

ВЛИЯНИЕ ИЗОПРЕНАЛИНА НА УРОВЕНЬ КОФЕРМЕНТА А И КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ АЦИЛ-КоА В МИОКАРДЕ ЖИВОТНЫХ

Д.С. Дорофей, П.М. Королёв, к.м.н.; В.А. Гуринович, к.б.н.

**ГУ «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и
биохимии Национальной академии наук Беларуси»**

В эксперименте на крысах-самцах линии Wistar весом 230-270 г выявлен эффект изопреналина, который в дозе 10 мг/кг массы тела при подкожном введении дважды с интервалом в 24 ч приводит к дисбалансу фракций КоА в митохондриях миокарда животных, что выражается в падении уровня малонил-КоА, а также в увеличении уровня КоА-SH и соотношения КоА-SH/ацетил-КоА.

Ключевые слова: изопреналин, миокард, ВЭЖХ, КоА-SH, короткоцепочечные ацил-КоА.

The experiments on Wistar male rats weighting 230-270 g were carried out to reveal the effect of isoprenaline. If isoprenaline was administered subcutaneously at a dose of 10 mg/kg b.w. twice at an interval of 24 h, it cause an imbalance in CoA fractions in animal myocardium mitochondria, manifest the decreased level of malonyl-CoA as well as the increased concentration ratio of CoA-SH and CoA-SH/acetyl-CoA.

Key words: isoprenaline, myocardium, HPLC, CoA-SH, short-chain acetyl-CoA.

Введение. Изопреналин [изопротеренол; L-β-(3,4-дигидроксифенил)-α-изопропиламиноэтанол гидрохлорид] – блокатор β-адренергических рецепторов, вызывает метаболические и морфологические нарушения в миокарде экспериментальных животных. Действие изопреналина связано с некротическим повреждением и увеличением перекисного окисления липидов в кардиомиоцитах, что оказывает существенное влияние на патогенез и развитие дисфункции миокарда [7]. Кроме того, в левом желудочке миокарда отмечено статистически достоверное снижение уровня АТФ и повышение МДА при назначении изопреналина [9]. По действию изопреналин сходен с изадрином (новодрином), при введении которого у животных на уровне целостного организма наблюдаются снижение физической работоспособности, изменения в структуре индивидуального поведения, увеличивается частота дыхания и частота сердечных сокращений (тахикардия) [5, 11].

Энергетическое обеспечение сокращений миокарда осуществляется высокоэффективной внутримитохондриальной системой кардиомиоцитов, где необходимым звеном в осуществлении цепочки метаболических превращений является система кофермента ацетилирования (КоА) [1, 3, 4]. Целью данного исследования явилось изучение в миокарде животных влияния изопреналина на уровень внутриклеточных метаболитов – КоА и некоторых его короткоцепочечных ацил-производных, участвующих в биоэнергетических реакциях [10]. С учётом высокой регуляторной активности соотношения свободного КоА (КоА-SH) и короткоцепочечных ацил-КоА [3] представляется важным оценка структуры фракций кофермента при введении изопреналина.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проведён на крысах-самцах линии Wistar весом 230-270 г. Животные по 7 особей в контрольной и по 8 особей в опытной группах содержались в помещении при температуре 22±3⁰С на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. Опытной группе животных подкожно вводили изопреналин в дозе 10 мг/кг массы тела дважды с интервалом в 24 ч [9], контрольной группе животных вводили аналогичный объём физиологического раствора.

Для исследования животных декапитировали через 24 ч после введения второй дозы изопреналина и извлекали сердце. Часть миокарда замораживали в жидком азоте при -70°C , оставшуюся часть миокарда измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма на буфере ($\text{pH}=7,4$), содержащем 0,32 М сахарозу, 0,25 мМ тартрат натрия и 0,5 мМ ЭДТА. Субклеточные фракции миокарда (митохондриальную фракцию) выделяли на сахарозном буфере методом дифференциального центрифугирования на центрифуге К-26 D (Германия) при 4°C . Гомогенат сердечной мышцы центрифугировали 7 мин при 1000g. Супернатант повторно центрифугировали 15 мин при 10000g. Полученный осадок митохондрий ресуспензировали средой выделения с последующим добавлением в соотношении 1:1 6% HClO_4 , содержащую 10 мМ дитиотрейтола, и центрифугировали 15 мин при 14000g и 4°C на центрифуге «Heraeus Biofuge Fresco» (Германия). Определение количества белка проводилось по методу Лоури [8].

