А.Г. Жамгарян

Ереванский государственный медицинский университет.
Ереван, ул. Корюна, 2, тел./факс (3742) 58-25-32

При длительном ограничении двигательной активности нарушаются процессы фосфорилирования ADP митохондрий печени и сердца. Наиболее выраженные сдвиги наблюдаются на 15 и 45 сутки гипокинезии. Введение ГАМК и пирацетама животным на фоне гипокинезии вызывает тенденцию к "нормализации" процессов фосфорилирования ADP.

Ключевые слова: гипокинезия, митохондрии, сукцинатдегидрогеназа, ADP, ГАМК, пирацетам.

ВВЕДЕНИЕ. Интерес к изучению механизмов преобразования энергии в митохондриях при стрессе до сих пор не ослабевает [1-3]. Причина этого не только в недостаточной изученности данной проблемы. По мнению одного из ведущих специалистов по биоэнергетике М.И. Кондрашовой: "Выяснение закономерностей реакций митохондрий в ходе адаптационного синдрома помогут открыть новые возможности управления стрессом посредством направленной регуляции митохондриальных процессов" [2]. С последним нельзя не согласиться, поскольку жизнедеятельность и способность организма адаптироваться к внешней среде во многом зависит от образования макроэргов в митохондриях. Особое внимание исследователей привлекает изучение состояния энергетического обмена при гипокинезии (ГК), нарушения в котором, по мнению ряда авторов, обусловлены сочетанным влиянием двух факторов: собственно обездвиживания и хронического стресса [4]. Следует также отметить, что в доступной для нас литературе имеются указания на нарушение в энергетическом обмене при ГК, однако характер и важнейшие факторы, лежащие в их основе, изучены недостаточно [5].

В данной работе главное внимание было направлено на изучение состояния фосфорилирования ADP и активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) митохондрий при ГК, а также попытка фармакологической коррекции выявленных отклонений с помощью ГАМК и пирацетама.

МЕТОДИКА. Использованы белые крысы-самцы массой 150-180г, содержащиеся на обычном пищевом рационе. ГК достигалась помещением крыс в тесные индивидуальные клетки-пеналы из органического стекла. Животных забивали на 15, 30 и 45 сутки ГК. За десять дней до наступления каждого конкретного срока ГК крысам ежедневно внутрибрюшинно вводили ГАМК и пирацетам в дозе 5 мг/кг. Животные были разделены на следующие группы: 1) интактные крысы в качестве общего контроля 2) контроль ГК конкретного срока 3) животные, получавшие ГАМК 4) животные, получавшие пирацетам.

МИТОХОНДРИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

Митохондрии из ткани печени выделяли по общепринятому методу. Изолированные митохондрии суспензировали в небольшом объеме 0.25М раствора сахарозы (рН 7.4) и хранили на льду.

рН-метрические исследования функционирования митохондрий проводили с помощью рН-метра ЛПУ-01, с регистрацией на самописце К-101 [6]. Все измерения проводились при температуре 28°C в ячейке объемом 2мл. Для исследований использовалась среда инкубации, содержащая 100 мМ сахарозы, KCl-50мМ, KH_2PO_4 -3мМ, трис-1,5мМ, митохондрии- 2,5-3 мг белка на 1мл. Белок определяли по методу Itzhaki [7]. В качестве субстрата окисления использовали сукцинат натрия в конечной концентрации 10 мМ, ADP добавляли в среду в количестве 300 мкмоль на пробу. СДГ активность изолированных митохондрий мозга, печени и сердца определяли феррицианидным методом [8]. Достоверность полученных результатов оценивали по критериям Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как видно из таблицы в исследованные сроки ГК нарушается способность изолированных митохондрий печени и сердца фосфорилировать добавленную ADP, причем в сердце эти нарушения выражены сильнее. Наибольшее снижение процессов фосфорилирования ADP в митохондриях обеих тканей происходит на 15 и 45 сутки ГК (в печени - 57,41 и 69,21%, в сердце - 80,41 и 68,79% соответственно). На 30 сутки ГК этот процесс нарушается в меньшей степени. Резкое подавление процессов фосфорилирования на 15 сутки ГК в митохондриях обеих тканей сопровождается повышением скорости фосфорилирования, что, возможно, следует рассматривать как компенсаторный ответ митохондрий на снижение эффективности окислительного фосфорилирования (см. табл.).

