

КФЛ на 32%, постоянство которого имеет существенное значение для поддержания нормального течения ряда физиологических функций клетки. Во второй не было выявлено заметных сдвигов в уровне НФЛ и КФЛ и величине коэффициента НФЛ/КФЛ.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что длительное введение ЦБ приводит к выраженным изменениям соотношений между фосфолипидами, что чревато серьезными нарушениями в структурно-функциональных свойствах клеточных мембран и активности мембраносвязанных липидзависимых ферментов, в частности СДГ печени и сердца животных опытной группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е. Б., Джалыбова М. И., Гвахария В. О. и др. В кн.: Биоксигноокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. 113—141, М., 1982.
2. Вдовиченко Л. М. Биохимия, 38, 1, 22—27, 1973.
3. Карагезян К. Г. Лаб. дело. 1, 23—27, 1969.
4. Карагезян К. Г. Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. Ереван, 1972.
5. Крекс Е. М. Липиды клеточных мембран Л., 1981.
6. Саатов Т. С. Укр. биохим. ж., 53, 2, 44—51, 1981.
7. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
8. Соцкий О. П., Саркисова Г. М., Чухаджян Г. А. Биолог. ж. Армения, 38, 1, 25—28, 1985.
9. Соцкий О. П., Саркисова Г. М., Чухаджян Г. А. Ж. exper. и клинич. медицины, 25, 6, 541—546, 1985.
10. Флауэрс Г. М. В кн.: Методы исследования углеводов 314—348, М., 1975.
11. Kanfer J. J. Biol., Chem., 240, 2, 609—612, 1965.
12. King T. Methods in Enzymology, 10, 322—324, 1967.
13. Lowry O., Rosenbrought N., Farr O., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1950.
14. Santiago E., Lopes—Worotulla N., Segovia J. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 33, 2, 439—446, 1973.
15. Vance D., Sweeley Ch. J. Lipid Res., 5, 621—630, 1967.

Поступило 27.III 1986 г.

Биолог. ж. Армения, т. 40, № 7, 554—559, 1987

УДК 612.171:612.741

ДЕЙСТВИЕ ВЕРАПАМИЛА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИОФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ МИОКАРДА

М. А. КАПФАДЖЯН

Институт кардиологии МЗ Армянской ССР им. Л. А. Оганесянц, Ереван

Аннотация — Показано, что верапамил в присутствии ионов Ca^{2+} действует «разобщающе» на процесс комплексообразования актомиозина и его ферментативную способность: активирует суперреципитацию и тормозит АТФ-азную реакцию. Неоднозначный характер модуляции верапамилем этих параметров на фоне различных рСа указывает на то, что ингибирование протекает по аллостерическому типу. Предполагается, что верапамил связывается на специфическом, отличном от Ca^{2+} -связывающего, участке белка.

Անտագոնիստ — Վերապամիլը Ca^{2+} ներկայությունը ակտիվացնում է ակտոմիոզինի ֆոսֆորիլացմանը ԱՏՖ-ի հետ (սուպերպրեցիպիտացիայի էրեոլիզը) և արգելակում է նրա ֆերմենտային ակտիվությունը (ԱՏՖ-ազային ակտիվությունը), Վերապամիլի ներգործության աստիճանը կախված է Ca^{2+} բանակից միջազգայնում և ունի ալլոստերիկ բնույթ: Ենթադրվում է, որ վերապամիլը կապվում է ակտոմիոզինի կազմում գտնվող Ca^{2+} -կապող սպիտակուցների հետ, բայց նրանց մոլեկուլի այն տեղամասում, որտեղ չի կապվում Ca^{2+} -ը:

Abstract — It is shown that verapamil in the presence of Ca ions influences „disconnectively“ the process of actomyosin complex formation and its enzymatic capacity: It activates superprecipitation and inhibits ATPase reaction. Disparate character of modulation of these parameters by verapamil on the background of different pCa shows that inhibiting proceeds by allosteric type. It is supposed that verapamil is bound on the specific, different from Ca^{2+} -binding, protein site.

Ключевые слова: Ca^{2+} -антагонисты (верапамил), актомиозин, суперпреципитация, АТФаза, Ca^{2+} -связывающие белки.

