

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА — КСИМЕДОНА И ДИУЦИФОНА — НА БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ МИТОХОНДРИЙ

Ю.Д. Слабнов, Д.А. Валимухаметова, И.Х. Валева, Р.С. Гараев

Республиканский медицинский диагностический центр (главрач — Р.З. Абашев) МЗ РТ, кафедра фармакологии (зав. — проф. Р.С. Гараев) Казанского государственного медицинского университета

Ксимедон и диуцифон являются препаратами пиридинового ряда, синтезированными в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН. Установлена эффективность этих препаратов в клинике при иммунодефицитных состояниях [2, 6]. Иммуномодулирующее действие препаратов данной группы на Т-клеточно-опосредованный иммунный ответ связано со способностью стимулировать лимфопоэз и созревание предшественников Т-лимфоцитов до зрелых форм через активацию тимуса и выделяемые им тимусные факторы, а также усилить секрецию Т-клетками экзогенной ДНК.

Дальнейшее изучение механизмов иммуотропного действия ксимедона и диуцифона представляет интерес не только для иммунофармакологии, но и для клиницистов.

Эксперименты проведены на 100 беспородных крысах-самцах. Ксимедон (3 и 30 мг/кг), диуцифон (30 мг/кг) и физиологический раствор (0,2 мл) вводили внутривенно ежедневно в течение 9 и 30 дней. Под эфирным наркозом животных декапитировали и на холоду из тимуса выделяли тимоциты [1]. Использовали среду выделения и инкубации клеток следующего состава: 145 мМ NaCl, 5,6 мМ KCl, 1 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ Na₂HPO₄, pH 7,4 (РФ₆). На 1 мл среды РФ₆ добавляли 0,02 мл 0,5 М раствора свежеприготовленной глюкозы. К одной части этого раствора приливали 1,5 части среды 199 (pH 7,4). Суспензию тимоцитов фильтровали через капроновую сетку. Работу проводили в стеклянной силиконизированной посуде при комнатной температуре.

Митохондрии печени крыс выделяли с помощью дифференциального центрифугирования при температуре от 0 до 2°C [4]. Среда выделения: 300 мМ сахарозы, 5 мМ трис-HCl, 0,25 мМ ЭДТА, pH 7,8. Суспензию митохондрий хранили в стеклянных бюксах в воде со льдом в холодильнике и использовали в опытах в течение не более 2 часов после выделения. Среда инкубации: 200 мМ сахарозы, 30 мМ трис-HCl, 10 мМ KH₂PO₄, 5 мМ MgSO₄, 10 мМ KCl, 0,25 мМ ЭДТА, pH 7,5. В качестве субстратов дыхания митохондрий применяли янтарную (5 мМ), глутаминовую (4 мМ) и яблочную (2 мМ) кислоты. Кроме того, использовали аденозиндифосфат (160 мкМ), 2,4-динитрофенол (ДНФ, 20—40 мкМ).

Дыхание тимоцитов и митохондрий печени

крыс регистрировали полярографическим методом с помощью платинового электрода Кларка [8] при температуре 28°C и непрерывном перемешивании с помощью магнитной мешалки в ячейках объемом 0,5 мл (для тимоцитов) и объемом 1,3 мл (для митохондрий печени). Метаболические состояния митохондрий обозначены по Б.Чансу [10]. Целостность плазматической мембраны тимоцитов оценивали по отсутствию ускорения дыхания при добавлении в инкубационную среду не проникающего в физиологических условиях субстрата митохондриального окисления — сукцината (5 мМ) на фоне ротенона ($2 \cdot 10^{-6}$ М) [3]. Скорость дыхания тимоцитов выражалась в нмоль O₂ в минуту на 10⁹ клеток, а митохондрий печени — в нмоль O₂ в минуту на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [13].

Стимуляцию митохондриального дыхания тимоцитов препаратами выражали в процентах по отношению к контролю — ПУ (процент усиления).

В исследованиях Л.А. Ратниковой и Е.И. Асташкина [5] было показано, что в данной экспериментальной системе специфический ингибитор дыхательной цепи митохондрий цианид натрия в концентрации 0,1—0,2 мкг/мл ингибирует, а разработчик окислительного фосфорилирования 2,4-ДНФ стимулирует дыхание тимоцитов, что свидетельствует о сопряжении окисления субстратов в митохондриях с фосфорилированием, а также о том, что потребление кислорода тимоцитами практически полностью связано с активностью митохондрий. В связи с этим суспензия тимоцитов является удобной моделью для скрининга влияния различных химических соединений, в том числе лекарственных препаратов, на функции митохондрий при их воздействии как на уровне целостного организма в условиях *in vivo*, так и на уровне иммунокомпетентной клетки в системе *in vitro* [5].