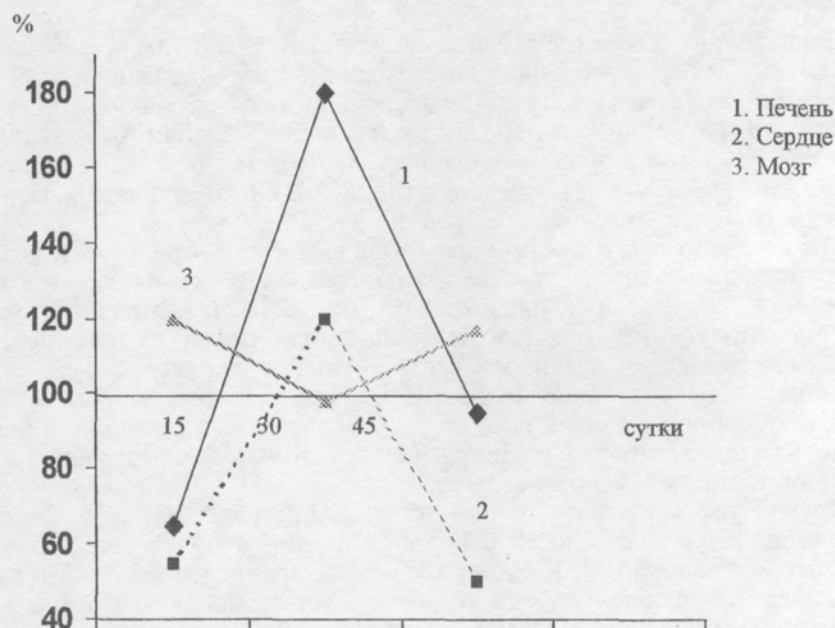
Таблица. Изменения в интенсивности фосфорилирования ADP в митохондриях печени и сердца при ГК и под влиянием ГАМК и пирацетама (мкг Н⁺/мин на 1 мг белка).

Условия опыта		Печень		Сердце	
		P/ADP	t _p	P/ADP	t _p
Контроль		59,58±2,57 (13)	86,15±3,30 (13)	114,2±11,06 (9)	48,33±2,5 (9)
Гипокинезия					
15 суток		25,41±1,18 (13) p<0,001	50,89±2,72 (13) p<0,01	22,36±0,9 (9) p<0,001	36,6±3,3 (9) p<0,02
30 суток		45,51±2,05 (13)	53,75±2,77 (13) p<0,001	38,04±2,60(9) p<0,001	70,0±8,37(9) δ<0,05
45 суток		18,35±14,07(13) δ<0,01	80,9±2,46 (13) p>0,5	35,62±1,12(9) p<0,001	104±2,0(9) p<0,001
Гипокинезия					
	15 суток	37,23±1,64 (10) p<0,001*	10,8±1,63 (10) p<0,001*	-	-
+ГАМК	30 суток	38,43±1,92 (12) p<0,05	24,58±1,87 (12) p<0,001	-	-
	45 суток	24,73±1,48 (10) p<0,2	29,67±3,17 (10) p<0,001	-	-
	15 суток	38,18±0,76(10) p<0,001	39,3±3,12 (10) p<0,001	-	-
+пирацетам	30 суток	32,44±1,58 (12) p<0,001	32,66±2,03 (12) p<0,01	-	-
	45 суток	36,96±3,17 (10) p<0,001	23,6±1,8 (10) p<0,001	-	-

Примечание: Значимость различий определяли при сравнении с ГК конкретного срока, в скобках - число опытов, P/ADP-фосфорилирование ADP, t_p - время фосфорилирования

Естественно предположить, исходя из хемиосмотической концепции Митчела, что причиной снижения синтеза АТФ в митохондриях сердца и печени в указанные сроки ГК является падение трансмембранного потенциала в результате нарушения окисления субстратов, активации протонных АТРаз. Ранее мы попытались выяснить роль Mg^{2+} -АТРазы митохондрий мозга и печени в подавлении процесса окислительного фосфорилирования при ГК в исследуемые сроки [9]. Однако обнаруженное нами несоответствие между степенью активации АТРаз и подавлением фосфорилирования ADP в исследуемые сроки, разнонаправленность в сдвигах этих показателей на 45 сутки ГК не дают основания считать, что изменения в активностях АТРаз митохондрий в прослеживаемые сроки ГК являются основной причиной подавления синтеза АТФ.