Несмотря на широкое использование Ca^{2+} -антагонистов в кардиологической практике, молекулярный механизм их действия на миокард остается недостаточно изученным [8, 12]. Известно, что специфическим эффектом этих соединений является угнетение медленного входа ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты через деполяризованную мембрану и уменьшение медленной фазы потенциала действия [6]. Благодаря липофильности, эти соединения, кроме мембраностабилизирующего действия [3], могут взаимодействовать также с внутриклеточными структурами, ответственными за регуляцию концентрации ионов Ca , а также с Ca^{2+} -связанными белками миофибрилл [5]. Однако сведения о взаимодействии Ca^{2+} -антагонистов с сократительными белками весьма малочисленны. На изолированных волокнах миокарда крыс было показано отсутствие влияния верапамила на величину развиваемого напряжения в присутствии излишка ионов Ca в среде [7]. С другой стороны, результаты, полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют о том, что Ca^{2+} -антагонисты, а также β -блокаторы способны взаимодействовать с Ca^{2+} -связывающими компонентами комплекса миофибриллярных белков [14], причем показано отсутствие эффекта верапамила на АТФазу актомиозина при удалении Ca^{2+} -связывающих компонентов из его состава [1].

Таким образом, дальнейшее изучение возможности прямого влияния верапамила на сократительный аппарат может расширить наши представления, не только о внутриклеточных путях его действия, но также о специфичности его проявления на белково-липидные структуры, участвующие в транспорте ионов Ca через клеточную мембрану.

В настоящей работе представлены результаты исследования механизмов действия верапамила на структурно-функциональные параметры актомиозина, содержащего Ca^{2+} -связывающие регуляторные белки.

Материал и методика. Нативный актомиозин (НАМ) получали из левого желудочка миокарда белых крыс-самцов (200—230 г) по модифицированному методу [13]. Чистоту белковых препаратов проверяли электрофоретически в 10% ПАГ—ДСН [15]. Концентрацию белка определяли по Лоури и спектрофотометрически.

Синхронную регистрацию параметров реакции суперреципитации (СПР) и Mg^{2+} -АТФазы производили на собранной в лаборатории установке [4]. Использовали состав инкубационной смеси: 1 мг/мл НАМ; 0,01 мМ $MgCl_2$; 0,1 мМ АТФ; 0,15 мМ KCl ; 0,02 М Трис- HCl ; 4 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,01 мМ EGTA; pH 7,35; $t = 25^\circ C$. При использовании растворов Ca^{2+} в концентрации ниже 10^{-6} М применяли 1 мМ Ca^{2+} /EGTA буфер. Степень кооперативности АТФазной реакции рассчитывали по уравнению Хилла [10].

Результаты и обсуждение. В отсутствие ионов Ca верапамил вызывает растормаживающий эффект как на скорость реакции СПР, так и на Mg^{2+} -АТФазу НАМ, т. е. действует подобно Ca^{2+} . Сходство это выражается также в положительной кооперативности изменения АТФазной реакции в зависимости от концентрации верапамила, что характеризуется ярко выраженной сигмовидной кривой (рис. 1а). Степень

