

ВПЛИВ СИМПАТИЧНОЇ ДЕНЕРВАЦІЇ СЕРЦЯ НА АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ ФЕРМЕНТІВ МІОКАРДА

Г. М. Бутенко, Ю. В. Хмелевський

Кафедра патологічної фізіології і кіфедра біохімії
Київського медичного інституту

Питання нервової регуляції обміну речовин у серцевому м'язі набувають все більшого значення у зв'язку з даними, що вказують на можливість виникнення патологічного процесу при порушенні рівноваги тонуусу симпатичних та парасимпатичних нервів серця [3, 15].

Експериментально доведено, що, як гострі, так і хронічні впливи на нервові прилади серця можуть привести до змін енергетичного обміну, хімічного складу міокарда та активності ряду його ферментів [1, 5, 10]. Але наявні в літературі дані не дають все ж повного уявлення про зміни обміну речовин міокарда при хронічних порушеннях іннервації серця. Тому мета цієї роботи полягає у вивченні змін активності групи ферментів, які беруть участь в енергетичному забезпеченні серця, на фоні хронічної симпатичної денервації його.

Оскільки нерідко дані про загальну активність ферменту ще не дають повного уявлення щодо змін у ньому, для ряду ферментів було проведено вивчення їх ізоферментного складу, що надає інформацію не тільки про кількісні, але й про якісні зміни даного ензиму. Одержані дані мають значення і при вивченні питання про трофічні впливи нервової системи на серце.

Методика досліджень

Досліди проведені на кішках та щурах. У кішок трансторакально видаляли зірчасті та три верхні симпатичні грудні вузли. Тварин брали в дослід через два-три тижні після операції. У щурів екстраплеврально, через перше міжребер'я видаляли зірчасті та верхні грудні симпатичні ганглії, потім екстипували верхні шийні вузли. Вся операція провадилась одномоментно. Вивчення активності ферментів міокарда провадилось також через два тижні. Тестом на повноту десимпатизації служив вміст катехоламінів у міокарді, який після операції зменшувався більш ніж у п'ять разів і не відновлювався на протязі трьох місяців дослідження. Контрольним тваринам також робили операцію, яка включала підхід до гангліїв, але без їх видалення. Надалі виявилось, що вміст катехоламінів та активність досліджуваних ферментів у цих контрольних тварин достовірно не відрізнялись від показників інтактних тварин. Визначали активність таких ферментів (у дужках стоїть шифр ферменту відповідно міжнародній номенклатурі [11]): гексокінази (2.7.1.1), лактатдегідрогенази (1.1.1.27), піруватдегідрогенази (1.2.4.1), α -кетоглутаратдегідрогенази (1.2.4.2), сукцинатдегідрогенази (1.3.99.1), малатдегідрогенази (1.1.1.37).

Активність піруватдегідрогенази та α -кетоглутаратдегідрогенази визначали за методом Гублера [12] з використанням феріціаніду як акцептора електронів. Активність цих ферментів виражали в одиницях приросту оптичної щільності за 30 хв інкубації. Активність гексокінази у щурів визначали у саркоплазматичній фракції м'яза, одержаній після гомогенізування серця, екстракції фізіологічним розчином на протязі 1,5 год при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ та центрифугування у вакуум-рефрижераторній центрифугі при 16 тис. об/хв. Активність ферменту виявляли за дещо зміненим методом Салас та ін. [6, 16] і виражали у $\mu\text{моль}$ х перетвореного за 1 хв НАДФ на 1 мг білка фракції. Загальну активність лактатдегідрогенази визначали за методом Шевала і Товарек [4] та розраховували у кількості піровиноградної кислоти, перетвореної з молочної за 1 год 1 мг білка екстракту.

Для реакції брали двогдинний екстракт розчином низької іонної сили (мединалвероналовий буфер, рН 8,6, іонна сила 0,05 моль) з дальшим центрифугуванням на протязі 10 хв при 18 тис. об/хв і температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Малатдегідрогеназу визначали в екстракті, виготовленому згаданим способом. Загальну активність малатдегідрогенази визначали з допомогою оптичного методу Варбурга [7]. Активність розраховували в $\mu\text{моль}$ х НАД, перетвореного за 1 хв 1 мг білка екстракту. Кількість білка виявляли за Лоурі. Ізоферментний склад лактат- та малатдегідрогенази вивчали у тих же екстрактах, в яких визначали загальну активність. Для цього екстракти заздалегідь піддавали електрофорезу в агаровому гелі на протязі 50 хв при градієнті напруги 15 в/см, та температурі не вище $+4^{\circ}\text{C}$ в апараті для високовольного електрофорезу [18]. Це дозволяло одержувати електрофореграми білка з дуже чіткими фракціями. Виявлення ізоферментів лактат- та малатдегідрогенази провадилось за реакцією з вітросним тетразолієм [2]. Денситометрія одержаних електрофореграм провадилась на денситографі фірми «Сименс». За денситограмами обчислювали

відносний вміст окремих ізоферментів. Активність сукциндегідрогенази вивчали у цільному гомогенаті серця щура за кількістю формазану, відновленого 1 г м'язу при температурі 37°С за 30 хв з 2, 3, 5-трифенілтетразолію.