Учитывая важную роль окисления янтарной кислоты митохондриями в регуляции энергетики клетки в условиях стресса, мы в последующем изучили при ГК сдвиги в активностях СДГ митохондрий мозга, печени и сердца - важнейшего регуляторного фермента цикла Кребса [2]. Исследования показали (рис.), что на 15 и 45 сутки в митохондриях печени и сердца наблюдается выраженное торможение активности фермента, в то время как на 30 сутки наблюдается стимуляция. Анализ сдвигов в активностях СДГ митохондрий печени и сердца показал, что, несмотря на однонаправленность изменений в активностях фермента в исследуемые сроки, отмечаются разительные отличия в степенях активации и торможения СДГ на 30 и 45 сутки ГК.



Рисунок

Изменения в активностях сукцинатдегидрогеназы митохондрий тканей мозга, печени и сердца, * за 100% взята активность СДГ митохондрий тканей животных интактной группы

Одной из возможных причин различия в количественном ответе СДГ митохондрий печени и сердца при ГК являются особенности биологического статуса этих тканей. К ним относится разное содержание сукцината, АТФ, неодинаковое редокс-состояние фондов пиридиновых нуклеотидов и убихинона [10]. Так, Ахмеров и соавторы, изучая метаболические реакции митохондрий при стрессе, выявили тканеспецифический характер их ответа: в митохондриях сердца наблюдается преимущественное нарушение окисления янтарной кислоты, а в митохондриях печени - преимущественное нарушение окисления NAD-зависимых

МИТОХОНДРИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

субстратов [11]. По всей вероятности, с этих позиций нужно трактовать выявленную нами разную степень ингибирования и активации СДГ митохондрий печени и сердца в прослеживаемые сроки ГК. На правоту такой интерпретации полученных фактов указывают также сдвиги в активностях СДГ митохондрий мозга, которые заметно отличаются от сдвигов в активностях СДГ митохондрий печени и сердца (рис.). Аналогичные данные по снижению активности СДГ митохондрий мозга и сердца на 15 сутки ГК получили Курцер и соавторы, в то время как и на 28 сутки, согласно их данным, также наблюдается снижение активности ферментов [12]. Причем торможение активности СДГ при стрессе, вызванном ГК, авторы связывают не только с ростом в клетке количества щавелевоуксусной кислоты (естественного ингибитора фермента), но и с накоплением в тканях кортикостерона, угнетающего тканевое дыхание. Последний факт, несомненно, играет важную роль в нарушении процессов окислительного фосфорилирования в клетке при стрессе, ибо, согласно современным представлениям, "стресс представляет собой реакции в ответ на выброс катехоламинов, сменяющихся доминированием кортикостероидов, а затем, антагонистов адреналина - ацетилхолина и серотонина" [3].

Вскрытые отклонения в процессах преобразования энергии в митохондриях тканей, свидетельствующие о нарушениях в энергетическом обмене при ГК, обосновывают необходимость применения препаратов, нивелирующих негативное влияние хронического стресса. В качестве средств фармакологической коррекции выявленных сдвигов в системе фосфорилирования ADP мы избрали ГАМК и пирацетам.

Приведенные данные в таблице свидетельствуют о том, что введение ГАМК и пирацетама заметно улучшает показатели фосфорилирования ADP печени на фоне ГК. Так, если на 15 сутки ГК интенсивность фосфорилирования снижается на 56,62% по сравнению с контролем, то на фоне введения ГАМК этот показатель лишь на 36,4% ниже контроля. Обращает на себя также факт отсутствия резких колебаний в процессах фосфорилирования ADP под влиянием используемых ноотропов во все прослеживаемые сроки ГК.

