

# NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназная активность в тканях крыс при экспериментальном миокардите

Л.А.Симонян, А.А.Симонян, А.А.Енгибарян, Р.Ш.Матевосян, И.Г.Батикян

Институт биохимии им.Г.Х.Бунятыана НАН РА, ЕргМУ им. М.Гераци,  
375025, Ереван, ул.Корюна, 2

**Ключевые слова:** NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназная активность, миокардит, митохондрии, цитоплазма

В литературе довольно скудно освещены особенности влияния гормонов мозгового слоя надпочечников на сдвиги активности отдельных дегидрогеназ и, в особенности, изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) при теофиллин-адреналовом миокардите.

Регуляторные механизмы цикла трикарбоновых кислот имеют важное биологическое значение для адаптации организма при патологических нарушениях. К числу реакций, лимитирующих скорость этого цикла, относится окисление и декарбоксилирование изоцитрата, катализируемые ИЦДГ. В тканях существует две ИЦДГ, характеризующиеся особенностями их коферментной специфичности и кинетическими свойствами, а также спецификой их локализации и функциональной активности. NAD-зависимая ИЦДГ (КФ 1.1.1.41) локализована исключительно в митохондриальной фракции, а NADP-ИЦДГ (КФ 1.1.1.42), обнаруженная как в цитоплазме, так и в митохондриях [10, 14], существует в мономерной и димерной формах [11] с неодинаковым профилем функционирования в реакциях клеточного метаболизма. Основная функция цитоплазматической NADP-ИЦДГ обуславливает генерирование NADPH, необходимое для различных биосинтетических процессов. Участие же митохондриальной NADP-ИЦДГ в энергетическом метаболизме опосредовано через NADP:NAD трансгидрогеназную (NADP:NAD-оксидоредуктаза, КФ 1.6.1.1.) реакцию [15].

В представленной работе приведены результаты наших исследований по изучению изменений каталитической активности NADP-ИЦДГ при теофиллин-адреналовом повреждении миокарда в субклеточных образованиях сердца, мозга и печени и действие на этом фоне  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha$ -ТФ) и нуклеината натрия.

## Материал и методы

Опыты ставили на белых беспородных крысах-самцах массой 120–140 г. Миокардит воспроизводили однократным внутримышечным введением 1% раствора теофиллина в течение 1,5 мин из расчета 20 мг/кг массы. Через 2 мин после инъекции теофиллина медленно (в течение трех минут) вводили 0,2 мл 0,1% раствора адреналина гидрохлорида. За час до инъекции вводили  $\alpha$ -ТФ и нуклеинат натрия в количестве 2 и 25 мг/кг массы. Животных забивали через день под легким эфирным наркозом [3,5]. Сердечную ткань гомогенизировали в 0,44 М сахарозе с 1 мМ ЭДТА, pH 7,4. Субклеточные фракции миокарда выделяли методом дифференциального центрифугирования: ядерную фракцию – при 2500, митохондриальную – при 12000 г (15 мин). Изолированные митохондрии разрушали 0,2% раствором тритона-X-100 и центрифугировали при 45000g для осаждения митохондриальных мембран. Полученный при этом супернатант был использован в эксперименте в качестве митохондриальной фракции. Цитоплазматическую фракцию получали центрифугированием постмитохондриального супернатанта при 100.000 g [16].

Активность NADP-ИЦДГ определяли в среде следующего состава (в мМ): трис-HCl буфер – 50 (pH 8,5),  $MnCl_2$  – 2, ЭДТА – 0,2, АДР – 1, изоцитрат – 2 [7]. Критерием активности NADP-ИЦДГ являлось образование восстановленной формы кофермента, спектрофотометрическое определение которой проводили при длине волны 340 нм на аппарате СФ с выражением активности мкмоль NADPH/мг белка в мин. Белок определяли биуретовым методом [13]. Достоверность фактического материала проверялась методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера [1].

## Результаты и обсуждение

Результаты исследований, приведенные в табл.1, свидетельствуют, что NADP-ИЦДГ активность в митохондриальной фракции миокарда значительно пре-

валирует над таковой в цитоплазме. При теofilлин-адреналовом миокардите, по сравнению с контролем, активность фермента повышается приблизительно на 56%, а при совместной инъекции теofilлин-адреналина и  $\alpha$ -ТФ этот сдвиг возрастает до 125%.