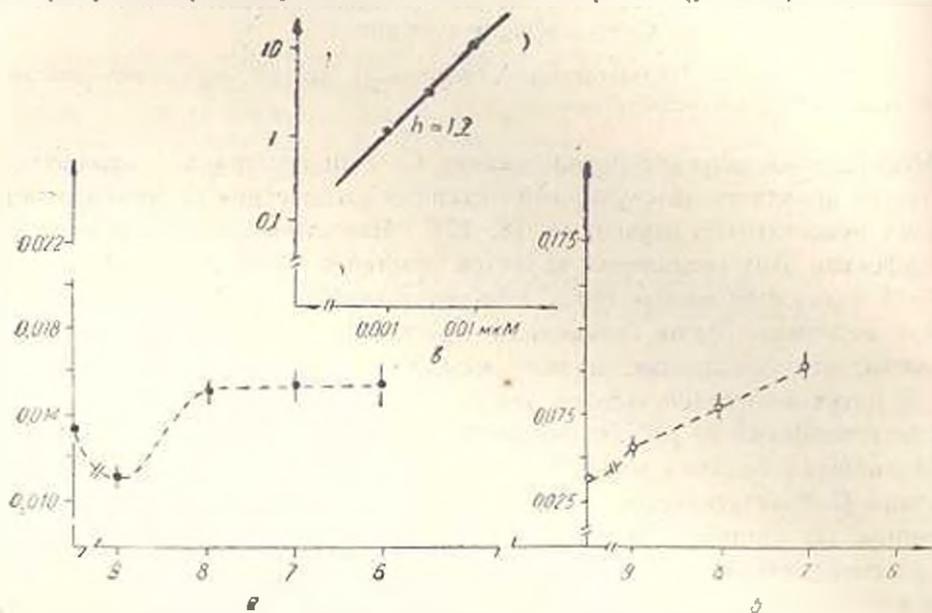


Рис. 1. Зависимость Mg^{2+} -АТФазы (а) и $V_{СПР}$ (б) НАМ миокарда белой крысы от различных концентраций верапамила. Степень кооперативности АТФазной реакции (в). По оси ординат — $mg^{-1} s^{-1}$ (а); $\Delta O_2/s$ (б);

$$\frac{V}{1/2 V_{max} - V} \quad (в); \text{ по оси абсцисс — } [Ca] \text{ м}^{-1} \text{ верапамил.}$$

кооперативности реакции АТФазы НАМ в области $pCa \ 7 \div 4$, соответствующая $h = 1,5$ [1], в присутствии верапамила соответствует $h = 1,2$. Это свидетельствует о наличии по крайней мере одного специфического участка связывания верапамила на макромолекуле НАМ.

Способность комплексобразования миозина с актином возрастает при увеличении концентрации верапамила от 0,001 до 0,1 мкМ в среде примерно в 4 раза (рис. 1б). Такое значительное возрастание степени комплексобразования позволяет предположить, что верапамил, взаимодействуя с тропонин-тропомиозиновым комплексом, устраняет их тормозящий эффект.

Низкие концентрации ионов Ca ($pCa 7$ и $pCa 6$) не изменяют степени положительной кооперативности протекания реакции гидролиза

АТФ актомиозином в присутствии различных концентраций верапамила (рис. 2а). Сигмоидная форма кривых АТФазы НАМ сохраняется при pCa 7 и pCa 6. Причем при изменении концентрации Ca^{2+} на порядок активация АТФазы возрастает в равной степени в пределах концентрации верапамила $10^{-9} \div 10^{-7}$ М. Однако при использовании насыщающих концентраций Ca^{2+} (pCa 5 и pCa 4) эффект верапамила резко изменяется (рис. 2б), т. е. наблюдается торможение АТФазы НАМ.

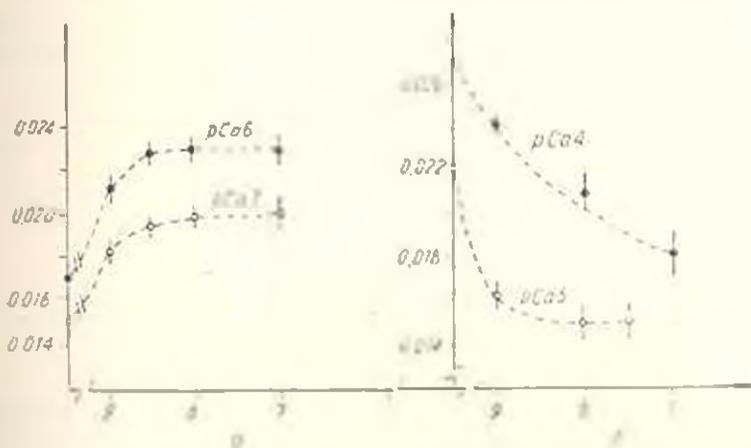


Рис. 2 Зависимость Mg^{2+} -АТФазы НАМ миокарда крысы от различных концентраций верапамила на фоне pCa 7÷6 (а) и pCa 5÷4 (б). По оси ординат — $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, по оси абсцисс — $\mu\text{g} \cdot \text{M}^{-1}$ верапамил.