Мы не располагаем достаточным количеством собственных и литературных данных о действии ноотропов на функциональное состояние митохондрий, в особенности, в условиях длительного ограничения движений, чтобы дать объяснение полученным фактам. На наш взгляд одной из причин, лежащей в основе сглаживания фазности в колебании исследуемых показателей функционального состояния митохондрий при ГК под влиянием ноотропов, является способность пирацетама подавлять дыхание митохондрий [13]. Авторы считают, что она лежит в основе повышения устойчивости организма к асфиксии, гипобарии и эмоциональному стрессу.

Другой из вероятных причин сглаживания колебаний в интенсивности фосфорилирования ADP в митохондриях печени в прослеживаемые сроки ГК может быть активация ГАМК-системы в результате введения ГАМК и пирацетама, приводящее к накоплению одного из конечных продуктов обмена ГАМК-γ-оксимасляной кислоты (ГОМК), в значительной степени предотвращающей активацию гипофизарно-адреналовой системы [14].

Таким образом, наши исследования свидетельствуют о том, что при длительном ограничении двигательной активности нарушается процесс интенсивности и скорости фосфорилирования ADP в митохондриях печени и сердца. Нарушения в процессах носят фазный характер и происходят на фоне торможения сдвигов в активностях СДГ митохондрий печени и сердца. Введение ГАМК и пирацетама животным при ограничении двигательной активности вызывает тенденцию к ослаблению выраженности отрицательного воздействия ГК на исследуемые митохондриальные процессы.

Мы полагаем, что изучение механизмов регуляции митохондриальных процессов ноотропами поможет внедрить их в состав лекарственных средств, корригирующих нарушения обменных процессов, вызванных длительным обездвиживанием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меерсон Ф. З. (1984). Патогенез и предупреждение стрессовых и ишемических повреждений сердца. М, Медицина.
2. Кондрашова М. Н. (1987). В кн. Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена. Пушино, с.140-155.
3. Кондрашова М. Н., Григоренко Е.В. (1985). Журнал общей биологии, 4, 516-526.
4. Комарин А.С., Азимова Ш. А. (1987). Вопросы мед. химии, 33, 4, 75-78.
5. Федоров И.В. (1984). Изменения метаболизма у животных при гипокинезии. Ярославль, 81-88.
6. Саакян И.Р., Саакян А.Г. (1998). Вопросы мед. химии, 44, (2), 151-157.
7. Itzhaki R., Gill D (1964). *Analyt.Biochem.*, 9, (4), 401-410
8. Ещенко Н.Д. (1982) В кн. Методы биохимических исследований Л., с. 210-212.
9. Акопян В.П., Соцкий О.П. и др. (1998) Вопросы мед., химии, 44, (3), 262-266.
10. Вольский Г.Г., Осадчая Л.М. (1976). Митохондрии. Транспорт электронов и преобразование энергии. М., Наука, с.164-178.
11. Ахмеров Р.Н., Саакян И. Р. (1973). В сб.: Биофизика живой клетки. Пушино, 4, 1, с.51-58.
12. Курцер Б.М., Зорькина Т.А. (1987). Патол. физиол. экспер.тер., №1, 11-13.
13. Каплан Е.Я., Расулов М.М. (1987). Фармакология, №1, 31-33
14. Меерсон Ф.З., Павлова В.И. (1981). Бюл. экспер. биол. и мед., XCI, №1, 23-24.

Поступила 01.06.00.

INFLUENCE OF GABA AND PYRACETAM ON MITOCHONDRIAL ADP PHOSPHORYLATION SYSTEM IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL HYPOKINESIA.

O.P. Sotckiy, V.P. Hakopyan, L.G. Jamgaryan, A.G. Jamgaryan

Department of Pharmacology, Yerevan State Medical University
Koryun st. 2, tel/fax (374 2) 582 532, (374 2) 151812

Long-term limitation of motor activity of male rats is accompanied by impairments of mitochondrial ADP phosphorylation in liver and heart. The most significant changes were observed after 15 and 45 days of hypokinesia. Administration of GABA and pyracetam to animals subjected to hypokinesia induced a tendency to "normalization" of ADP phosphorylation processes.

Key words: hypokinesia, mitochondria, SDH, ADP, GABA, pyracetam.