Результати досліджень

Після операції симпатичної денервації тварини відчували відносно швидко, так що на момент дослідження активності ферментів за своїм виглядом та поведінкою вони майже не відрізнялись від інтактних. Результати, одержані при дослідженні ферментів піруватдегідрогенази та α -кетоглутаратдегідрогенази у серцевому м'язі кішок, наведені в табл. 1.

Таблиця 1
Активність піруватдегідрогенази та α -кетоглутаратдегідрогенази в міокарді кішок

Назва ферменту		Контроль		Симпатекомія		p
		Кількість тварин	E ₄₂₀ м.мк/кг білка	Кількість тварин	E ₄₂₀ м.мк/кг білка	
Піруватдегідрогеназа за 30 хв	—	6	0,0640±0,0062	7	0,0249±0,0036	<0,001
	з додаванням тіаміндифосфату	6	0,0638±0,0064	7	0,0277±0,0030	<0,001
α -кетоглутаратдегідрогеназа за 15 хв	—	6	0,0389±0,0048	7	0,0217±0,0022	<0,01
	з додаванням тіаміндифосфату	6	0,0399±0,0037	7	0,0224±0,0027	<0,01

Як видно з табл. 1, активність обох досліджуваних ферментів значно зменшилась після симпатекомії, причому додавання коферменту — тіаміндифосфату до реакційної суміші неспроможне підвищити рівень їх активності. Це свідчить про те, що в даному випадку зниження активності тіамінзалежних ферментів виникає не внаслідок тіамінової недостатності, а, можливо, є результатом перебудови ферментних систем.

Наступна серія експериментів була виконана на щурах. У цій серії вивчали групу інших ферментів, що мають відношення до енергетичного обміну. Зміни активності, одержані при десимпатизації серця щурів, наведені в табл. 2.

Таблиця 2
Активність деяких ферментів міокарда щурів у нормі та при десимпатизації

Назва ферменту		Контроль		Симпатекомія		p
		Кількість тварин	Результат	Кількість тварин	Результат	
Гексокіназа	мкмоль/НАДФ/мг білка/хв	8	30,2 ± 1,96	8	49,3 ± 7,0	<0,05
Лактатдегідрогеназа	мкмоль ПВК/мг білка/год	5	37,7 ± 1,46	5	40,8 ± 0,48	<0,05
Сукциндегідрогеназа	в мг формазану/г/30 хв	7	1,276±0,054	7	1,055±0,070	<0,05
Малатдегідрогеназа	мкмоль НАД/мг білка/хв	6	1,29 ± 0,11	5	1,32 ± 0,16	<0,5

Отже, як видно з табл. 2, при десимпатизації спостерігається підвищення активності гексокінази та лактатдегідрогенази, знижується активність сукциндегідрогенази та залишається незмінною малатдегідрогеназа.

У наших дослідах у серці щура спостерігалось три ізоферменти малатдегідрогенази: два — з рухом у бік анода, причому один, що має найбільшу анодну рухливість, дуже дифузний. Третій ізофермент незначно переміщується у бік катода. Нами

не було виявлено будь-якої десимпатизації.

У серці щурів знаходяться різні ізоферменти, активності між окремими ф

Відносна активність

Серця дослідів	ЛД
Контроль	33,1±
Симпатекомія	38,8±

З допомогою критерію перших фракцій у групі щурів, що підвищення активності.

Обговорення

Підсумовуючи одержані результати дослідження активності ферментів цитратного циклу, при десимпатизації незначно змінюється кількість ферментів, активності лактатдегідрогенази та сукцинатдегідрогенази у низьких умовах при низьких температурах, що перетворює піруват на

Загальновизнано, що при симпатичній денервації АТФ синтезується в меншій кількості, ніж при нормі. В результаті скоротливої активності серця виконувати свою функцію збільшується [1]. Тому, з огляду на пов'язаність із загальною симпатичною денервацією, з іншого боку, організму понад 60% енергії [8], і лише серце, що іннервується [17], має перевагу, що серце як джерело циркулює в крові, в кількості АТФ.