Как известно, на регуляторном белковом комплексе сократительного аппарата, в частности, на тропонине С имеются два типа независимых друг от друга специфических участков связывания Ca^{2+} : характеризующиеся константой связывания $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ участки первого класса и участки второго класса с константой связывания $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ [11]. Возможно, верапамил, взаимодействуя с низкоаффинными участками связывания Ca^{2+} , способен в присутствии этого иона оказывать тормозящее действие. С другой стороны, специфически связываясь с тропонином, он может вызывать конформационные изменения, приводящие к стерической блокаде модуляторных белков и торможению процесса сокращения. Однако на основании полученных результатов допустимо предположение, что верапамил не конкурирует с Ca^{2+} за один и тот же участок, а связывается со специфическим участком макромолекулы.

Из рис. 3а видно, что эффект верапамила на комплексообразование актин-миозина сильно зависит от концентрации Ca в среде. При низких концентрациях верапамила, $10^{-7} \div 10^{-8}$ М, наблюдается снижение скорости реакции СПП, тогда как более высокие концентрации его вызывают повышение скорости актин-миозинового взаимодействия. Такая концентрационная зависимость отмечается в присутствии pCa 7÷6, т. е. когда не насыщены низкоаффинные участки связывания Ca . Насыщающие концентрации Ca^{2+} вызывают противоположный эффект, характеризующийся торможением скорости реакции СПП при увеличении в среде концентрации верапамила в пределах $10^{-9} \div 10^{-7}$ М (рис. 3б).

На основании полученных результатов можно заключить, что верапамил в присутствии ионов Ca действует на процесс комплексобразования актомиозина и его ферментативную активность противоположным образом: активирует суперпреципитацию и тормозит АТФазную реакцию. Таким образом, в случае проникновения в кардиомиоциты верапамил, связываясь с Ca-регуляторными белками комплекса тропони-

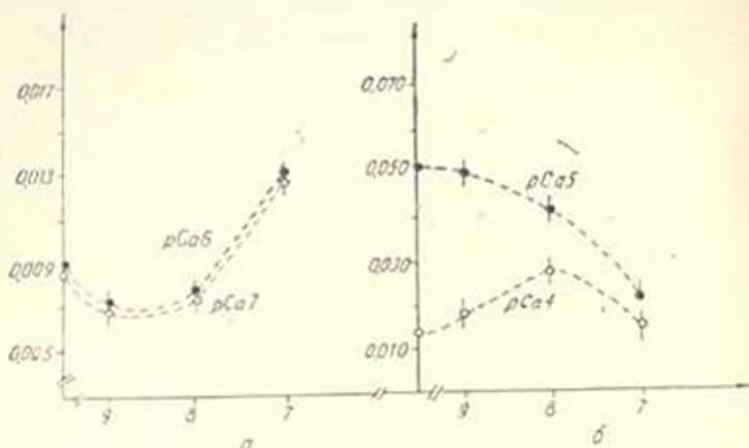


Рис. 3. Зависимость V_{max} НАМ миокарда крысы от различных концентраций верапамила на фоне pCa 7-6 (а) и pCa 5-4 (б). По оси ординат— $\Delta OP/s$; по оси абсцисс— $\lg M^{-1}$ верапамила.

тропомиозина, может взаимодействовать с низкоаффинными участками связывания Ca^{2+} , выступая в роли аллостерического ингибитора актомиозиновой АТФазы. Снижение АТФазной реакции миофибрилл в данном случае может служить дополнительным фактором сохранения внутриклеточного уровня АТФ, что в свою очередь имеет значение в поддержании уровня внутриклеточного Ca [9] и регуляции обмена веществ. По всей вероятности, именно таким путем верапамил предотвращает изменения в генетическом аппарате кардиомиоцитов, устраняя замену изоформ миофибрилллярных белков в условиях ишемии и компенсаторной гипертрофии миокарда [2].

Полученные результаты свидетельствуют о возможном существовании внутриклеточного пути действия верапамила—через модуляцию функции сократительного аппарата миокарда.