Таблица 1

Активность NADP-ИЦДГ в сердце крыс при теofilлин-адреналовом миокардите  
(мкмоль NADPH / мг белка / мин), n=12

| Условия опыта   | Цитоплазма             | Прирост активности в % | Митохондрии            | Прирост активности в % |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Контроль  | 0,081±0,009            |                        | 0,102±0,004            |                        |
| Теofilлин + адреналин                                   | 0,127±0,001<br>P<0,001 | 56                     | 0,149±0,005<br>P<0,001 | 46                     |
| Теofilлин + адреналин + $\alpha$ -ТФ                    | 0,183±0,001<br>P<0,001 | 125                    | 0,350±0,007<br>P<0,001 | 243                    |
| Теofilлин + адреналин + нуклеинат натрия                | 0,109±0,001<br>P<0,01  | 34                     | 0,156±0,002<br>P<0,001 | 52                     |
| Теofilлин + адреналин + $\alpha$ -ТФ + нуклеинат натрия | 0,078±0,003<br>P<0,05  |                        | 0,093±0,003<br>P<0,05  |                        |

При комбинированном введении теofilлин-адреналина и нуклеината натрия наблюдающееся повышение активности NADP-ИЦДГ уступает предыдущему, а комплексное сочетанное введение теofilлин-адреналина,  $\alpha$ -ТФ и нуклеината натрия характеризуется понижением активности фермента до уровня контрольных величин. Аналогичный сдвиг под действием теofilлин-адреналина на активность NADP-ИЦДГ был констатирован и в митохондриальной фракции миокарда (табл.1). Здесь совместное введение теofilлин-адреналина и  $\alpha$ -ТФ характеризуется более чем трехкратным повышением активности фермента по сравнению с контролем. В митохондриях, как и в цитоплазме, при комплексном введении теofilлин-адреналина,  $\alpha$ -ТФ и нуклеината натрия активность фермента остается на уровне контрольных показателей.

Данные, приведенные в табл.2, показывают, что в условиях нашего эксперимента теofilлин-адреналин не вызывают каких-либо изменений в каталитической активности NADP-ИЦДГ в цитоплазме ткани мозга, что повторяется и при комбинированном введении с  $\alpha$ -ТФ или с нуклеинатом натрия.

Однако при использовании этого сочетания на фоне теofilлин-адреналового повреждения кардиомио-

цитов активность NADP-ИЦДГ подавляется почти в 2 раза. Примечательно, что одновременное изучение активности NADP-ИЦДГ в цитоплазматической фракции ткани мозга позволяет констатировать ее значительное понижение по сравнению с таковой в миокарде и печени.

Сдвиги в активности NADP-ИЦДГ в цитоплазме печени, приведенные в табл.3, демонстрируют некоторое повышение (на 11%) активности NADP-ИЦДГ под влиянием теofilлин-адреналина. При совместном введении теofilлин-адреналина и  $\alpha$ -ТФ прирост активности фермента колеблется в пределах 56%, а отдельное применение нуклеината натрия подавляет активность фермента по сравнению с исходным уровнем. Совместное введение теofilлин-адреналина,  $\alpha$ -ТФ и нуклеината натрия подавляет активность фермента более чем в три раза.

Таблица 2

Активность NADP-ИЦДГ в мозге крыс при теофиллин-адреналовом миокардите (мкмоль NADPH / мг белка / мин), n = 8

| Условия опыта                                 | Цитоплазма  |
|---|-------------|
| Контроль                                      | 0,013±0,001 |
| Теофиллин+адреналин                           | 0,013±0,001 |
| Теофиллин+адреналин + α-ТФ                    | 0,015±0,002 |
| Теофиллин+адреналин+нуклеинат натрия          | 0,13±0,002  |
| Теофиллин+адреналин + α-ТФ + нуклеинат натрия | 0,007±0,001 |