Анализ свободного КоА (КоА-SH) и короткоцепочечных ацил-КоА (ацетил-КоА, малонил-КоА и бутирил-КоА) в хлорнокислых экстрактах гомогенатов и митохондриальной фракции миокарда с некоторыми модификациями осуществляли ранее разработанным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе «Agilent 1100/1200» («Agilent Technologies», США) [2]. Гомогенаты были приготовлены (в соотношении 1:4, масса:объем) с использованием 6% HClO_4 , содержащей 15 мМ тартрата натрия (для предупреждения гидролиза КоА-SH) и 10 мМ дитиотрейтола (для предупреждения окисления кофермента в дисульфидную форму), с последующим центрифугированием 15 мин при 14000g и 4°C . pH супернатантов доводили до 3-4 путём добавления 20% NaOH. Подготовленные пробы в процессе хроматографирования сохраняли в термостате прибора при 8°C . Для элюирования образцов использовали 100 мМ натрий-фосфатный буфер ($\text{pH}=4,5$) и градиент (5-30% метанола) на колонке Zorbax SB-C₁₈ размером 3x150 мм и размером частиц 3,5 мкм («Agilent Technologies», США) с температурой 30°C , скоростью потока 0,4 мл/мин. Регистрацию пиков осуществляли на диодно-матричном детекторе при 260 нм. Вводимый объем пробы – 30 мкл.

Сравнение достоверности различий между группами проводилось по t-критерию Стьюдента с помощью программного пакета «Prizm 4 for Windows» (ver. 4.00 (2003), «GraphPad Software, Inc»). Статистически значимыми считали различия при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Данный эксперимент показал, что введение изопреналина при визуальном наблюдении вызывает у животных изменения в индивидуальном поведении (снижение двигательной активности и потребления пищи), а также изменения на физиологическом уровне – увеличивается частота дыхания и частота сердечных сокращений (тахикардия) [5, 11].

Результаты проведённого исследования по изучению уровня свободного КоА и короткоцепочечных ацил-КоА в миокарде при введении подкожно изопреналина в дозе 10 мг/кг массы тела животных представлены в таблицах 1–2.

Как видно из таблицы 1, изопреналин приводит к снижению (тенденция) в гомогенате миокарда экспериментальных животных уровня КоА-SH, ацетил-КоА, бутирил-КоА, однако достоверным это различие оказалось для малонил-КоА. Также изменилось, но незначительно, соотношение КоА-SH/ацетил-КоА. Схожие изменения наблюдаются и в гомогенате миокарда при пересчёте изучаемых показателей на мг белка (табл. 2).

В митохондриальной фракции миокарда экспериментальных животных выявлен достоверный, по отношению к контрольной группе, прирост уровня КоА-SH. Однако уровень короткоцепочечных ацил-производных имел тенденцию к снижению для ацетил-КоА и бутирил-КоА, но был статистически достоверным для малонил-КоА.

Таблица 1 – Влияние изопреналина на уровень кофермента А и его ацил-производных (нмоль/г ткани) в гомогенате миокарда крыс-самцов

Группы	КоА-SH	Ацетил-КоА	Малонил-КоА	Бутирил-КоА	КоА-SH/Ацетил-КоА
Контроль	83,68±6,54	30,46±2,29	2,98±0,15	3,01±0,64	2,83±0,42
Изопреналин	70,01±3,20	27,08±3,04	1,81±0,11*	1,90±0,11	2,66±0,21

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль». Данные представлены в виде среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Таблица 2 – Влияние изопреналина на уровень кофермента А и его ацил-производных (нмоль/мг белка) в гомогенате и митохондриальной фракции миокарда крыс-самцов