С другой стороны, полученные факты позволяют выявить эффект аллостерического регулирования верапамилем функции Ca^{2+} -связывающих белков в потенциалзависимых ионных каналах, участвующих в трансмембранном переносе этого важнейшего для кардиомиоцитов двухвалентного иона

ЛИТЕРАТУРА

1. Кайфаджян М. А. Автореф. канд. дисс., 24, Ереван, 1985.
2. Кайфаджян М. А., Джалаловян Е. Г., Замиян Т. С., Самвелян В. М., Огансян С. С. Бюлл. эксперим. биол. мед., 1, 46-48, 1986.
3. Мхитарян Л. С., Рожкова С. Тез. докл. III Сессии по изучению сердца, 177, Баку, 1986.

4. Тихунов Б. А., Каифаджян М. А., Оганесян С. С. Косм. биол., 5, 60—64, 1985.
5. Boström B., Ljung S., Mordth S., et al. Nature, 292 777—778, 1981.
6. Kothari M., Baner B., Krause H., Fitekenstein A. Pflug. Arch. Gen. Physiol., 335, 309—321, 1972.
7. Kentish J. C., Nayler W. J. Physiol., 284, 90, 1978.
8. Mc. Cluskey F. W., Fox A. P., Feldman D., Ysten R. W. J. Expt. Biol., 124, 177—190, 1986.
9. Nayler W., Pool—Wilsom Ph. Basic Res. Cardiol., 76, 1—15, 1981.
10. Pash H. T., England P. J., Prys Roberts C. J. Mol. Cell. Cardiol., 293, 13, 301, 1981.
11. Potter J., Gergely J. J. Biol. Chem., 250, 4628—4633, 1975.
12. Rongasani A., Plasienski J., Hasey M. Biochem. and Biophys. Research Comm. 26, 1—7, 1985.
13. Shoub M., Hartshorne D., Perry S. Biochem. J., 144, 263, 1967.
14. Oganessyan S. S., Barinyan S. B., Gevorgyan R. A., Davtyan I. S., Kaifad-
jyan M. J. Advances in Myocardiology, 439—454, 1982.
15. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4406, 1969.

Поступило 20.11 1987 г.

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНЯХ КРЫС

Л. Б. БУРНАЗЯН, А. В. АРТУНЯН, И. О. МОВСЕСЯН,
М. Г. УРГАНДЖЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, лаборатория азотистого обмена, Ереван

Аннотация — Тиреоидные гормоны и кортикостероиды принимают участие в регуляции активности малатдегидрогеназы. Активность митохондриального фермента в печени и почках на 12-м ч после введения кортикостероидов возрастает в 2—3 раза и постепенно снижается к 48-му часу. Аналогичные изменения наблюдаются в активности митохондриальной малатдегидрогеназы в мозге. Тиреоидные гормоны ингибируют активность малатдегидрогеназы как в митохондриальной, так и растворимой фракции мозга, а в печени и почках наблюдается как повышение активности фермента, так и отсутствие эффекта. ТГ и КС влияют на содержание множественных форм МДГ в мозге и почках.

Անոտացիա — Թիրեոիդ հորմոնները և կորտիկոստերոիդները մասնակցում են մալատդեհիդրոգենազների ակտիվության կարգավորմանը: Կորտիկոստերոիդների ներարկումից 12 ժամ հետո առնետի լյարդում և երիկամներում միտոքոնդրիալ ՄԳՁ ակտիվությունը բարձրացել է 2—3 անգամ, իսկ մինչև 48-րդ ժամը նկատվել է ակտիվության աստիճանական նվազեցում: նման փոփոխություններ տեղի են ունեցել նաև Լ-ՄԳՁ ակտիվության հետ ուղեղում: Առնետի ուղեղի լուծելի և միտոքոնդրիալ ֆրակցիաներում ՄԳՁ ակտիվությունը արգելակվել է Թիրեոիդ հորմոնների ներկայությամբ, իսկ երիկամներում և լյարդում կամ փոփոխության չի նկատվել, կամ էլ տեղի է ունեցել ֆերմենտի ակտիվության բարձրացում: Թիրեոիդ հորմոնները և կորտիկոստերոիդները ազդում են առնետի ուղեղի և երիկամների ՄԳՁ ստրերը մոդիկոլյար ձևերի պարունակության վրա:

Abstract — Thyroid hormones and corticosteroids take part in the regulation of malate dehydrogenase activity. Administration of CS enhances to 2-3 fold mMDH activity in liver and kidney. In 12 hours, the enzyme ac-