Таблица 3

Активность NADP-ИЦДГ в печени крыс при теофиллин-адреналовом миокардите (мкмоль NADPH / мг белка / мин), n = 8

| Условия опыта                                | Цитоплазма             | Прирост активности в % |
|--|------------------------|------------------------|
| Контроль                                     | 0,11±0,004             |                        |
| Теофиллин+адреналин                          | 0,124±0,003<br>p<0,025 | 11                     |
| Теофиллин+адреналин + α-ТФ                   | 0,174±0,009<br>p<0,001 | 56                     |
| Теофиллин+адреналин +нуклеинат натрия        | 0,103±0,002<br>p<0,005 |                        |
| Теофиллин+адреналин + α-ТФ +нуклеинат натрия | 0,032±0,002<br>p<0,001 |                        |

Таким образом, при теофиллин-адреналовом повреждении миокарда в сердце и печени формируется однотипность в картине становления энзиматической активности NADP-ИЦДГ. Введение теофиллин-адреналина способствует ее заметному повышению, а в сочетании с α-ТФ – еще большему проявлению этого эффекта. Согласно нашим наблюдениям, нуклеинат натрия заметно подавляет активность фермента, что не коррелирует при комбинированном воздействии теофиллин-адреналина с α-ТФ. Полученные нами результаты показывают неодинаковую степень влияния теофиллина и адреналина на энзиматическую активность кардиомиоцитов в исследованных цитоплазматических образованиях сердца, печени и мозга.

Наиболее глубокие функциональные перестройки активности фермента наблюдаются в сердце и печени, а в ткани мозга этот сдвиг прослеживается только при совместном введении теофиллина-адреналина, α-ТФ и нуклеината натрия. Выявленные изменения в активности NADP-ИЦДГ, вызванные теофиллином и адреналином, свидетельствуют об активном участии этого фермента в осуществлении связи между промежуточными компонентами цикла Кребса и другими звеньями промежуточного обмена при повреждении кардиомиоцитов.

Согласно литературным данным [2,8], через час после моделирования экспериментального инфаркта миокарда во внеинфарктной зоне левого желудочка наблюдается понижение активности отдельных ферментов цикла трикарбоновых кислот. Эти сдвиги компенсируются активностью анаэробных процессов утилизации гликогена и заметным истощением его запасов в ишемизированных участках миокарда [6,9]. При этом, как показывают результаты наших экспериментов, наблюдается заметное активирование NADP-ИЦДГ по сравнению с контролем. В митохондриальной фракции поврежденного теофиллин-адреналином сердца NADP-ИЦДГ активность оказывается намного выше по сравнению с цитоплазматической, что свидетельствует об активизации гидрогеназной реакции, являющейся компенсаторным механизмом для выхода организма из тяжелого патологического состояния.

С другой стороны, в этих условиях имеет место заметное повышение энзиматических функций цитоплазматической NADP-ИЦДГ, связанных с генерированием NADPH, необходимым для различных биосинтетических реакций. Выявленные в наших исследованиях сдвиги в активности NADP-зависимой ИЦДГ, по-видимому, являются частью тех компенсаторных перестроек, которые формируются в поврежденном миокарде в общем комплексе компенсаторно-приспособительной функции организма в экстремальных условиях.

Немаловажно отметить, что, по нашим данным, на фоне теофиллин-адреналового повреждения кардиомиоцитов нуклеинат натрия выступает в роли достоверного активатора как цитоплазматической, так и митохондриальной NADP-ИЦДГ. Приемлемым объяснением этого факта может служить роль адениннуклеотидов, выступающих в качестве молекулярных регуляторов, оказывающих свое действие на активность ключевых ферментов метаболизма [9], что имеет исключительно важное значение при перегрузке миокарда в условиях его повреждения и сопровождающегося дефицитом в нем макроэргов, расстройствами деятельности генетического аппарата с интенсификацией процессов биосинтеза ДНК, РНК и различных белков [4,12].