При сравнительном исследовании дыхания тимоцитов крыс, получавших препараты пиридинового ряда в дозе 30 мг/кг в течение 9 дней, нами отмечена достоверная стимуляция всех видов исследованного митохондриального дыхания только у крыс, получавших ксимедон. Диуцифон на этих же сроках введения стимулировал лишь разобщенное дыхание — состояние V₃^P по Чансу [10] (табл. 1). Необходимо отметить, что на ранних сроках введения оба препарата наиболее выражено стимулировали разобщенное дыхание, что подтверждают значения ПУ, которые составили для ксимедона и диуцифона соответственно 78,5% и 41,4% (рис. 1).

Действие ксимедона и диуцифона на дыхание митохондрий тимоцитов крыс

Препараты	Доза, мг/кг массы	Состояние регистрируемого дыхания по Чансу					
		эндогенное V_0	ПУпр, %	субстратное V_2^S	ПУпр, %	2,4-ДНФ V_3^P	ПУпр, %
Контроль		126,0±6,9		101,2±6,1		191,0±6,2	
Длительность введения — 9 дней							
Ксимедон	30	162,9±2,0***	29,36	135,0±1,8***	33,66	341,0±3,7***	78,53
Диуцифон	30	123,0±3,7	-2,3	103,0±3,3	1,7	270,0±5,8*	41,36
Длительность введения — 30 дней							
Ксимедон	3	298,0±7,4*	136,5	291,0±7,9*	187,5	422,0±10,5*	120,8
Ксимедон	30	455,0±6,4***	261,1	428,0±7,0***	327,76	620,0±9,6***	224,6
Диуцифон	30	300,0±7,7***	138,1	299,0±8,0***	195,45	411,0±10,0***	115,2

Примечание. * Достоверность различий по сравнению с контролем ($P < 0,05$), ** между ксимедоном и диуцифоном при дозе 30 мг/кг массы тела при одинаковой длительности введения ($P < 0,05$), *** при введении ксимедона и диуцифона в дозе 30 мг/кг массы тела при длительности 9 и 30 дней ($P < 0,05$).

Таблица 2

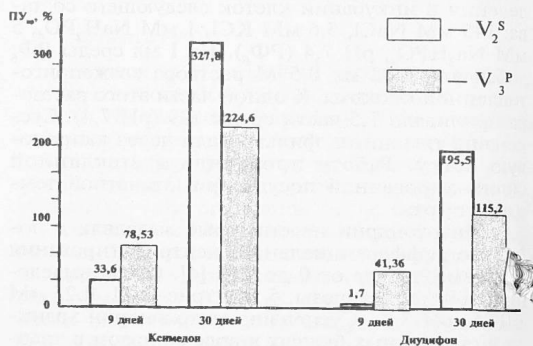
Действие ксимедона на систему окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс

Препараты	Доза мг/кг массы	Состояние регистрируемого дыхания по Чансу					
		V_0	V_2^S	V_3	V_4^{ATP}	V_3^{P1}	V_3^{P2}
Контроль		7,0±0,2	12,0±0,4	42,0±1,2	20,0±0,6	38,0±1,1	42,0±1,2
Ксимедон	7	10,0±0,3*	12,0±0,4	84,0±2,5***	30,0±0,9*	49,0±1,4	67,0±2,0*
Ксимедон	70	18,0±0,5***	22,0±0,6**	51,0±1,5*	44,0±1,3**	45,0±1,3	49,0±1,4

Примечание. Условные обозначения: V_0 — эндогенное дыхание, V_2^S — состояние митохондрий после добавления субстратов дыхания (глутаминовой и яблочной кислот), V_3 — состояние митохондрий после добавления субстрата фосфорилирования (АДФ), V_4^{ATP} — состояние митохондрий после истощения субстрата фосфорилирования, V_3^P — состояние митохондрий после добавления разбавителя окисления с фосфорилированием (2,4-ДНФ).

Достоверность различий обозначена так же, как и в табл. 1.

При увеличении длительности введения препаратов до 30 дней нами отмечено достоверное повышение всех видов регистрируемого митохондриального дыхания тимоцитов крыс. Вновь наиболее выраженный эффект стимуляции дыхания митохондрий отмечен у ксимедона в дозе 30 мг/кг как по сравнению с диуцифоном, так и по сравнению с ксимедоном в дозе 3 мг/кг (табл. 1). С увеличением длительности введения препаратов эффект стимуляции митохондриального дыхания под действием ксимедона и диуцифона максимально проявляется в присутствии избыточного количества субстрата окисления в инкубационной среде (состояние V_2^S по Чансу). При этом ПУ ксимедона и диуцифона на сроке введения 30 дней возрос по сравнению с таковым на сроке 9 дней соответственно в 9,7 раза и 115 раз (рис. 1).



1. Диаграмма сравнительной оценки влияния ксимедона и диуцифона на митохондриальное дыхание.

Таким образом, влияние пиримидиновых производных на митохондриальное дыхание зависит от длительности введения препаратов. На ранних сроках введения (9 дней) наиболее выраженная

стимуляция митохондриального дыхания тимоцитов проявлялась в присутствии разобшителя окислительного фосфорилирования (40 мкМ 2,4-ДФ), на более длительных сроках (30 дней) — в присутствии избыточного количества субстрата окисления в инкубационной среде (глюкоза). На сроке введения 30 дней отмечена дозозависимая стимуляция всех видов исследованного митохондриального дыхания под действием ксимедона.