	Группы	КоА-SH	Ацетил-КоА	Малонил-КоА	Бутирил-КоА	КоА-SH/Ацетил-КоА
Гомогенат	Контроль	0,78±0,04	0,29±0,04	0,028±0,0025	0,028±0,006	2,83±0,42
	Изопреналин	0,65±0,05	0,25±0,03	0,017±0,0014*	0,018±0,002	2,66±0,21
Митохондриальная фракция	Контроль	0,459±0,037	0,123±0,013	0,032±0,008	0,022±0,004	3,86±0,50
	Изопреналин	0,859±0,086*	0,099±0,006	0,011±0,002*	0,019±0,002	8,65±0,38*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль». Данные представлены в виде среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

На основании полученных результатов можно предположить, что введение изопреналина приводит к дисбалансу субстратов биоэнергетического обмена в митохондриях миокарда, обусловленного падением уровня малонил-КоА и растормаживанием процесса транспорта и окисления свободных жирных кислот [1, 6]. Вероятно, в этих условиях включается механизм адаптации к данным изменениям, а именно – инициируется цитозольно-митохондриальный обмен КоА в ситуации преимущественной потребности кофермента для КоА-зависимых реакций в митохондриях [4]. Выражается это увеличением более чем в 2 раза соотношения КоА-SH/ацетил-КоА в митохондриальной фракции миокарда, а также в снижении уровня короткоцепочечных ацил-производных КоА.

Выводы. Введение подкожно изопреналина в дозе 10 мг/кг массы тела дважды с интервалом в 24 ч приводит к дисбалансу фракций КоА в митохондриях миокарда животных, что выражается в падении уровня малонил-КоА, а также в увеличении уровня КоА-SH и соотношения КоА-SH/ацетил-КоА.

Закключение. Изопреналин в дозе 10 мг/кг может использоваться для моделирования ацил-КоА-опосредованных нарушений биоэнергетической функции миокарда.
Работа выполнена по гранту БРФФИ «Б08М-091».

Литература

1. Гуринович В.А., Дорофей Д.С., Мойсеёнок А.Г. Взаимодействие систем карнитина и биосинтеза кофермента А в энергообеспечении миокарда // Нейрогуморальные механизмы регуляции функций в норме и патологии: сборник научных статей / отв. ред. Гурин В.Н. и др. – Минск: Бизнесофсет, 2007. – С. 84–89.
2. Дорофей Д.С., Катковская И.Н., Гуринович В.А. Исследование возможности модуляции фракций кофермента А в миокарде при алюминиевом токсикозе // Молекулярная и биохимическая фармакология: материалы международной научной конференции, посвящённой 80-летию НАН Беларуси (Гродно, 25–26 сентября 2008 г.) / отв. ред. Пронько П.С. и др. – Гродно: ГрГУ, 2008. – С. 26–28.
3. Мойсеёнок А.Г. Пантотеновая кислота (биохимия и применение витамина). – Минск: Наука и техника, 1980. – 264 с.
4. Мойсеёнок А.Г. Транспорт кофермента А в митохондрии и его взаимосвязь с системой биосинтеза кофермента // Кофермент А и его предшественники: синтез, анализ и экспериментальное изучение / отв. ред. Тишкин В.С. – Москва: ИП «Патент», 1997. – С. 15–22.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей редакцией член-корреспондента РАМН Хабриева Р.У. – Москва: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
6. Awan M.M., Saggerson E.D. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation // *Biochem. J.* – 1993. – Vol. 295. – P. 61–66.
7. Kumar S.H.S., Anandan R. Biochemical studies on the cardioprotective effect of glutamine on tissue antioxidant defense system in isoprenaline-induced myocardial infarction in rats // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2007. – Vol. 40. – P. 49–55.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
9. Meng D., Feng L., Chen X.-J., Yang D., Zhang J.-N. Trimetazidine improved Ca^{2+} handling in isoprenaline-mediated myocardial injury of rats // *Exp. Physiol.* – 2006. – Vol. 91. – P. 591–601.
10. Saks V., Favier R., Guzun R., Schlattner U., Wallimann Th. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 577. – P. 769–777.
11. Van Steeg T.J., Freijer J., Danhof M., De Lange E.C.M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of S(-)-atenolol in rats: reduction of isoprenaline-induced tachycardia as a continuous pharmacodynamic endpoint // *British Journal of Pharmacology.* – 2007. – Vol. 151. – P. 356–366.