Поступила 11.05.01

## NADP –կախյալ իզոցիտրատի դեհիդրոգենազային ակտիվությունը առնետների հյուսվածքներում փորձարարական միոկարդիտի ժամանակ

Լ. Ա. Սիմոնյան, Ա. Ա. Սիմոնյան, Ա. Ա. Ենգիբարյան, Ն. Շ. Մաթեոսյան, Ի. Ն. Բատիկյան

Ուսումնասիրվել են ՆԱԴՖ–կախյալ իզոցիտրատ դեհիդրոգենազի (ԻՅԴՀ) ֆերմենտային ակտիվության տեղաշարժերը առնետի տարբեր հյուսվածքներում՝ սրտամկանի թեոֆիլին-ադրենալինային վնասվածքի (միոկարդիտի) դեպքում և  $\alpha$ -տոկոֆերոլի ու նատրիում նուկլեինատի ազդեցությունը այդ փոփոխությունների պայմաններում: Յուրջ է տրվել, որ սրտամկանի թեոֆիլին-ադրենալինային ախտահարման դեպքում ՆԱԴՖ-ԻՅԴՀ-ի ակտիվությունը սրտի և լյարդի

բջջների ինչպես ցիտոպլազմայում, այնպես էլ միտոքոնդրիումներում աճում է: Առնետներին համատեղ թեոֆիլին-ադրենալին և  $\alpha$ -տոկոֆերոլ կամ նատրիում նուկլեինատ ներարկելիս սրտամկանի ուսումնասիրված ֆրակցիաներում ֆերմենտի ակտիվությունը հավաստիորեն բարձրանում է ստուգիչ խմբի համեմատությամբ, սակայն օգտագործված նյութերի միաժամանակյա ներարկումը նշանակալիորեն ճնշում է սրտամկանի ԻՅԴՀ-ի ակտիվությունը:

### NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity in rat tissues at experimental myocarditis

L.A.Simonyan, A.A.Simonyan, A.A.Yengibaryan,  
R.Sh.Matevosyan, I.H.Batikyan

There were studied NADP-dependent deviations of isocitrate dehydrogenase (ICDH) enzyme activity in different tissues of rats during theophyllin-adrenalin damaging (myocarditis) and under the action of  $\alpha$ -tocopherol and Na-nucleinate.

We have shown that in myocardium during theophyllin-adrenalin damaging the activity of the NADP-ICDH in

heart and liver cell cytoplasm and mitochondria increased. Simultaneous injection of theophyllin-adrenalin,  $\alpha$ -tocopherol and Na-nucleinate significantly increases the activity of the studied enzymes compared to the control. However, simultaneous injection of all drugs significantly decrease ICDH activity in the myocardium.

### Լիտերատուրա

1. *Бессмертный Б.С.* Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М., 1967.
2. *Вихерт А.М., Черпаченко Н.М.* Тер. арх., 1981, 4, с.38.
3. *Гичка С.Г.* Врачебное дело. 1985, 8, с.27.
4. *Енгибарян А.А., Акопян В.П., Карагезян К.Г.* Комбинированная антиоксидантная терапия при коронаро-окклюзионном инфаркте миокарда. Ереван, 1994.
5. *Матевосян Р.Ш., Амагуни В.Г., Сисакян С.А., Аракелян И.Г.* Биол. ж. Армении, 1989, т. 42, 8, с. 767.
6. *Меерсон Ф.З., Коц Я.М., Волович В.Б., Алешин И.А. и др.* Кардиология, 1989, 39, 6, с. 53.
7. *Прохорова М.И., Путилина Ф.Е., Ещенко Н.Д.* В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1974, с. 211.
8. *Черпаченко Н.М., Афонская Н.И., Острогорский Ю.М. и др.* Кардиология, 1982, 22, 11, с. 49.
9. *Юськович А.К., Серова И.В., Вахляев В.Д., Марголас Л.Б. и др.* Кардиология. 1989, 2, с. 61.
10. *Carlier M.F., Pantaloni D.* Eur. J. Biochem., 1973, 37, 2, p. 341.
11. *Dalziel K.* FEBS Lett., 1980, 117, p. 45.
12. *Fizel A., Fizelova A.* Mol. Cardiol., 1971, 2, p.187.
13. *Itzhaki R.F., Gill D.M.* Analyt. Biochem., 1964, 9, p. 401.
14. *Loverde A.W., Lehrer G.H.* J. Neurochem., 1973, 20, p. 441.
15. *Stem A.M., Stem J.H., Kirkman S.K.* Biochemistry, 1967, 6, 5, p. 1370.
16. *Watanabe T., Goto H., Ogasawara N.* Biochem. Biophys. Acta, 1974, 358, p.240.