Виходячи з цих даних, симпатична денервація серця не тільки зменшує кількість АТФ, але й виявляється якісна зміна типу обміну, характерний для жирів, можливо, відбувається окислення, як та, що виникає при активності гексокінази), тобто зниження активності лактатдегідрогенази (аеробіозу), не маючи можливості ацетил-КоА (на що вказує збільшення дії так званих лотів. Можливо, цим і пояснюється зниження активності інших ферментів).

1. Симпатична денервація

залежності ферментів піруватного циклу.

2. При десимпатизації серця змінюється активність сукцинатдегідрогенази, малатдегідрогенази та лактатдегідрогенази, активності відбудови Н-субодиницями

не було виявлено будь-яких змін в ізоферментному складі малатдегідрогенази при десимпатизації.

У серці щурів знаходиться п'ять ізоферментів лактатдегідрогенази. Розподіл активності між окремими фракціями наведений у табл. 3.

Таблиця 3

Відносна активність ізоферментів лактатдегідрогенази в серці щура
(в % від загальної)

Серія дослідів	Назва фракції				
	ЛД ₁	ЛД ₂	ЛД ₃	ЛД ₄	ЛД ₅
Контроль	33,1±1,3	37,0±2,0	17,4±1,6	8,8±1,3	3,7±1,2
Симпектомія	38,8±2,9	42,5±3,0	12,3±2,9	4,0±1,6	2,4±1,4

З допомогою критерію χ^2 вдається довести, що збільшення активності двох перших фракцій у групі з десимпатизацією не є випадковим ($p < 0,05$), а це значить, що підвищення активності ферменту відбувається внаслідок збільшення Н-субодиниць.

Обговорення результатів досліджень

Підсумовуючи одержані факти, слід звернути увагу на такі обставини: активність ферментів цитратного циклу, таких як сукциндегідрогеназа та α -кетоглутаратдегідрогеназа, при десимпатизації, зменшена, тоді як малатдегідрогеназа залишилась незмінною і кількісно, і якісно. Активність гексокінази підвищена. Підвищення активності лактатдегідрогенази відбувається за рахунок фракцій, що працюють в аеробних умовах при низьких концентраціях пірувату. Водночас, активність ферменту, що перетворює піруват на ацетил-КоА, пригнічена.

Загальноновизнано, що активність ферментів циклу трикарбонових кислот регулюється співвідношенням АДФ/АТФ [14]: при збільшенні АДФ та зменшенні АТФ ці ферменти активуються. Відношення ж АДФ до АТФ, у свою чергу, залежить від рівня скоротливої активності серцевого м'яза. Відомо, що при десимпатизації спроможність серця виконувати роботу зменшується [9], а вміст АТФ та креатинфосфату збільшується [1]. Тому, зниження активності ферментів трикарбонового циклу можна було б пов'язати із загальним зниженням функціональної здатності серця при симпатичній денервації. З іншого боку, встановлено, що серце дорослого гомойотермного організму понад 60% енергії одержує за рахунок окислення жирів та жирних кислот [8], і лише серце плодів та новонароджених, з майже відсутньою симпатичною іннервацією [17], має переважно вуглеводний тип обміну [14]. Слід також мати на увазі, що серце як джерело енергії може використовувати молочну кислоту, яка циркулює в крові, в кількостях, що приблизно дорівнюють використанню глюкози.

Виходячи з цих даних, можна висловити гіпотезу про те, що при симпатичній денервації серця не тільки знижується загальний рівень окисних процесів у ньому, але й виявляється якісна зміна типу обміну з переходом на переважно вуглеводний тип обміну, характерний для більш ранніх етапів розвитку. Блокада метаболізму жирів, можливо, відбувається на етапі створення ацетил-КоА. Тоді піровиноградна кислота, як та, що виникає внаслідок підвищеного витрачання глюкози (збільшення активності гексокінази), так і підвищеної утилізації молочної кислоти крові (збільшення активності лактатдегідрогенази за рахунок фракцій, що працюють в умовах аеробіозу), не маючи можливості потрапити до циклу Кребса шляхом створення ацетил-КоА (на що вказує зниження вмісту піруватдегідрогенази), може проникнути туди завдяки дії так званого малікферменту з наступним утворенням яблучної кислоти. Можливо, цим і пояснюється незмінність рівня малатдегідрогенази при зниженні активності інших дегідрогеназ цитратного циклу.

Висновки

1. Симпатична денервація серця у кішок веде до зниження активності тіамін-залежних ферментів піруватдегідрогенази та α -кетоглутаратдегідрогенази.
2. При десимпатизації міокарда у щурів спостерігається зменшення активності сукцинатдегідрогенази, малатдегідрогеназа залишається незмінною, а активність гексокінази та лактатдегідрогенази підвищується. При цьому підвищення лактатдегідрогеназної активності відбувається за рахунок двох перших ізоферментних фракцій, створених Н-субодиницями.