Полученные данные согласуются с результатами исследований действия ксимедона на дыхание и окислительное фосфорилирование изолированных митохондрий печени крыс, где препарат также выраженно стимулировал функциональную активность дыхательной цепи митохондрий печени (табл. 2). Следовательно, стимулирование всех видов дыхания под действием ксимедона является, по-видимому, общей закономерностью для разных органов и тканей.

При некоторых патологических состояниях организма (аутоиммунные и хронические заболевания) перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий клеток бывает разобщен с процессом фосфорилирования [11]. Разобщенное состояние митохондрий часто наблюдается в пересаживаемых органах, в частности в почках при длительном их хранении [12]. Очевидно, в этих случаях широко применяемый в клинической практике иммунодепрессант циклоспорин А будет оказывать цитотоксическое действие и гепато- и нефротоксические эффекты [12, 14, 15].

Исходя из представленных нами результатов, комплексное применение пиримидиновых производных и циклоспорина А, возможно, уменьшит побочные эффекты при назначении последнего больным с аутоиммунной патологией и при пересадке органов и тканей. Более того, полученный нами выраженный клинический эффект при комплексном применении ксимедона у больных туберкулезом легких [7], по-видимому, также можно объяснить его влиянием на митохондриальную активность лимфоцитов и гепатоцитов, которая при данной патологии резко снижена. Выявленное нами увеличение скоростей дыхания во всех метаболических состояниях митохондрий под действием пиримидиновых производных, возможно, обусловлено их влиянием на секрецию гормонов щитовидной железы, которые, вторично воздействуя на функцию митохондрий, вызывают подобный эффект [9].

1. Ксимедон стимулирует скорость потребления тимоцитами крыс кислорода в присутствии как избытка субстрата окисления, так и разобшителя окислительного фосфорилирования в инкубационной среде.

2. Стимулирующий эффект ксимедона на функциональную активность дыхательной цепи митохондрий имеет прямую зависимость от дозы и длительности введения.

3. Стимуляция митохондриального дыхания под действием ксимедона проявляется не только в печени, но и в тимусе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валева И.Х., Мохова Е.Н. Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. — М., 1978.
2. Ермаков Е.В., Коломеец Н.М., Новоженев В.Г. и др. // Тер. арх. — 1983. — № 3. — С.41—47.
3. Онощенко Г.И., Мохова Е.Н. // Биохимия. — 1983. — № 4. — С.652—665.
4. Мосолова И.М., Горская И.А., Шольц К.Ф. и др. Методы современной химии. — М., 1975.
5. Ратникова Л.А., Асташкин Е.И. // Экспер. и клин. фармакол. — 1995. — № 2. — С. 47—49.
6. Славнов Ю.Д., Валимухаметова Д.А., Цибулькин А.П. и др. // Казанский мед. ж. — 1993. — №3. — С. 193—197.
7. Славнов Ю.Д., Фирсов О.В., Визель А.А. и др. Тезисы докладов I съезда Российского научного общества фармакологов — 9—13 октября 1995 г. — М., 1995.
8. Трушанов А.А. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М., 1973.
9. Туракулов Я.Х., Мирахмедов А.К., Львович Н.А. и др. // Проблемы эндокринологии. — 1971. — № 6. — С. 105—108.
10. Chance B., Williams G.R. // Advances in Enzymology and related subjects of biochemistry. — 1956. — Vol. 17. — P. 65—136/
11. Kahan D. // New Engl. J. Med. — 1989. — Vol. 321. — P. 1725 — 1738.
12. Khauli R.B., Stizelecki T., Malhotra B. et al. // Transplantation. — 1988. — Vol. 46. — P. 109—114.
13. Lowry O.H., Rosebrough U.J., Fazz A.Z. et al. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
14. Jackson N., O'Connor R., Humes D. // Transplantation. — 1988. — Vol. 46. — P. 109—114.
15. Zotz R.B., Beste M., Brenner N. et al. // J. cardiovasc. Pharmacol. — 1991. — Vol. 18. — P. S82—S83.

Поступила 04.03.96.

EFFECT OF PYRIMIDINE DERIVATIVES: XYMEDONE AND DIUCIPHONE ON BIOENERGETIC PROCESSES OF MITOCHONDRIA

Yu. D. Slabnov, D.A. Valimukhametova, I.Kh. Valeeva, R.S. Garaev

Summary

The stimulation of oxygen consumption in the presence of incubative medium just as excessive quantity of oxidation substrate, so oxidation phosphorylation disconnector of 2,4-dinitrophenol is shown on thymocytes of not pedigree he-rats obtaining xymedone (3 mg/kg and 30 mg/kg) and diuciphone (30 mg/kg) during 9 and 30 days. The effect of xymedone is dosedependent and more pronounced than the effect of diuciphone. The uniform effect of xymedone on mitochondrion respiration of thymocytes and isolated mitochondria of the liver is shown.